

*ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE  
UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE  
FACULTE DES SCIENCES DE LUMINY*

## **THESE**

*Présentée et soutenue publiquement le 11 Juin 2010 par*

**Richard SALACHA**

*En vue de l'obtention du grade de*

**Docteur de l'Université de la Méditerranée**

Spécialité : Microbiologie moléculaire et Biotechnologies

*Les Patatines de *Pseudomonas aeruginosa* :  
Sécrétées ou non Secrétées ?  
Telle est la question...*

Composition du **JURY** :

Monsieur le Professeur James STURGIS  
Madame le Docteur Kim HARDIE  
Monsieur le Docteur Christophe BELOIN  
Monsieur le Professeur Alain FILLOUX  
Monsieur le Docteur Romé VOULHOUX  
Madame le Docteur Sophie BLEVES

Président du jury  
Rapportrice  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directrice de Thèse



# Citations

---

Voici quelques citations clés pour moi, qui m'ont permis d'enchaîner les manip et les journées au laboratoire, malgré les déceptions passagères.

- « *Un problème sans solution est un problème mal posé* »

Albert Einstein

- « *Rien n'est plus proche du vrai que le faux.* »

Albert Einstein

- « *Si vous ne pouvez expliquer un concept à un enfant de six ans, c'est que vous ne le comprenez pas complètement* »

Albert Einstein

- « *La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi !* »

Albert Einstein

- « *Je n'ai pas échoué, j'ai trouvé dix mille façons qui ne fonctionnent pas.* »

Thomas Edison

- « *Vivre est la plus belle des choses. La plupart des gens se contente d'exister.* »

Oscar Wilde

- « *Si ce n'est aujourd'hui, ce sera demain. Rappelons-nous que la patience est le pilier de la sagesse.* »

Frédéric Mistral

- « *You can't always get what you want, but if you try sometime, you just might find you get what you need* »

Mick Jagger

- « *En essayant continuellement, on finit par réussir. Donc plus ça rate, plus on a de chances que ça marche.* »

Les Shadoks



# Remerciements

---

Pour venir à bout d'une thèse, il faut du soutien. Alors commençons par le commencement, je voudrais remercier les personnes qui m'ont permis de faire cette thèse, et surtout, de la terminer.

Tout d'abord, au commencement fut le Dr. Dominique Jourdheuil-Rahmani qui m'a conseillé à plusieurs reprises lorsque je n'étais qu'au lycée. C'est grâce aux discussions que j'ai eu avec elle que j'ai pris la décision d'étudier la biologie à la faculté, ce qui m'a conduit à passer ma thèse. Merci Dominique.

Ensuite, je voudrais remercier le Professeur Andrée Lazdunski dont j'ai suivi certains cours de microbiologie lors de ma maîtrise. Au travers de ses enseignements, elle a su nous montrer à quel point la microbiologie pouvait être intéressante. Par la suite, j'ai eu la chance de la côtoyer au laboratoire, de pouvoir profiter de son impressionnante mémoire et de son immense savoir, et chacune de ces interventions ou chacun de ses conseils étaient de réelles leçons pleines de justesse et d'intelligence.

Monsieur Alain, je te remercie pour avoir laissé à Sophie la liberté de prendre en stage de Master un non-initié aux expérimentations en laboratoire en général, et à la microbiologie en particulier. Malgré ton départ, je n'oublie pas l'aide que tu as pu m'apporter lorsque j'en ai eu besoin au début de ma thèse, et je t'en remercie d'autant plus. Et puis je te remercie d'avoir choisi Londres, en t'éloignant, tu as enfin mis un terme à la malédiction qui pesait trop lourd sur nos épaules depuis 17 ans (et le jour où l'on se reverra, ce sera peut-être 2 Mercis plutôt qu'un !)

Je me souviens des cours où je te prenais la tête avec mes questions anticipées, et notamment l'une d'entre elles, chère à ta mémoire, qui s'est avérée être la plus anticipée de toute. Je me souviens de ma surprise que tu te sois souvenue de moi lorsque j'ai téléphoné au labo la 1<sup>ère</sup> fois. Je ne sais plus en revanche si je te l'ai déjà dit, mais lorsque j'ai choisi ton sujet de stage, je n'ai pas choisi un sujet, je n'avais absolument RIEN compris à ton histoire



de patate. J'ai même eu bien peur en entendant le mot « phospholipase ». Non, j'ai choisi une personne, un encadrant. Car c'est bien la chose la plus importante pour moi, les relations humaines. Cela fait 5 ans et des patates maintenant que je suis venu pour qu'on puisse parler Sciences et Labo, et c'est cette rencontre avec toi qui m'a décidé à faire cette thèse. J'ai apprécié la franchise que tu as eu avec moi, et la franchise que tu m'as permis d'avoir lors de cette entrevue. Je pense que si tu ne m'avais pas choisi, je n'aurais pas fait de thèse. J'ai fait semblant d'aller voir d'autres labos, mais il était hors de question que j'aille ailleurs. Depuis, on a eu notre énorme lot de prises de têtes avec les manips, les refus diverses et variés, les caprices de ces foutues protéines, des démêlés bioinformatiques, et aussi des moments de soulagement, de joie et de fierté. On a aussi eu quelques prises de bec, mais j'ai un sale caractère, c'était plus ou moins obligé. On a aussi été confronté toi comme moi à des épreuves de la vie, qui nous ont rappelés l'importance et la vraie valeur des choses, ainsi qu'une théorie chère à un certain Monsieur Einstein, la Relativité. Je pense que cela nous permet de nous comprendre d'autant plus facilement. J'ai beaucoup appris au cours de ma thèse, à tous les niveaux, que ce soit lors de ton absence pour cas de force majeure, ou ce que tu m'as inculqué. Pour tout ce que tu m'as appris, pour la compréhension dont tu as fait preuve lorsque j'en ai eu besoin, pour ce que tu as géré en sous-marin, pour avoir toujours tenté de me canaliser (en me calmant ou en me remotivant), pour m'avoir laissé agir au labo avec ma philosophie de vie sans pression désastreuse, pour t'être battue pour moi pour que je finisse calmement ma thèse, et pour m'avoir permis de trouver un substitut au chômage, il n'y a qu'une formule : Grazie Mille Sophie...

Mon cher Gérard, Merci pour tous tes conseils, pour tes nombreux conseils et ton savoir encyclopédique en biochimie. Andrée est une Bible en biblio, toi en biochimie, et je l'ai bien vite noté ! ;) Mais je voudrais aussi te remercier pour les bons moments quotidiens à la cantine, pour les discussions foot, les cours de rugby, et les longues polémiques politico-sociologiques. Je suis fier d'avoir réussi mon vil complot pour te débaucher lors du dernier repas de Noël (Héhéhé). Merci Gigi !

Romé, Merci à toi, pour avoir su prendre le temps de t'occuper de moi lorsque j'en ai eu besoin, et d'avoir su faire en sorte que le labo tourne bien, humainement et scientifiquement, que ce soit pour les repas de Noël et les sorties d'été, ou pour la rigueur en Journal-Club et ton management d'équipe.



Merci à toute mon équipe, qui sur 5 ans, a compté de nombreux membres. Comment faire de la bio mol sans penser à Geneviève ou Chantal ? Merci à vous deux.

Thanks to THE ONE ! the special Stevie, that helps me to speak english. I hope that I didn't hurt too much your ears. Thank you for your patience and your help for experiments, English and Music.

Merci à tous les fous furieux de thésards et post-docs que j'ai croisé : mon cher Junior, mon cher Indi, mon cher Thibault, si t'existais pas, il faudrait t'inventer ! Ce que tu m'as fait rire, seul ou avec ton compère Fred, qui a bien de la patience...Courage Fred, lâche pas l'affaire. Caro, malgré les ultra-sons qui sortent de ta voix, on a fait un excellent partenariat, ma chère PFH, mais il va te falloir plus de reiatu pour tacher d'améliorer ta condition de pauvre et perfide Tom. Et je suis bien content de t'avoir attribué un point ! Merci encore à Eric, son aide, ses conseils, et son soutien contre Thibault. Mélissa, It was a real pleasure for me to share my bench with you, even if I didn't forget that you tried several times to steal my vital space of work! and I'm waiting for you to drink a new Guinness. Je veux aussi remercier dans le désordre Isabelle, qui m'a apporté son aide de nombreuses fois, Tiphaine pour les très bons moments passés durant ton stage, Perrine, Abdou, qui m'a lui aussi permis de prendre mes marques dans la recherche et l'organisation des manip, Tof et sa voix cristalline, Christophe et ses conseils informatiques et ses discussions pleines de bonnes anecdotes, ainsi que tous les autres, il y a eu beaucoup de monde en cinq ans.

Afin de réussir au labo, il faut se sentir bien chez soi. Et s'il faut remercier les personnes de notre quotidien professionnel, il est encore plus important de remercier son entourage. J'ai au cours de ma thèse été confronté à la fatigue à cause du labo, mais surtout, à cause d'un évènement douloureux, et c'est mon entourage qui m'a permis de traverser cette épreuve.

Et pour ça, comment ne pas remercier ma deuxième famille, les « Anciens » ? Si j'ai passé le cap de cette thèse avec le moins d'encombres possibles, vous n'y êtes pas pour rien. Entre nos matchs de ballon, ceux de l'OM, nos soirées, et votre soutien quand j'en ai eu besoin dans les moments difficiles, de Séville à Marseille, en passant par Rouen et Besançon, je vous remercie, et je n'ai pas besoin d'en dire plus, vous le savez déjà...



Le PFMTPQM, bandes de mecs calus, bourrus et trollesques... une thèse sans soirées comme les nôtres, c'est pas une bonne thèse. Vous avez été là pour moi, et vous êtes plus jobards que moi. Nos jeux (et vos fessées aux colons, héhé), nos pétanques, nos discussions politico-sportivo-informato-Hallienne : que ça continue le plus longtemps possible.

Il est impensable de ne pas remercier la Lune Noire. Mes potrolls, voir vos tronches au quotidien est un plaisir. Nos aventures communes sont mémorables (malgré les plans foireux de Schmu, les complexes de Dark, l'égo de La Gaule, le créole de Goum, les chaleurs explosives de TdG...). Un grand merci à vous pour tout ça et votre bonne humeur. Sans oublier de remercier le grand, le beau, le majestueux, le superbe ProfBuBulle ! et une mention spéciale à DM, qui fait des poissons d'avril chronophages (surtout en période de rédaction de thèse, c'est pas bien ça !), et qui a inventé le plus beau Hall qui soit.

Maman, Papa, Merci pour tout. Il n'y a aucune autre formule. C'est pour tout, que je dois vous remercier. Me laisser choisir ma voie, sans me contraindre à des choix que je n'aurais pas souhaité faire, me soutenir comme vous l'avez fait, Merci. C'est grâce à toi Papa, je pense, que j'ai toujours cherché à avoir les meilleurs résultats, et cela m'a bien servi. Et un énorme merci à toi Maman pour tout ce que tu as fait pour moi.

Merci ma chérie, de me supporter, de m'aider, de me soutenir et de m'avoir soutenu quand j'en ai eu besoin. C'est toujours agréable de pouvoir parler de ce qu'on fait et d'être compris ! Tu m'as aidé à passer cette thèse. Je n'ai pas besoin de t'en dire plus je pense, Merci infiniment.

Enfin, mon ami, mon meilleur ami, tu ne pourras pas être là pour ma soutenance, mais combien de fous rires, de moments inoubliables, de discussions interminables, d'histoires de fous on a partagé ? Il a été difficile (doux euphémisme) de me faire à l'idée qu'on écouterait plus du « John » ensemble, ou que finalement tu ne m'apprendras pas à jouer de la guitare, mais ma force de caractère, ma manière d'appréhender la vie, ce que je suis aujourd'hui a été grandement modelé et influencé par ta personne mon ami. Si j'ai réussi, c'est aussi grâce à toi, car lorsque je veux réussir, je pense à toi, et je tente moi aussi d'exceller dans ce que je fais, comme lorsqu'on était au lycée et qu'on essayait de se surpasser l'un l'autre. Je sais que t'aurais aimé que je t'explique ma thèse... elle t'est dédiée mon ami.



*A toi Tout...*



# *SOMMAIRE*



Remerciements

Citations

**SOMMAIRE**

Sommaire 1

**INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**

Avant-propos 7

**I. Qui est *Pseudomonas aeruginosa*..... 10****I.1. Généralités..... 10****I.1.1. Un peu d'Histoire..... 10****I.1.2. Un pathogène opportuniste..... 10****I.2. Plasticité génomique ..... 12****I.2.1. Structures et diversités des génomes des différentes souches..... 12****I.2.2. Ilots génomiques ..... 13****I.2.3. Mutations adaptatives ..... 14****I.3. Une virulence multifactorielle ..... 15****I.3.1. Généralités..... 15****I.3.2. Le biofilm..... 16****I.3.3. Appendices et substances extracellulaires 17**

I.3.3.1. Le lipopolysaccharide 17

I.3.3.2. Les exopolysaccharides 18

I.3.3.2.1. L'aliginate 18

I.3.3.2.2. Les Pel 19

I.3.3.2.3. Les Psl 19

I.3.3.3. Le flagelle 19

I.3.3.4. Les *pili* de type IV 21

I.3.3.5. Les adhésines 22

**I.3.4. Les systèmes de sécrétion ..... 22****I.3.5. Toxines/enzymes dégradatives sécrétées ..... 24**

I.3.5.1. La protéase alcaline 24



I.3.5.2. Quelques substrats du Système de Sécrétion du Type II (SST2)	24
I.3.5.2.1. L'exotoxine A	24
I.3.5.2.2. Les élastases	25
I.3.5.2.3. Les phospholipases C	25
I.3.5.3. Les exoenzymes du Système de Sécrétion du Type III (SST3)	26
I.3.5.3.1. ExoS et ExoT	26
I.3.5.3.2. ExoY	26
I.3.5.3.3. ExoU	27
I.3.5.4. Autres Facteurs	28
<b>I.4. Adaptabilité/régulation</b>	<b>28</b>
<b>I.4.1. Le <i>Quorum Sensing</i></b>	<b>29</b>
<b>I.4.2. Les systèmes de régulation à deux composants</b>	<b>30</b>
I.4.2.1. Le système GacS/GacA/RsmAZY	31
I.4.2.2. Le senseur RetS	32
I.4.2.3. Le senseur LadS	32

## II. Que sont les patatines et les Patatin-like proteins (PLPs) ? . . 34

<b>II.1. Les patatines</b>	<b>34</b>
<b>II.1.1. Définition</b>	<b>34</b>
<b>II.1.2. Activité</b>	<b>35</b>
<b>II.1.3. Rôle dans la réponse aux stress et infections</b>	<b>36</b>
<b>II.2. Les PLPs eucaryotes</b>	<b>37</b>
<b>II.2.1. Les PLPs humaines</b>	<b>37</b>
<b>II.2.2. La phospholipase A<sub>2</sub> cytosolique humaine (cPLA<sub>2</sub>)</b>	<b>38</b>
<b>II.2.3. Un exemple chez les parasites</b>	<b>39</b>
<b>II.3. Les PLPs bactériennes</b>	<b>39</b>
<b>II.3.1. Définition/représentation</b>	<b>39</b>
<b>II.3.2. ExoU de <i>P. aeruginosa</i></b>	<b>41</b>
II.3.2.1. Organisation et description	41
II.3.2.2. Activité	42
II.3.2.3. Cofacteur	44
II.3.2.4. Cytotoxicité	46
II.3.2.4.1. Une histoire de membranes	46
II.3.2.4.2. Production d'un stress oxydant	48
II.3.2.4.3. Promotion de la réponse inflammatoire	50
<b>II.3.3. VipD de <i>L. pneumophila</i></b>	<b>50</b>
<b>II.3.4. MXAN_3852 de <i>M. xanthus</i></b>	<b>52</b>



<b>III. Le Système de Sécrétion de Type V (SST5) .....</b>	<b>53</b>
<b>III.1. Définition .....</b>	<b>53</b>
<b>III.2. Architecture .....</b>	<b>54</b>
<b>III.2.1. Les Autotransporteurs (ATs ou SST5a) .....</b>	<b>54</b>
III.2.1.1. Le domaine passager	55
III.2.1.1.1. Une structure quasi universelle...	55
III.2.1.1.2. ... qui autorise une grande variabilité	56
III.2.1.2. Le domaine transporteur	57
III.2.1.3. Distribution/évolution	58
III.2.1.4. Curiosité : l'intimine	59
<b>III.2.2. Les Autotransporteurs trimériques (TAAs ou SST5c) .....</b>	<b>59</b>
III.2.2.1. L' « ancre »	60
III.2.2.2. La « tige »	60
III.2.2.3. Le « cou »	61
III.2.2.4. La « tête »	61
III.2.2.5. Des Autotransporteurs dédiés	62
<b>III.2.3. Les « Two-Partners Secretion » (TPS ou SST5b) .....</b>	<b>63</b>
III.2.3.1. Le TpsA	64
III.2.3.1.1. Le domaine TPS	64
III.2.3.1.2. Le domaine transporté	66
III.2.3.2. Le TpsB	67
III.2.3.2.1. Le domaine POTRA	67
III.2.3.2.1.1. Chez les protéines de type BamA	68
III.2.3.2.1.2. Chez les TpsB	69
III.2.3.2.2. Le domaine $\beta$ de FhaC	69
<b>III.3. Mécanisme de sécrétion .....</b>	<b>70</b>
<b>III.3.1. La translocation à travers la membrane interne .....</b>	<b>71</b>
III.3.1.1. Les longs peptides signaux	71
III.3.1.2. Les peptides signaux des lipoprotéines	73
<b>III.3.2. Un intermédiaire périplasmique ? .....</b>	<b>73</b>
III.3.2.1. Couplage des translocations ?	73
III.3.2.2. Repliement pré-, co- ou post-sécrétionnel ?	74
<b>III.3.3. La translocation à travers la membrane externe .....</b>	<b>77</b>
III.3.3.1. Le modèle classique	77
III.3.3.2. Le modèle oligomérique	78
III.3.3.3. Les modèles « threading » et « hairpin »	79
III.3.3.4. Le modèle BamA	80
III.3.3.5. Chez les TPS	83
III.3.3.6. Sécrétion vectorielle	84
III.3.3.7. Conclusions	85



<b>III.3.4. Maturation</b> .....	86
III.3.4.1. Clivage du domaine passager des ATs .....	86
III.3.4.2. Clivage du TpsA .....	87
<b>III.4. Chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	<b>88</b>
<b>III.4.1. Les ATs</b> .....	89
III.4.1.1. PA0328 .....	89
III.4.1.2. PA3535 .....	89
III.4.1.3. EstA .....	89
<b>III.4.2. Les TPS</b> .....	90
III.4.2.1. LepA/LepB .....	91
III.4.2.2. CdrA/CdrB .....	91
III.4.2.3. Cas particulier : le P-Usher .....	92
<b>III.4.3. Conclusions</b> .....	93

## *RESULTATS & DISCUSSION*

---

Avant-propos .....	94
--------------------	----

### **I. Etude et Caractérisation de PlpD : Découverte d'une Nouvelle Branche du Système de Sécrétion de Type V .....**

<b>I.1. Introduction</b> .....	<b>95</b>
<b>I.2. Résumé des principaux résultats</b> .....	<b>96</b>
I.2.1. PlpD est une patatin-like protein... ..	96
I.2.2. ... qui possède une organisation modulaire originale .....	97
I.2.3. PlpD est produite sous forme entière chez <i>E. coli</i> .....	98
I.2.4. PlpD est sécrétée par le SST5d chez <i>P. aeruginosa</i> .....	99
I.2.5. Son clivage fait intervenir une protéase inconnue .....	101
I.2.6. PlpD est une lipase .....	101
I.2.7. Le SST5d : un système dédié ? .....	101
<b>I.3. Caractérisation du domaine transporteur de PlpD</b> .....	<b>102</b>
I.3.1. Structure .....	102
I.3.2. Un rôle chaperon ? .....	104



<b>I.4. Discussion .....</b>	<b>104</b>
I.4.1. PlpD est sécrétée par un système original : le SST5d.....	104
I.4.2. Son domaine POTRA assurerait un rôle de chaperon intramoléculaire ..	106
I.4.3. PlpD est une lipase, mais elle ne nécessite pas de cofacteur .....	108
I.4.4. Une forte représentation dans certaines niches précises .....	109

**Article : « The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein PlpD is the archetype of a novel Type V Secretion System »**

## **II. Caractérisation de trois autres PLPs de la souche PAO1 de *P. aeruginosa* : PlpA, PlpB et PlpC ..... 110**

<b>II.1. Trois autres PLPs.....</b>	<b>110</b>
-------------------------------------	------------

<b>II.2. Production chez <i>E. coli</i> .....</b>	<b>111</b>
---	------------

<b>II.3. Production et sécrétion chez <i>P. aeruginosa</i>.....</b>	<b>112</b>
---	------------

II.3.1. PlpA <sub>V5/6His</sub> est une protéine sécrétée .....	112
II.3.1.1. Dans la souche sauvage PAO1 .....	112
II.3.1.2. Dans une souche mutante pour le SST1 .....	113
II.3.1.3. Dans une souche mutante pour le SST3 .....	113
II.3.1.4. Dans une souche mutante pour le système de sécrétion flagellaire .....	115
II.3.1.5. Production et sécrétion de PlpA en conditions physiologiques .....	116
II.3.1.6. Conclusions sur la sécrétion de PlpA .....	117
II.3.2. PlpB et PlpC .....	119
II.3.3. Discussion générale sur la sécrétion des PLPs .....	119

<b>II.4. PlpA jouerait un rôle inattendu .....</b>	<b>120</b>
--	------------

II.4.1. PlpA entraîne une meilleure survie cellulaire.....	120
II.4.2. L'activité patatine serait responsable de cet effet.....	123
II.4.3. Discussion : PlpA, une « cytoprotectine » ? une « retardine » ? .....	123

## **III. Les Systèmes de Sécrétion chez *Pseudomonas aeruginosa* ...126**

**Revue : « Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons »**



## *CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES*

---

<b>I. Conclusions générales.....</b>	<b>127</b>
<b>II. PlpD.....</b>	<b>127</b>
<b>III. PlpA .....</b>	<b>132</b>
<b>IV. PlpB &amp; PlpC .....</b>	<b>134</b>

## *MATERIEL ET METHODES*

---

<b>I. Souches bactériennes, plasmides et conditions de croissance..</b>	<b>135</b>
<b>II. Techniques de biologie moléculaire.....</b>	<b>135</b>
<b>III. Techniques de biochimie .....</b>	<b>138</b>
<b>IV. Techniques de biologie cellulaire.....</b>	<b>140</b>
<b>V. Techniques bioinformatiques .....</b>	<b>141</b>
Glossaire	142

## *REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

---



# *INTRODUCTION*



# Avant-Propos

---

Je me souviens d'un jour, je devais avoir 6 ou 7 ans et j'avais dit à ma mère que j'en avais marre d'aller à l'école. Elle m'avait répondu qu'il valait mieux pour moi que je m'y habitue, car si je faisais de longues études, pour être docteur par exemple, je pouvais en avoir pour encore un bout de temps. J'avais répondu que je ne voulais pas être docteur...

J'étais évidemment à des années-lumière de me douter que 20 ans plus tard, je serais toujours à « l'école », enfin toujours étudiant, et sur le point d'être docteur. Mais j'avais au moins vu juste sur un point, je ne serai pas médecin !

Je suis arrivé en thèse de Microbiologie un peu par accident, un peu par hasard, et un peu par nécessité.

Un peu par accident car initialement, j'avais fait une erreur d'orientation. Je voulais étudier la Biologie Moléculaire, ce que j'ai confondu à l'époque avec de la Biochimie. Il n'y avait pas de DEUG de Biochimie... il y en avait un en Chimie... je me suis donc dit que c'était l'une des voies normales pour faire une licence en Biochimie. J'ai donc fait de la Physique-Chimie (avec une grosse dose de Mathématiques).

Un peu par hasard parce qu'une fois la licence de Biochimie et la Maîtrise de « Bioinformatique, Biochimie Structurale et Génomique » obtenues, il se trouve que le Master recherche « Microbiologie » était une des suites possibles (en prenant encore une fois une bifurcation, mais je commençais à être habitué).

Un peu par nécessité car je n'étais plus intéressé par les débouchés offerts par mon choix initial (Master professionnel en Génomique) et je devais donc absolument trouver quelque chose d'autre à faire.

Vu que j'avais eu des bonnes notes dans mes options de Microbiologie, j'ai contacté deux de mes enseignantes (Andrée Lazdunski et Sophie Bleves) pour discuter études, recherche, et carrière. Ce jour-là, Sophie m'a présenté le sujet de stage de M2 qu'elle venait de boucler. Initialement, je n'ai rien compris du tout à ce sujet. Mais je devais prendre une décision. Les bonnes conditions de travail dans ce laboratoire, une visibilité internationale, parler anglais avec des non-francophones, le très bon feeling avec Sophie sont autant



d'éléments qui m'ont poussé à choisir de faire un master et une thèse en Microbiologie ici. Un autre facteur déterminant a été que ce sujet s'intéressait à une bactérie pathogène (certes opportuniste), et en particulier sur sa pathogénicité, puisqu'il portait sur l'étude de protéines qui étaient potentiellement des facteurs de virulence. J'avais conscience déjà à l'époque de l'intérêt de la recherche fondamentale, mais pour des raisons personnelles, je préférais mener des recherches sur un sujet qui pouvait avoir une incidence sur la santé. Peu importait le sujet, tant qu'il me semblait être utile.

J'ai donc commencé l'étude des « patatin-like proteins », ou PLP, ou plus familièrement, les patatines. Elles nous ont valu bien des sourires, le summum étant pour Sophie, qui apprit lors d'un congrès que les Italiens emploient familièrement le mot « patatine » comme nom doux pour leur compagnon ou leur compagne.

L'idée de ce projet était, outre de faire abstraction du nom de ces protéines, de rechercher de nouveaux facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie pathogène opportuniste représentant un problème de santé publique majeur : principale cause de décès des patients atteints de mucoviscidose, troisième cause de maladies nosocomiales, multirésistance aux antibiotiques, une énorme capacité d'adaptation... Puisque *P. aeruginosa* est capable d'interagir avec l'hôte, elle possède notamment des protéines qui portent des motifs eucaryotes. C'est donc en se basant sur ce postulat que le laboratoire s'est mis à la recherche de telles protéines. C'est ainsi que notre attention s'est portée sur ExoU, l'une des plus puissantes cytotoxines produite par cette bactérie. Elle est effectivement une protéine à motifs eucaryotes, puisqu'elle porte des motifs de type « patatine ». Les patatines sont des phospholipases de végétaux identifiées chez la pomme de terre. ExoU est bien un facteur de virulence puisque la cytotoxicité des souches de *P. aeruginosa* est corrélée avec la production ou non de cette protéine. Ainsi, la souche PA103 qui produit ExoU est beaucoup plus virulente que la souche d'étude PAO1, qui ne la produit pas. Ce constat a donc été le point de départ du sujet : chercher d'éventuels homologues d'ExoU dans le protéome de cette souche, et les étudier.

Nous sommes donc partis de la séquence de protéines putatives, pour essayer d'en tirer un maximum d'informations par des recherches bioinformatiques. Dans cette étape de recherche, mes connaissances acquises en maîtrise m'ont permis d'analyser la séquence de ces protéines, de faire des prédictions de structures, de générer et manipuler des modèles structuraux tridimensionnels.



La sécrétion de protéines étant le fond de commerce de notre laboratoire depuis plus de vingt ans, du point de vue expérimental, notre leitmotiv, notre fil conducteur a toujours été : est-ce que ces protéines sont sécrétées ? Par quel système de sécrétion ? Comment ? Nous avons bien évidemment essayé de répondre à ces questions.

Au gré des avancées dans la construction des mutants et autres outils biologiques, nous avons également eu la possibilité de tester l'éventuel effet que pouvait avoir l'une de ces protéines sur des lignées cellulaires.

Ce manuscrit est donc la présentation de ces résultats. Je les ai obtenus au « Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires » (LISM), sous la direction de Sophie Bleves, dans l'équipe travaillant sur la sécrétion et la régulation de *P. aeruginosa*, dirigée par Alain Filloux, puis par Romé Voulhoux. Afin de mieux appréhender ces résultats, j'ai choisi de présenter certaines notions dans l'introduction, que j'ai organisées en trois chapitres:

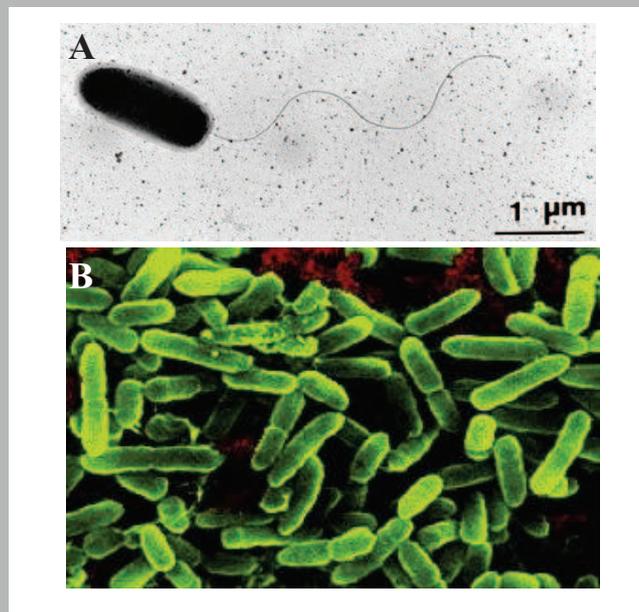
- le premier concerne logiquement une présentation générale et non exhaustive de la bactérie *P. aeruginosa*.
- le deuxième est destiné à la présentation détaillée des protéines de la famille des patatines, à laquelle les protéines que j'ai étudiées appartiennent.
- enfin, nos travaux sur la sécrétion de ces protéines nous ont conduits à nous intéresser plus particulièrement au Système de Sécrétion de Type V. Le troisième chapitre de l'introduction est donc consacré à la présentation de l'ensemble des connaissances actuelles concernant ce système.



- Figure 1 -

Découverte de *Pseudomonas aeruginosa*

- (A) Carle Gessard, pharmacien et bactériologiste français (1850-1925)
- (B) La sécrétion de la pyocyanine donne à *P. aeruginosa* sa couleur particulière.



- Figure 2 -

Observations microscopiques de *P. aeruginosa*

- (A) Bactérie isolée, et son flagelle unique (microscope électronique à transmission).
- (B) Formation d'un biofilm par *P. aeruginosa* sur une surface abiotique (microscope électronique à balayage).

# I. Qui est *Pseudomonas aeruginosa* ?

---

Le but de ce chapitre est de présenter la bactérie « avec laquelle j'ai passé près de 5 ans » (master puis thèse). Il ne s'agit pas ici de faire une présentation encyclopédique et exhaustive de tout ce qui se rapporte à *Pseudomonas aeruginosa*, mais plutôt de présenter brièvement des informations concernant des acteurs importants dans les modes de vie et la pathogénicité de cette bactérie.

Il s'agit surtout d'aborder des points sur lesquels je n'ai pas travaillé directement, mais qui faisaient partie de mon quotidien en étant les thématiques des autres membres de mon équipe. Une sorte de pense-bête pour me souvenir plus tard du Quorum-Sensing ou d'un biofilm !

## I.1. Généralités

### I.1.1. Un peu d'Histoire

*Pseudomonas aeruginosa* a été décrit pour la première fois en 1882 par Carle Gessard (Fig.1A) sous le nom de « bacille pyocyanique ». Le nom de genre est composé du grec « *pseudo* » (imitation) et « *monas* » (unité), « *aeruginosa* » signifie vert-de-gris en latin et se réfère aux pigments que sécrète la bactérie (Fig.1B). *P. aeruginosa* appartient à la famille des *Pseudomonadaceae* et à la classe des  $\gamma$ -protéobactéries. Ce bacille à Gram négatif et à flagelle unique mesure en moyenne 2  $\mu\text{m}$  de long pour un diamètre de 0,6  $\mu\text{m}$  (Fig.2A). C'est une bactérie mésophile, aérobie stricte, qui possède néanmoins tous les systèmes nécessaires à la respiration anaérobie. Cette bactérie est ubiquitaire et vit comme saprophyte dans l'eau douce, la mer, les sols humides et à la surface de très nombreux végétaux. On la retrouve fréquemment à l'état commensal dans l'appareil digestif de l'animal ou de l'homme sain et plus rarement au niveau cutané ou au niveau des muqueuses.

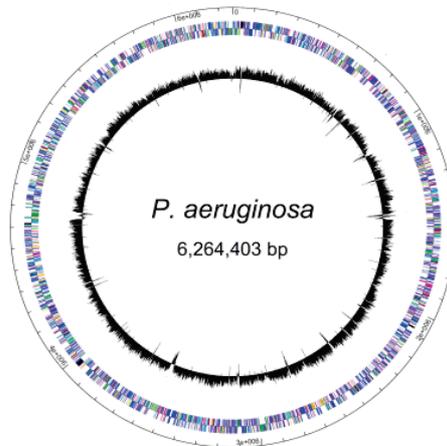
### I.1.2. Un pathogène opportuniste

Si *P. aeruginosa* n'est pas virulent chez les individus sains, c'est en revanche un pathogène opportuniste majeur chez les sujets immunodéprimés, les malades intubés-ventilés



des services de réanimation ou ceux souffrant d'affections chroniques comme la mucoviscidose. Il est responsable d'infections sur un nombre extrêmement variable de sites (œil, oreille, plaie, brûlure, vessie, méninges, appareils pulmonaire et digestif). On observe aussi de rares cas de septicémies. Actuellement, *P. aeruginosa* se classe, en France, au troisième rang des bactéries responsables d'infections nosocomiales après *Staphylococcus aureus* et les pathotypes d'*Escherichia coli*, mais au premier rang dans le cas d'infections nosocomiales pulmonaires. D'autre part, plus de 80% des patients atteints de mucoviscidose sont colonisés dès leur plus jeune âge au niveau bronchique par cette bactérie. La combinaison d'une réponse inflammatoire chronique importante et de la destruction du tissu pulmonaire entraîne la mort précoce de ces patients.

Les contaminations par *P. aeruginosa* sont multiples et faciles. L'origine de l'infection à *P. aeruginosa* peut être endogène (le malade est porteur de façon asymptomatique puis s'auto-infecte), ou exogène (les bactéries peuvent alors provenir des malades comme du personnel soignant). La transmission de *P. aeruginosa* aux patients à partir d'une source extérieure intervient le plus souvent par les végétaux (fleurs coupées, fruits, légumes crus...) qui peuvent être de simples vecteurs ou être eux-mêmes des cibles de l'infection. Ainsi, *P. aeruginosa* est responsable de la pourriture de *Lactuca sativa*, la laitue, ou d'*Arabidopsis thaliana*, l'arabette des dames sauvage. Le risque de contamination est augmenté par la capacité de cette bactérie à survivre dans de nombreuses niches écologiques (eaux stagnantes par exemple) et à former des structures multicellulaires, appelées biofilms (voir § I.3.2) (Fig.2B). Il s'agit de communautés de microorganismes agrégés en microcolonies, adhérant sur une surface inerte ou biologique et englobées dans une matrice autoproduite d'exopolysaccharides (EPS). Ces biofilms sont extrêmement résistants et transforment tout milieu humide en source de microorganismes. C'est ainsi que les vases de fleurs, les seaux, les lavabos, les toilettes, les douches, les humidificateurs peuvent par exemple devenir des réservoirs capables de contaminer les malades soit directement *via* des aérosols soit indirectement *via* un vecteur qu'ils contaminent (mains, savons, éponges, respirateurs artificiels). La capacité de cette bactérie à adhérer aux supports abiotiques (tel le plastique ou le verre) implique que les prothèses et les appareils médicaux utilisés au cours de soins invasifs constituent une autre source d'infection.

**A****B**

Fonction	nombre de gènes	Pourcentage
Adaptation, protection	60	1,1
Métabolisme et biosynthèse des AA	150	2,7
Résistance et susceptibilité aux antibiotiques	19	0,3
Biosynthèse de cofacteurs	119	2,1
Métabolisme des composés carbonés	130	2,3
Division cellulaire	26	0,5
Membrane/LPS/capsule	83	1,5
Métabolisme central	64	1,1
Chaperonnes & protéines du heat shock	52	0,9
Chimiotactisme	43	0,8
Réplication, recombinaison, réparation de l'ADN	81	1,5
Métabolisme énergétique	166	3
Métabolisme des acides gras et des phospholipides	56	1
Mobilité et adhérence	65	1,2
Métabolisme et biosynthèse des nucléotides	60	1,1
Appareils de sécrétion/export	83	1,5
Enzymes putatives	409	7,3
Phage, transposon, ou plasmide	38	0,7
Facteurs sécrétés (toxines, enzymes, alginate)	58	1
Transcription, dégradation de l'ARN	45	0,8
Régulateurs transcriptionnels	403	7,2
Modification post-transcriptionnelle, dégradation Tr	149	2,7
Transport de petites molécules	555	10
Systèmes à deux composants	118	2,1
Fonction hypothétique	1774	31,8
Fonction inconnue conservée mais dans d'autres organismes	757	13,6
<b>Total</b>	<b>5570</b>	<b>100</b>

- Figure 3 -

Le génome de la souche PAO1 de *P. aeruginosa*

(A) Représentation circulaire du génome de la souche PAO1.

(B) Classification fonctionnelle des gènes de la souche PAO1

(d'après Stover et al., 2000)

Plus anecdotique, la bactérie peut aussi être responsable de corrosion microbienne dans le diesel et le carburant d'aviation car elle est capable d'utiliser les hydrocarbures comme source carbonée pour sa croissance.

Si *P. aeruginosa* est un pathogène redoutable, c'est tout d'abord en raison de sa résistance naturelle à de très nombreux antibiotiques. Cette caractéristique est due non seulement à la faible perméabilité de sa membrane externe (ME) mais aussi à l'existence d'un grand nombre de pompes d'efflux capables de relarguer les molécules toxiques dans le milieu environnant (Benz & Hancock, 1981).

La taille de son génome (environ 6 à 7 Mb selon les isolats) code un arsenal important de facteurs de virulence, de systèmes de régulation. Il possède une grande plasticité, et il est certainement responsable de l'adaptabilité de *P. aeruginosa*.

## **I.2. Plasticité génomique**

### I.2.1. Structures et diversités des génomes des différentes souches

Depuis longtemps, il est admis que la très grande versatilité de *P. aeruginosa* est due à l'importance de son génome, ce qui a été confirmé pour le séquençage de la souche PAO1 en 2000 (Fig.3A). Cette souche modèle d'étude (utilisée dans la majorité des laboratoires) présente un chromosome unique d'environ 6,3 Mb portant 5570 cadres de lectures putatifs ou ORFs (Open ReadinG Frame) (Fig.3B), ce qui le rapproche des eucaryotes simples tels que la levure *Saccharomyces cerevisiae* dont le génome code 6200 protéines (Stover *et al.*, 2000). Depuis, le séquençage d'autres souches de *P. aeruginosa*, qu'il soit achevé comme celui des souches PA14 (Lee *et al.*, 2006a), PA7 (Roy *et al.*, 2010), LESB58 (Winstanley *et al.*, 2009), PA2192 et C3719 (Mathee *et al.*, 2008) ou encore en phase d'assemblage comme ceux des souches PACS2, OPPA8, PKS6, a permis de mettre en évidence des parties variables spécifiques de certaines souches, qualifiées de pangénome par rapport au génome core. Les génomes annotés de quatre souches (PAO1, PA14, PA7, et LESB58) sont disponibles sur le site <http://www.pseudomonas.com>.



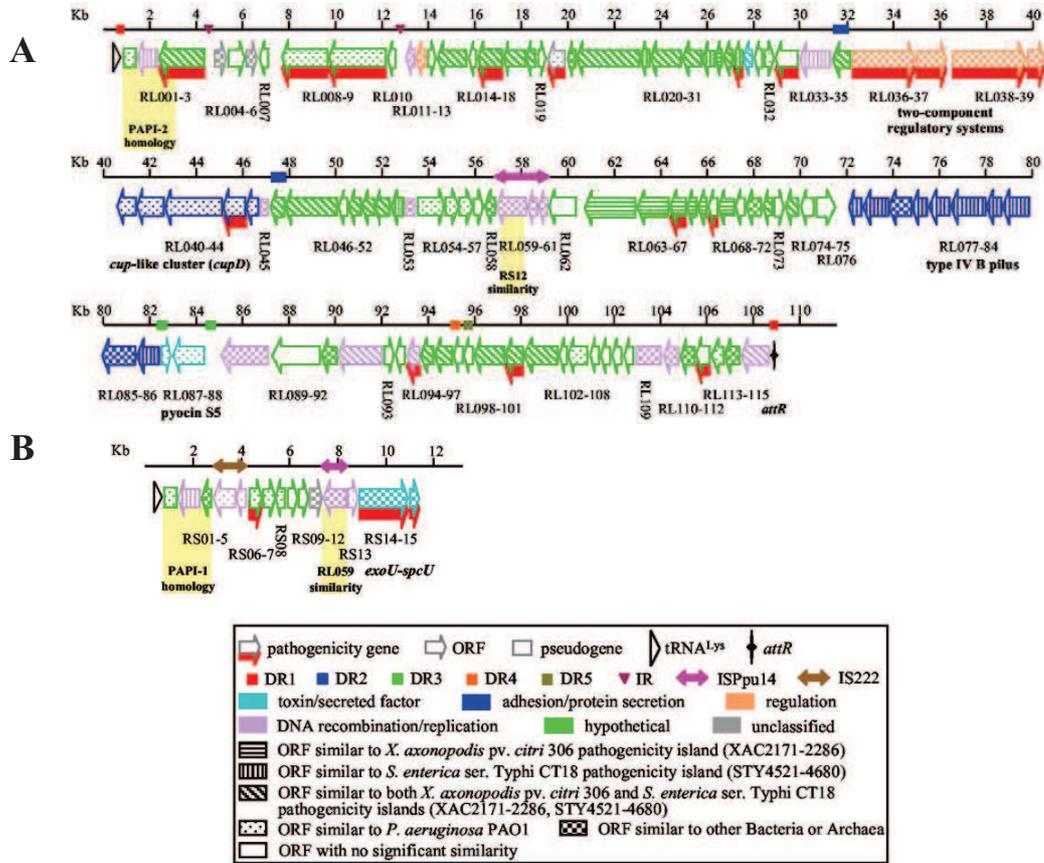
La génomique comparative de ces différentes souches a révélé que le génome est globalement conservé avec une taille variant de 6 à 7 Mb et environ 5500 ORFs. On retrouve dans toutes les souches un squelette commun hautement conservé qui représente 90 % du génome (le génome core). Au sein de ce squelette, la divergence de séquence n'est que de 0,5% soit 1 nucléotide sur 200. Ce squelette est tout de même dynamique car l'agencement des gènes peut être largement modifié. Il existe aussi des pertes de gènes par délétion ou des pertes d'expression *via* des mutations ponctuelles comme par exemple pour les gènes de biosynthèse de la pyoverdine et de l'antigène O, ou le gène codant ExoU, un effecteur du système de sécrétion de type III (SST3) qui nous intéressera particulièrement par la suite (Mathee *et al.*, 2008; Spencer *et al.*, 2003; Wolfgang *et al.*, 2003).

La souche PA14, qui est l'isolat clinique le plus souvent retrouvé dans divers habitats (Wiehlmann *et al.*, 2007), possède 230 ORFs supplémentaires par rapport à la souche PAO1. La souche C3719 (souche épidémique de Manchester) est associée à une haute virulence et transmissibilité. Elle a été isolée d'un patient atteint de mucoviscidose ou « Cystic Fibrosis » (CF) chroniquement infecté, tout comme la souche PA2192. Cet isolat prélevé sur un patient de Boston, possède la plupart des caractéristiques des souches cliniques CF (mucoïdes), production de lipopolysaccharides (LPS) dépourvu de chaînes O et une absence de mobilité (Mathee *et al.*, 2008). La souche LESB58 (Liverpool Epidemic Strain) qui a aussi été prélevée chez un patient CF, a été isolée en 1988 à Liverpool. Elle est hautement transmissible entre les malades et même de malades à individus sains (Cheng *et al.*, 1996).

### I.2.2. Îlots génomiques

En plus d'un squelette commun du génome, il existe une partie flexible, le pangénome, qui représente environ 10% du génome. Il comprend un certain nombre de gènes supplémentaires regroupés en une vingtaine de régions instables acquises par transfert horizontal. Ces régions sont appelées îlots génomiques. Lorsque ces régions codent des facteurs de virulence, on leur donne le nom d'îlots de pathogénicité.

L'îlot PAGI-1 (Liang *et al.*, 2001), provient de la souche X24509, isolée au cours d'une infection urinaire. PAGI-2 et PAGI-3 (Larbig *et al.*, 2002), PAGI-4 (Klockgether *et al.*, 2004), et pKLC102 (Klockgether *et al.*, 2004) ne sont présents que dans certains groupes clonaux de *P. aeruginosa*. Les îlots LESGI-1 à LESGI-5 sont présents dans la souche épidémique LESB58 (Winstanley *et al.*, 2009).

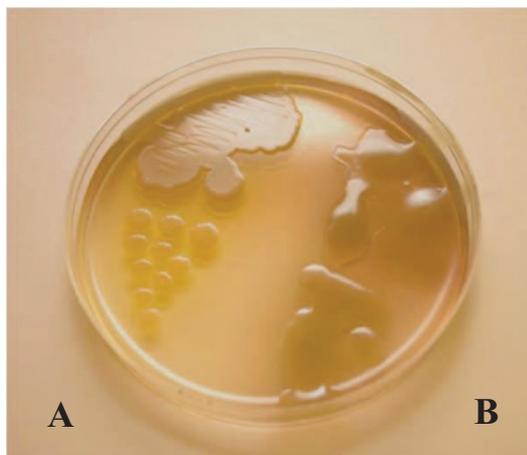


- Figure 4 -

Îlots de pathogénicité de la souche PA14 de *P. aeruginosa*

(A) Îlot de pathogénicité PAPI-1. (B) Îlot de pathogénicité PAPI-2.

(D'après He et al., 2004)



- Figure 5 -

La mucoïdie

Isolement sur une boîte de Pétri d'une souche de *P. aeruginosa* non mucoïde (A) et mucoïde (B).

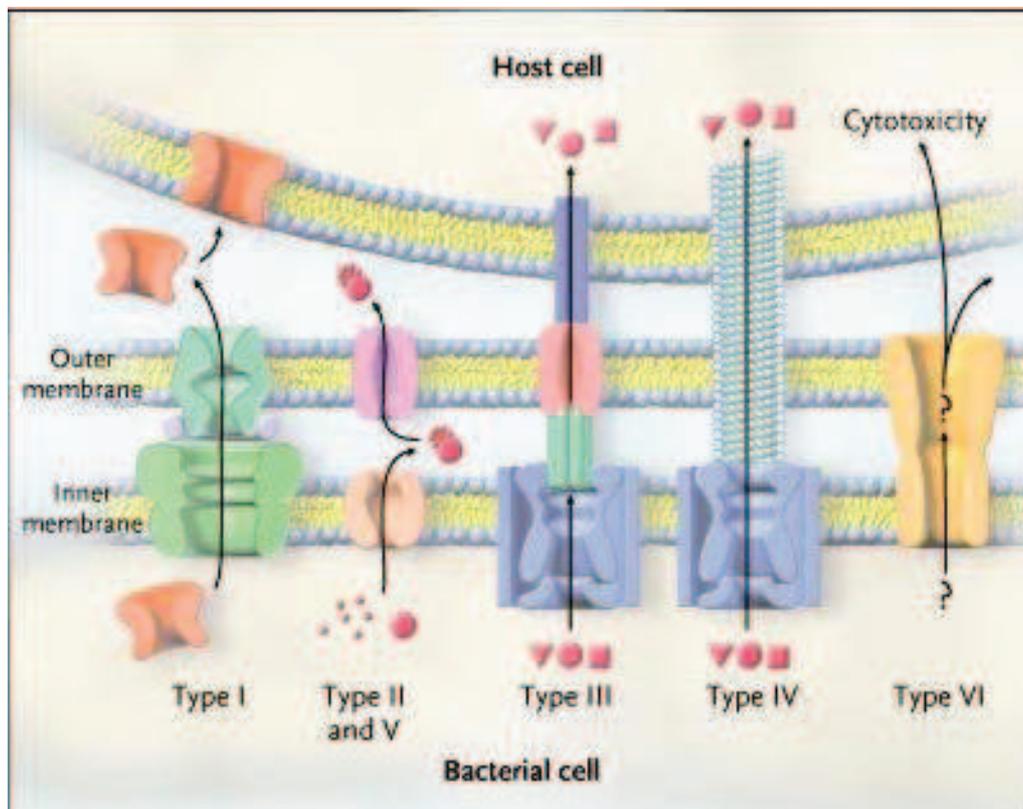
(D'après Ramsey & Wozniak., 2005)

Ces îlots génomiques sont un moyen pour la bactérie d'acquérir rapidement de nouveaux mécanismes pour répondre à la pression de sélection. C'est le cas de l'îlot de pathogénicité PAPI-1 de la souche PA14 (108 kb) qui porte un certain nombre de gènes de régulation dont le gène *pvrR* qui code un régulateur de réponse contrôlant le développement du biofilm et la résistance aux antibiotiques, les gènes *cupD* de la voie Chaperonne-Usher et un cluster de gènes codant un système de piliation de type IVb (He *et al.*, 2004; Qiu *et al.*, 2006) (Fig.4A). La souche PA14 possède un deuxième îlot de pathogénicité, PAPI-2, qui porte entre autre le gène *exoU* codant ExoU, un effecteur du SST3, (He *et al.*, 2004) (Fig.4B). La souche PAK possède un îlot additionnel de 14 gènes codant la machinerie de glycosylation de la flagelline FliC du flagelle (Arora *et al.*, 2001). Il semble que les gènes portés par les îlots de pathogénicité permettent à la bactérie de répondre au défi environnemental en dupliquant très souvent des groupes de gènes déjà présents sur le squelette du génome (*cupD*), en modifiant la régulation de certains gènes (*pvrR*) ou le mécanisme d'une machinerie déjà présente (*exoU* ou la glycosylation de FliC).

*P. aeruginosa* est capable d'acquérir des mécanismes de résistance face aux agressions de l'environnement (milieu naturel, bactéries en compétition, défenses de l'hôte ou antibiotiques) que ce soit par la modification des sites d'action des molécules anti-infectieuses ou par la production d'enzymes dégradatives. Mais dans la majorité des cas, cette réponse adaptative de *P. aeruginosa* n'est pas une adaptation génétique stable mais une adaptation transitoire qui repose sur différents systèmes de régulations.

### I.2.3. Mutations adaptatives

*P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste redoutable en raison de ses nombreux facteurs de virulence (présents en général sur les îlots de pathogénicité), sa capacité à former des biofilms, et sa grande résistance aux antibiotiques. L'abondance des souches polyrésistantes aux antibiotiques peut s'expliquer par la fréquence élevée de lysogénie (intégration stable sur le chromosome bactérien d'ADN d'origine phagique) de *P. aeruginosa*. Elle peut aussi s'expliquer par un fort taux de mutations adaptatives que certaines souches acquièrent quand elles sont soumises à des conditions sélectives fortes (Hogardt *et al.*, 2006; Macia *et al.*, 2005). Un exemple assez classique de mutations adaptatives dues à une pression sélective est la conversion d'un phénotype non-mucoïde (pas de production d'alginate, un EPS visqueux) en un phénotype mucoïde (production abondante d'alginate), caractéristique



- Figure 6 -

Schéma des six systèmes de sécrétion connus chez les bactéries à Gram négatif.

(D'après Yahr, 2006)

de l'infection chronique des poumons chez les patients souffrant de mucoviscidose (Fig.5). Les bases moléculaires de cette conversion reposent sur la mutation du gène *muca* qui code un facteur anti-sigma. Cette mutation résulte en une libération du facteur sigma associé, AlgT, qui induit alors de façon constitutive l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'alginate (Martin *et al.*, 1993).

Des recherches plus récentes ont également montré que l'hyper-mutabilité (conséquence d'une mutation dans le gène *mutS* notamment) semble être un facteur clé dans l'adaptation bactérienne pour une persistance à long terme (Oliver *et al.*, 2000).

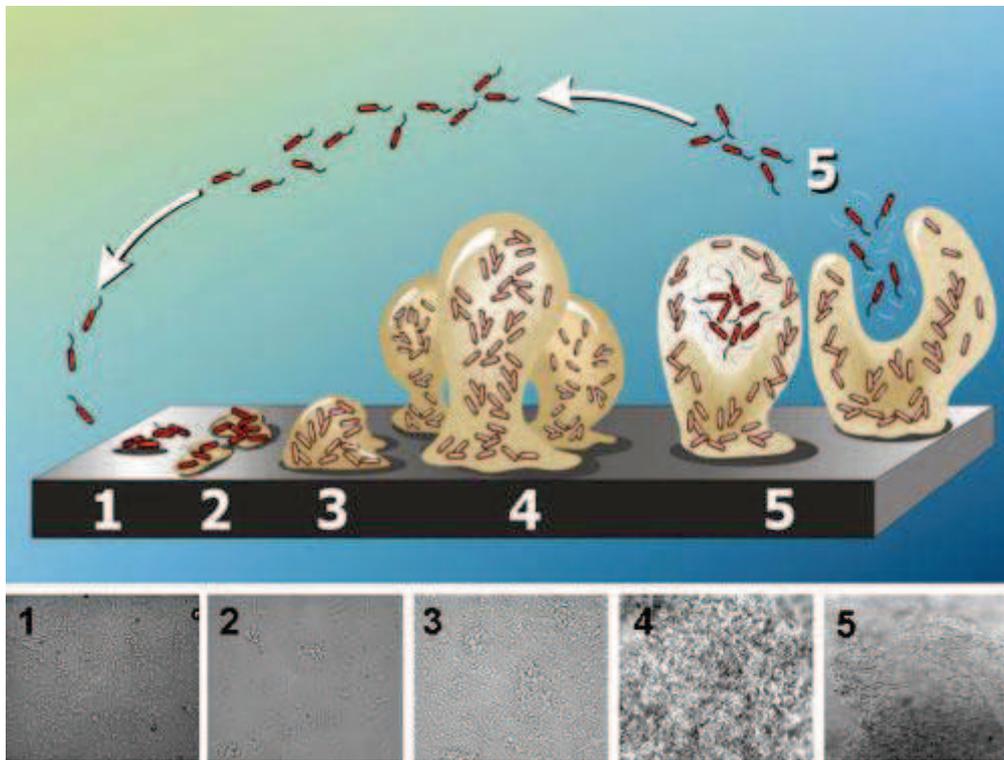
### **I.3. Une virulence multifactorielle**

#### **I.3.1. Généralités**

La virulence de *P. aeruginosa* repose sur sa capacité à évoluer génétiquement (par mutations ou par acquisition/délétion d'îlots de pathogénicité), sur son adaptabilité à l'environnement (voir § I.4), mais aussi et surtout sur son arsenal « militaire » ! Cette bactérie possède en effet toute une batterie de facteurs de virulence et de stratégies visant à développer sa pathogénicité. Elle est tout d'abord responsable de deux types d'infections, l'infection aiguë qui est caractérisée par la sécrétion de nombreux facteurs de virulence (notamment les effecteurs du SST3), et l'infection chronique, qui correspond à des infections persistantes, caractérisées par la formation d'un biofilm. Ce biofilm est un des modes de vie de cette bactérie, et il constitue un mode de virulence très problématique pour les personnes qui sont ainsi infectées. C'est le cas des patients atteints de mucoviscidose, qui sont atteints d'infections chroniques du système respiratoire. La transition infection aiguë-chronique est encore mal comprise, mais il semble qu'elle soit contrôlée par les senseurs RetS et LadS, et le système GacS/GacA/RsmYZ.

La virulence de *P. aeruginosa* est également causée par la présence à la surface de cet organisme de nombreux appendices extracellulaires comme le flagelle, ou les différents types de *pili*. Elle possède également à sa surface des molécules comme les LPS ou les EPS, lui permettant notamment de former le biofilm.

Enfin, cette bactérie est capable de produire et sécréter différentes toxines et enzymes dégradatives, et cela grâce à la présence de cinq des six systèmes de sécrétion connus à



- Figure 7 -

Modèle du développement du biofilm chez *P. aeruginosa*

Les cinq stades de développements sont: (1) l'attachement réversible, (2) l'attachement irréversible, (3) le stade de maturation-1, (4) le stade de maturation-2 avec la formation de structures en champignons, et (5) l'étape de dispersion. Le panneau du dessus est une représentation schématique du développement du biofilm et les panneaux du bas sont des images de microscopie optique.

(D'après Stoodley et al., 2002)

l'heure actuelle chez les bactéries à Gram négatif (Fig.6). Si le SST3 et l'appareil flagellaire (en considérant le flagelle comme un système de sécrétion) sont uniques, tous les autres systèmes sont présents en plusieurs copies. Le troisième chapitre des « Résultats » de ce manuscrit est d'ailleurs consacré à la présentation détaillée de ces systèmes de sécrétion chez *P. aeruginosa*, au travers d'une revue que nous avons rédigée au laboratoire. Le SST5 sera lui traité plus en détail dans le chapitre III de cette Introduction.

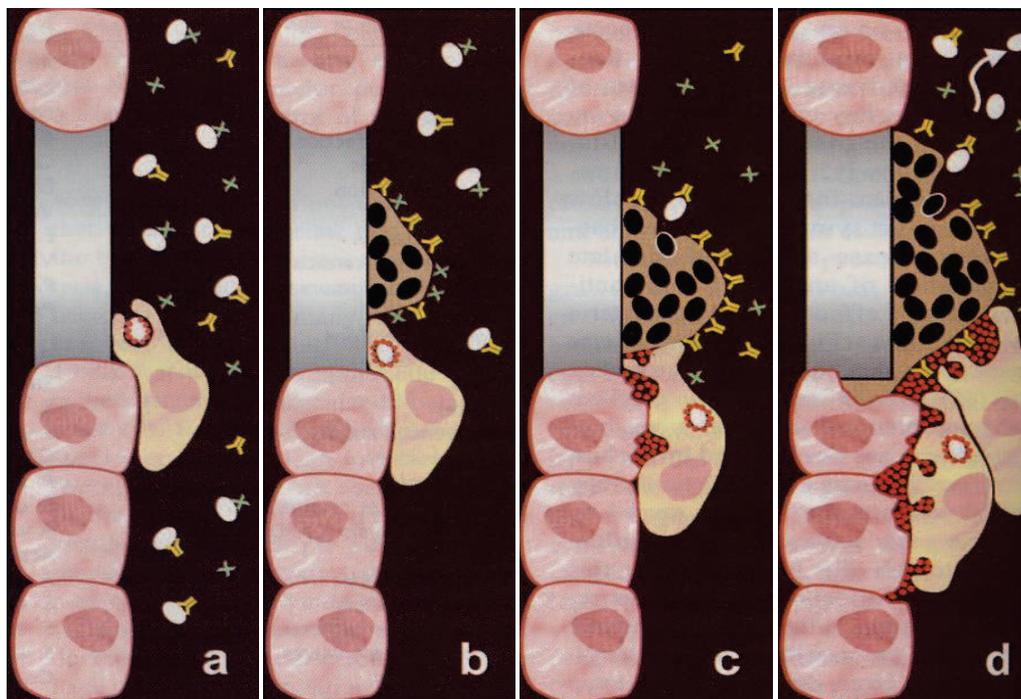
### I.3.2. Le biofilm

La définition d'un biofilm est sujette à débats, et elle varie en fonction de l'auteur. Pour William Costerton, un biofilm est une communauté organisée de bactéries englobées dans une matrice exopolymérique autoproduite, adhérant les unes aux autres et/ou à une surface (Costerton *et al.*, 1999) (Fig.7). Les biofilms ont un impact important dans le domaine médical et sanitaire. Actuellement dans le milieu médical, on estime que la majorité des infections bactériennes sont associées au biofilm (Lasa *et al.*, 2005). La colonisation des instruments ou appareillages médicaux, en particulier des prothèses et des cathéters, est à l'origine de nombreuses infections nosocomiales. Les biofilms forment au sein de l'organisme infecté des réservoirs de pathogènes si difficiles à éliminer que le seul moyen efficace pour traiter l'infection est de retirer l'implant.

Historiquement, la recherche sur le biofilm a connu un essor depuis les années 70 en raison de la légionellose. En 1976, 29 anciens légionnaires sont morts d'une pneumopathie après avoir été infectés au cours d'une réunion dans un hôtel de Philadelphie. Un agent infectieux jusqu'alors inconnu, *Legionella pneumophila*, et son mode de contamination particulier ont été découverts : un biofilm colonisait le système de climatisation et permettait la dissémination des bactéries.

*P. aeruginosa* colonise sous forme de biofilm les poumons des patients atteints de mucoviscidose et immunodéprimés. Ces infections sont chroniques, et extrêmement difficiles à soigner. La persistance de l'infection est liée à deux aspects fondamentaux : la perte d'efficacité des défenses immunitaires, et la résistance accrue aux antibiotiques.

La phagocytose et la diffusion des anticorps à travers la matrice sont très difficiles sur un biofilm, ce qui met en échec le système immunitaire. Pourtant, les communautés



x	Antibiotiques	○	Cellules planctoniques
Y	Anticorps	●	Cellules sessiles
		■	Enzymes phagocytaires

- Figure 8 -

Mise en échec du système immunitaire par un biofilm bactérien.

- (a) A l'état planctonique, les bactéries sont sensibles aux antibiotiques et sont éliminées par le système immunitaire (anticorps et cellules phagocytaires).
- (b) Lorsque les bactéries sont sous forme sessile, les anticorps et certains antibiotiques ne peuvent pas pénétrer la matrice.
- (c) Les cellules phagocytaires sont incapables de détruire les biofilms. Néanmoins, les enzymes phagocytaires sont relarguées et se retournent contre les cellules de l'hôte.
- (d) Les enzymes phagocytaires endommagent les tissus à proximité du biofilm. Ceci entraîne un cercle vicieux où l'échec du système immunitaire crée de l'inflammation qui est entretenue par le relargage de bactéries du biofilm.

(D'après Costerton et al., 1999)

bactériennes en biofilm stimulent le système immunitaire de l'hôte (synthèse d'anticorps, activation de la voie du complément, et recrutement de cellules phagocytaires) (Costerton *et al.*, 1999). Mais la structure même du biofilm constitue une protection contre ces défenses car les cellules phagocytaires (d'une taille d'environ 15  $\mu\text{m}$ ) sont inefficaces contre des structures pouvant atteindre 50 à 100  $\mu\text{m}$  d'épaisseur (Fig.8). L'inefficacité et l'abondance des cellules phagocytaires vont entraîner une réponse inflammatoire importante qui, à défaut d'éliminer les bactéries, va gravement endommager les tissus voisins par l'action d'agents oxydants et de radicaux libres libérés par les granulocytes.

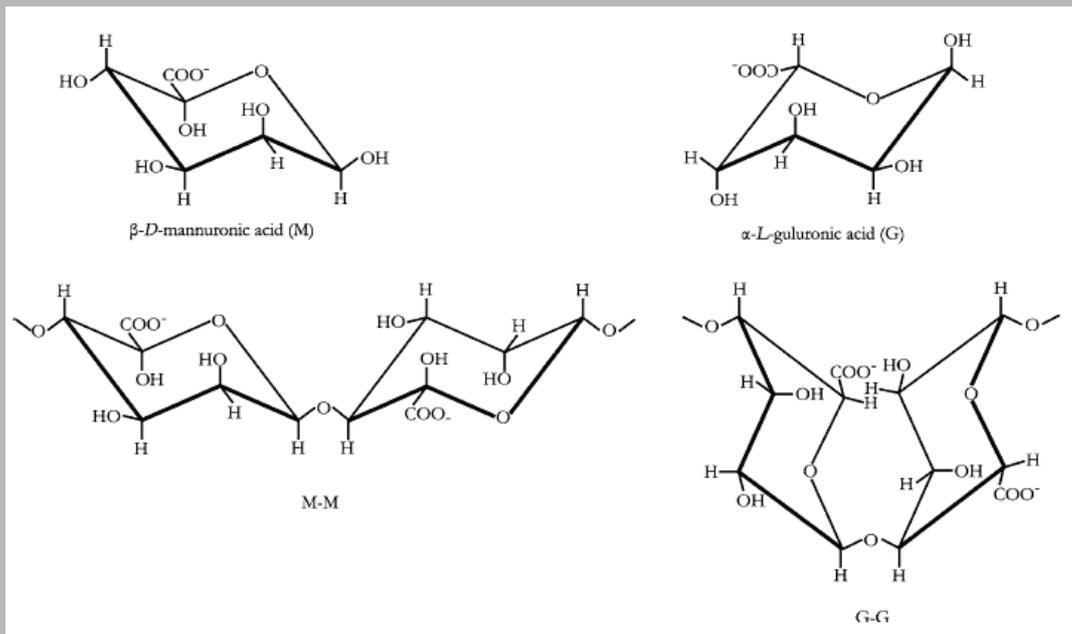
Les traitements antibiotiques tendent à supprimer les symptômes liés aux infections en tuant les bactéries planctoniques, mais sont incapables d'éradiquer les biofilms, qui restent installés et provoquent des rechutes dès l'arrêt du traitement, en libérant de nouveaux agents pathogènes (Costerton *et al.*, 1999). Grâce à sa charge nette électro-négative, la matrice empêche la pénétration des composés de nature hydrophile et positivement chargés. L'alginate retarde principalement la pénétration des aminoglycosides, de façon plus réduite celle des  $\beta$ -lactames et des fluoroquinolones, et pas du tout celle des macrolides (Abdi-Ali *et al.*, 2006). Les pompes à efflux sont aussi impliquées dans l'augmentation de la résistance du biofilm aux antibiotiques.

La résistance accrue peut venir également des gradients de concentration en nutriments et en oxygène qui génèrent une hétérogénéité métabolique de la population bactérienne. Il en résulte un taux de croissance extrêmement faible de certaines bactéries à l'intérieur du biofilm (Walters *et al.*, 2003). Dans ce cas, les bactéries au sein d'un biofilm ne sont plus résistantes aux antibiotiques que les bactéries planctoniques que parce qu'elles possèdent un métabolisme ralenti. Ne se divisant que très lentement, elles ne survivent que parce qu'elles ne croissent pas.

### I.3.3. Appendices et substances extracellulaires

#### I.3.3.1. Le lipopolysaccharide

La face extracellulaire de la ME est composée de LPS. Cette molécule est formée de trois modules distincts : (i) un module hydrophobe, le lipide A, qui forme la couche externe de la ME. Il contient 6 à 7 chaînes d'acides gras qui possèdent un nombre variable de groupes



- Figure 9 -

Structures chimiques des saccharides de l'alginate

(M) Mannuronate (acide β-D-mannuronique) ; (G) Guluronate (acide α-L-guluronique) ;  
 (MM) Structure secondaire d'un dimère MM ; (GG) Structure secondaire d'un dimère GG.

(D'après Remminghorst & Rehm, 2006)

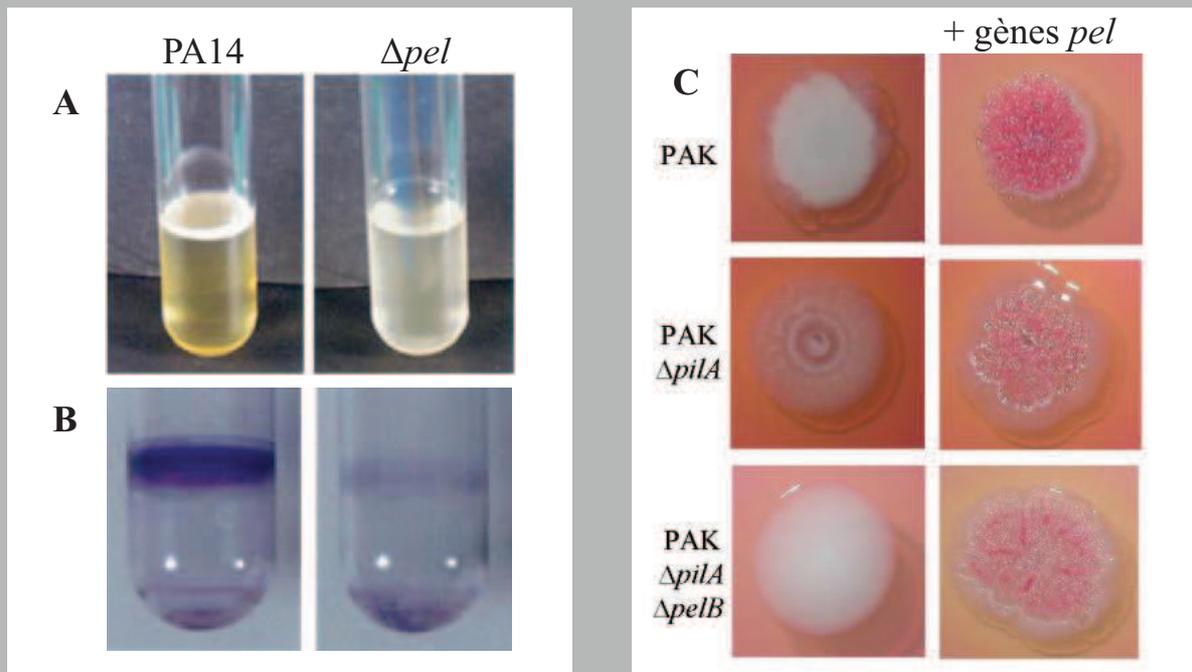
acyl ; (ii) la queue hydrophile qui est liée au lipide A, est composée d'un cœur polysaccharidique formé d'un noyau interne de deux résidus d'acide ulosonique et de 2 résidus d'heptose, et d'un noyau externe synthétisé sous deux isoformes différentes ; (iii) une chaîne formée d'un nombre variable d'unités répétées d'oligosaccharides, l'antigène O. Les variations de cet antigène très immunogène définissent les différents sérotypes bactériens (pour revue, (Pier, 2007)). La partie lipide A du LPS est reconnue par un récepteur Toll (TLR-4) à la surface des cellules eucaryotes, activant ainsi une cascade de signalisation qui déclenche une réponse pro-inflammatoire pouvant provoquer de la fièvre et dans certains cas un choc endotoxique (Backhed *et al.*, 2003; Wieland *et al.*, 2002). En effet, on appelle le LPS « endotoxine », par opposition aux autres toxines qui par définition sont sécrétées.

### I.3.3.2. Les exopolysaccharides

L'un des changements majeurs les mieux caractérisés lors de la formation d'un biofilm chez *P. aeruginosa* concerne la production d'EPS, l'un des constituants de la matrice extracellulaire. A ce jour, trois types d'EPS ont été identifiés chez cette bactérie, l'alginate, les Pel et les Psl. Les systèmes de synthèse et d'export de l'alginate et des Pel sont les plus caractérisés (Friedman & Kolter, 2004a; Friedman & Kolter, 2004b; Vasseur *et al.*, 2005; Vasseur *et al.*, 2007).

#### I.3.3.2.1. L'alginate

L'alginate est un EPS visqueux constitué de répétitions d'acides  $\beta$ -D-mannuroniques (ou mannuronate) et  $\alpha$ -L-guluroniques (ou guluronates) liés par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -1,4 (Shankar *et al.*, 1995) (Fig.9). La production d'alginate semble dépendre des conditions environnementales et est fréquemment associée à la virulence de *P. aeruginosa*. En effet, la plupart des isolats cliniques issus des patients atteints de mucoviscidose sont mucoïdes, l'alginate étant le composant majeur de la matrice extracellulaire de ces souches. Les souches non-mucoïdes (type PAO1 ou PA14) ne produisent pas d'alginate, mais d'autres EPS nécessaires à la formation de leur biofilm (Friedman & Kolter, 2004a; Friedman & Kolter, 2004b; Jackson *et al.*, 2004; Matsukawa & Greenberg, 2004; Vasseur *et al.*, 2005; Wozniak *et al.*, 2003).



- Figure 10 -

Implication des Pel dans la formation du biofilm  
et dans la pellicule de *P. aeruginosa*

(A) et (B) Comparaison des souches PA14 sauvages et  $\Delta pel$  dans la formation à l'interface air-liquide de la pellicule (A) et du biofilm (B). Les gènes *pel* sont nécessaires pour ces deux phénotypes.

(C) Comparaison de la morphologie sur boîte Congo Red des souches PAK wt et  $\Delta pilA$  et  $\Delta pilA \Delta pelB$  avec ou sans ajout en *trans* du cluster de gènes *pel*. Les gènes *pel* permettent la formation de colonies rugueuses.

(D'après Friedman & Kolter, 2004a, et Vasseur et al., 2005)

L'alginate joue un rôle important dans la structuration du biofilm formé par *P. aeruginosa*, et les souches mucoïdes qui surproduisent cet EPS sont capables de former un biofilm plus épais, plus compact et plus résistant à la tobramycine que les souches non mucoïdes (Hentzer *et al.*, 2001).

#### I.3.3.2.2. Les Pel

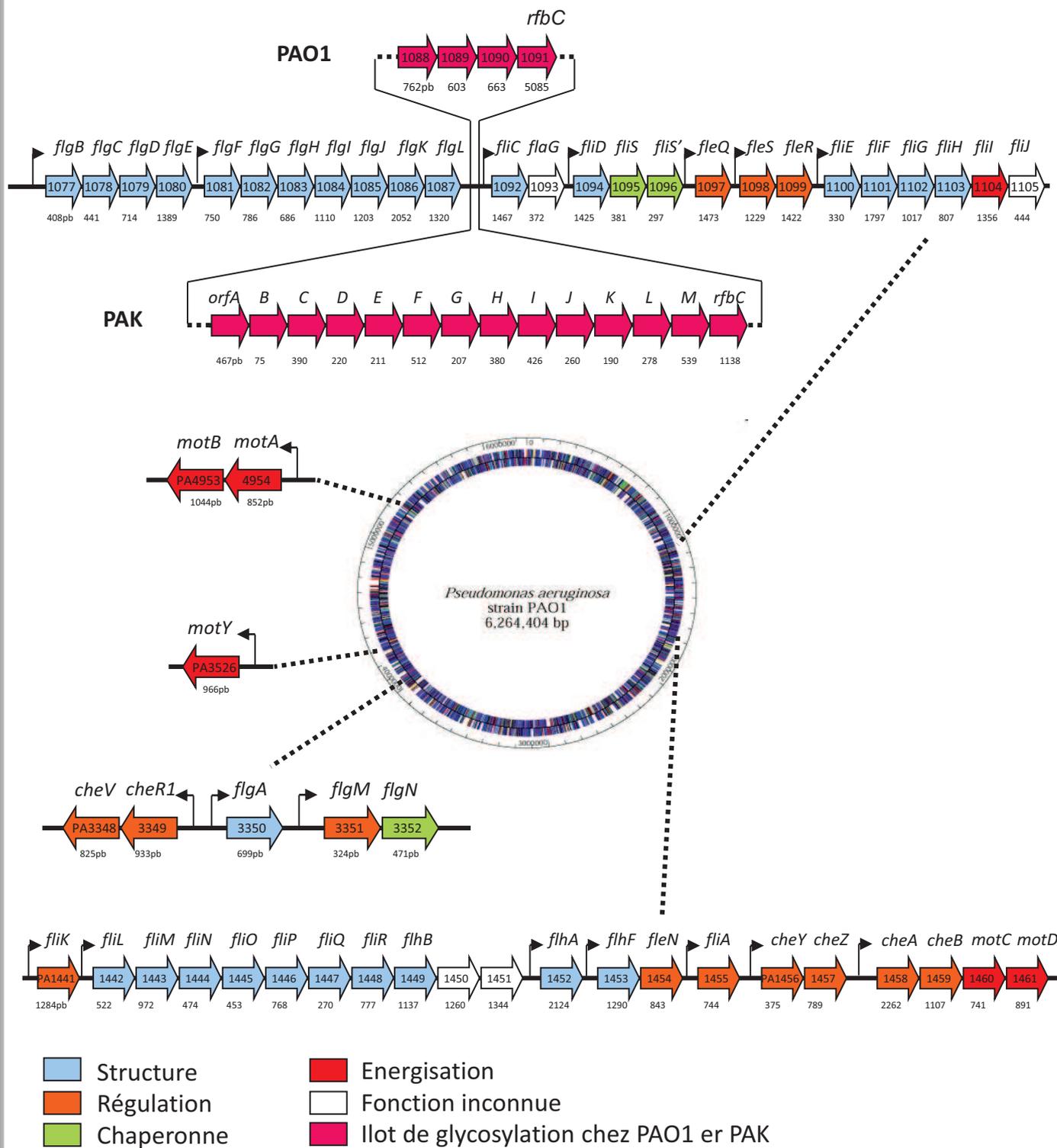
Le locus *pel* a été mis en évidence dans la souche PA14 lors de la recherche de mutants incapables de former une pellicule à l'interface air-liquide (Friedman & Kolter, 2004a), mais également dans la souche PAK (Vallet *et al.*, 2001; Vasseur *et al.*, 2005) (Fig.10A). Ce locus se compose de 7 gènes très conservés chez *P. aeruginosa*, codant une machinerie de biosynthèse d'un EPS riche en glucose, essentiel pour le maintien de la structure du biofilm pendant son développement (Friedman & Kolter, 2004b) (Fig.10B). L'expression des gènes *pel* permet la production d'EPS, induisant la formation de colonies rugueuses visibles sur boîte rouge Congo (Vasseur *et al.*, 2005) (Fig.10C).

#### I.3.3.2.3. Les Psl

De nombreuses souches (notamment PAO1) peuvent produire cet EPS essentiel à la formation du biofilm *in vitro* (Friedman & Kolter, 2004a; Friedman & Kolter, 2004b; Jackson *et al.*, 2004; Matsukawa & Greenberg, 2004; Vasseur *et al.*, 2005; Wozniak *et al.*, 2003). La souche PA14 ne possède que certains gènes impliqués dans la biosynthèse des Psl, elle ne peut donc pas les produire. Les Psl sont riches en mannose et galactose (Ma *et al.*, 2007), et ils sont impliqués dans l'adhérence au verre et aux cellules épithéliales (Ma *et al.*, 2006). Ils sont également essentiels au maintien de la structure du biofilm après l'attachement au support (Ma *et al.*, 2006).

#### I.3.3.3. Le flagelle

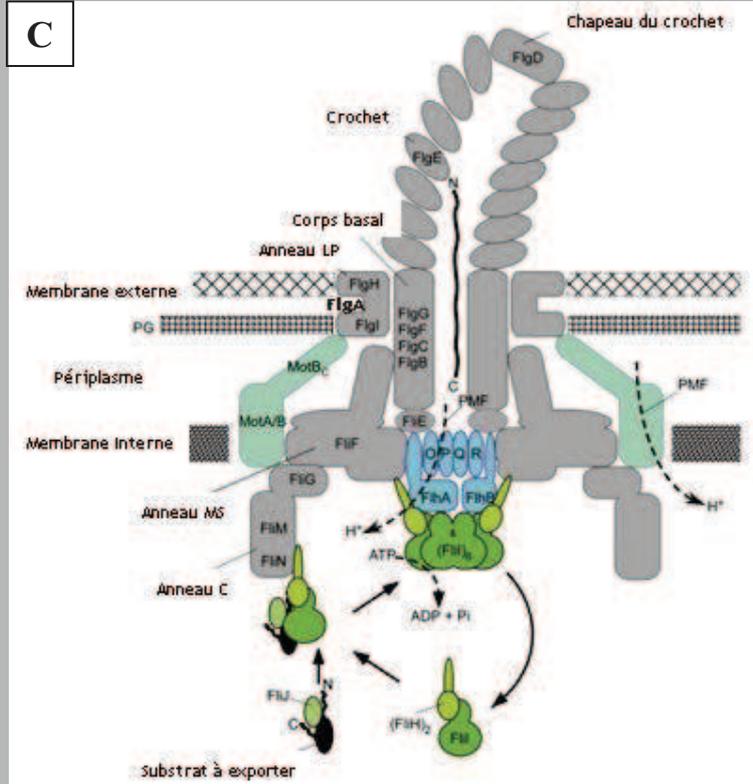
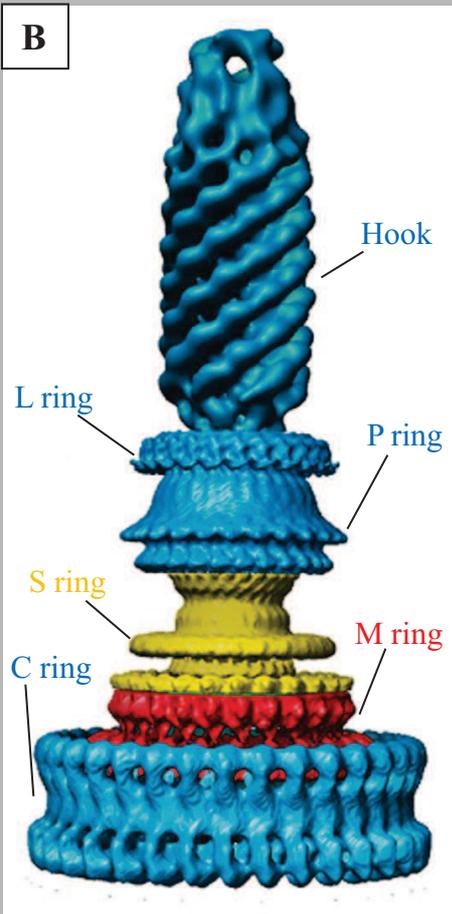
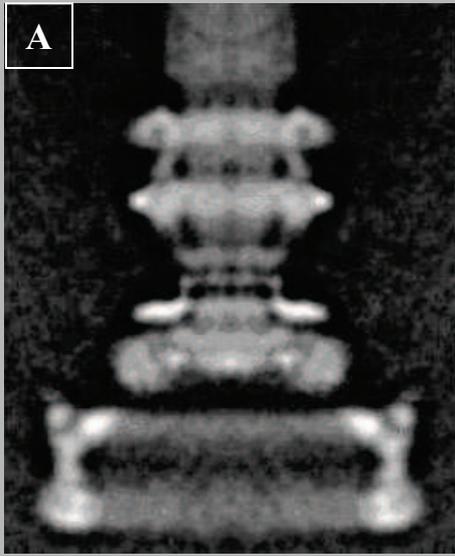
*P. aeruginosa* possède un seul flagelle unique, et polaire. Long de 15 à 20  $\mu\text{m}$ , ce qui représente 5 à 10 fois la taille de la bactérie, cet appendice lui permet de se déplacer dans un



- Figure 11 -

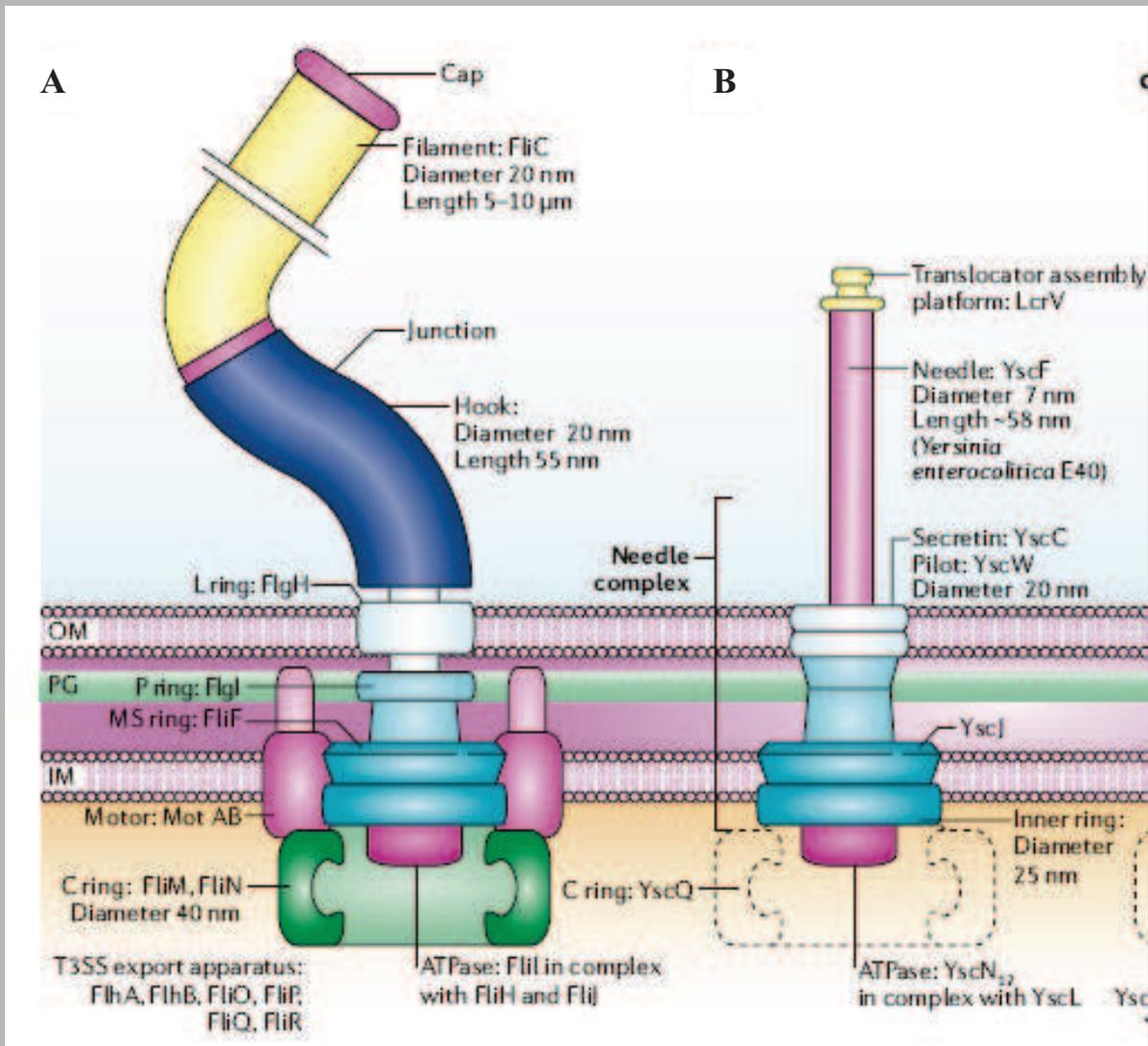
Gènes impliqués dans l'assemblage du flagelle chez *P. aeruginosa*.

Organisation des loci de gènes impliqués dans biogénèse du flagelle et dans sa régulation.



- Figure 12 -  
Structure du flagelle

(A) Le corps basal du flagelle vu par microscopie électronique (De Rosier, 1998). (B) Modélisation du flagelle de *S. typhimurium* par cryomicroscopie électronique (De Rosier, 2006). (C) Protéines du flagelle de *P. aeruginosa* (Minamino *et al.*, 2008).



- Figure 12 Bis -

### Comparaison entre le flagelle et le SST3

Comparaison du flagelle (A), de l'injectisome Ysc (SST3 de *Y. enterocolitica*) (B). Pour l'injectisome, l'anneau C est représenté en lignes pointillées. IM = Membrane interne; OM = Membrane externe; PG: Peptidoglycane

(D'après Cornelis, 2006).

milieu liquide ou semi-solide mais aussi d'explorer et d'atteindre des surfaces inertes ou coloniser les tissus infectés. Il est l'acteur de la mobilité dite de « swimming » et joue un rôle dans celle dite de « swarming » (qui fait aussi intervenir les *pili* de type IV et les rhamnolipides) (Deziel *et al.*, 2003; Kohler *et al.*, 2000). Bien qu'il ait à première vue un rôle antagoniste à la vie sessile, il est néanmoins l'un des éléments de l'adhérence et de la formation du biofilm (Simpson *et al.*, 1995).

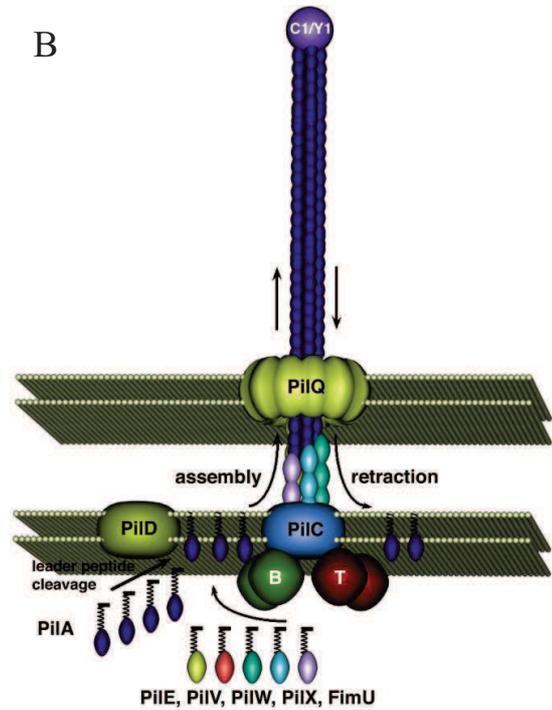
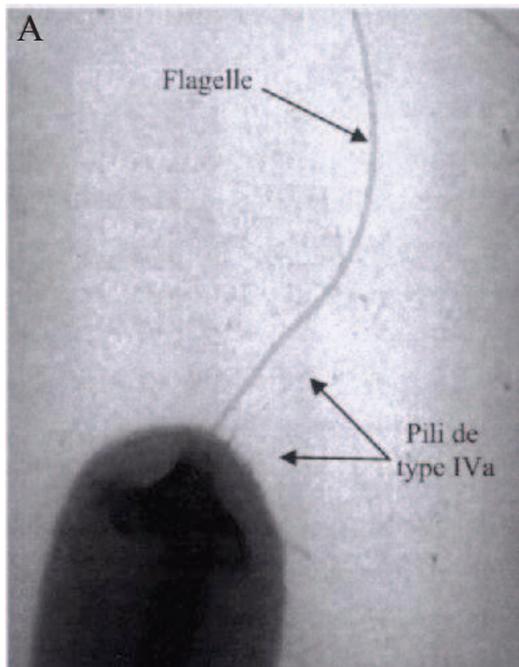
L'assemblage du flagelle fait intervenir une cinquantaine de gènes, répartis sur 17 structures opéroniques putatives dans la souche PAO1 de *P. aeruginosa* (Fig.11). Ces gènes sont classés en différentes catégories en fonction de l'ordre dans lequel ils sont exprimés au cours du temps.

Bien qu'il y ait quelques différences notables entre le flagelle (Fig.12A) et le SST3 (crochet et filament extracellulaire pour le flagelle, sécrétine et aiguille pour le SST3) leurs architectures sont très proches (Fig.12 Bis). Ces deux appendices partagent certainement un ancêtre commun et s'il n'a pas encore été confirmé que le flagelle de *P. aeruginosa* puisse sécréter des protéines, ceci a été démontré dans d'autres espèces comme *Yersinia enterocolitica* (Young *et al.*, 1999). Le flagelle est constitué d'une vingtaine de protéines réparties dans trois entités distinctes, le corps basal, le crochet, et le filament (Fig.12C), qui sont assemblés de manière séquentielle : le corps basal et le moteur sont assemblés, puis le crochet, et enfin le filament.

Le corps basal est ancré dans l'enveloppe bactérienne, au travers des deux membranes. Il est formé d'une tige centrale, des anneaux MS, C, P, et L, et il contient l'appareil d'export des protéines sécrétées (notamment la flagelline qui formera le filament) (Fig.12B et 12C). Il contient aussi le moteur (MotAB ou MotCD chez *P. aeruginosa*) qui énergétise le système, et contrôle le sens de rotation du flagelle.

Le crochet a un rôle de transmission du mouvement. Il est plus large que le filament et il est creux (25 à 30 Å), ainsi il permet l'export des sous-unités flagellines.

Les éléments du filament (FliC et FliD chez *P. aeruginosa*) ne sont exportés que lorsque le corps basal et le crochet sont entièrement constitués, et ils sont assemblés à l'extrémité de la structure croissante. Le filament est une structure hélicoïdale formée d'environ 20 000 sous-unités de la flagelline FliC. Elle permet à la bactérie de se déplacer en formant une hélice actionnée par le moteur situé dans le corps basal.



- Figure 13 -

Un exemple de *pili* de type IV: les *pili* de type IVa

(A) Visualisation par microscopie électronique des *pili* de type IVa de *P. aeruginosa*

(B) Structure des *pili* de type IVa

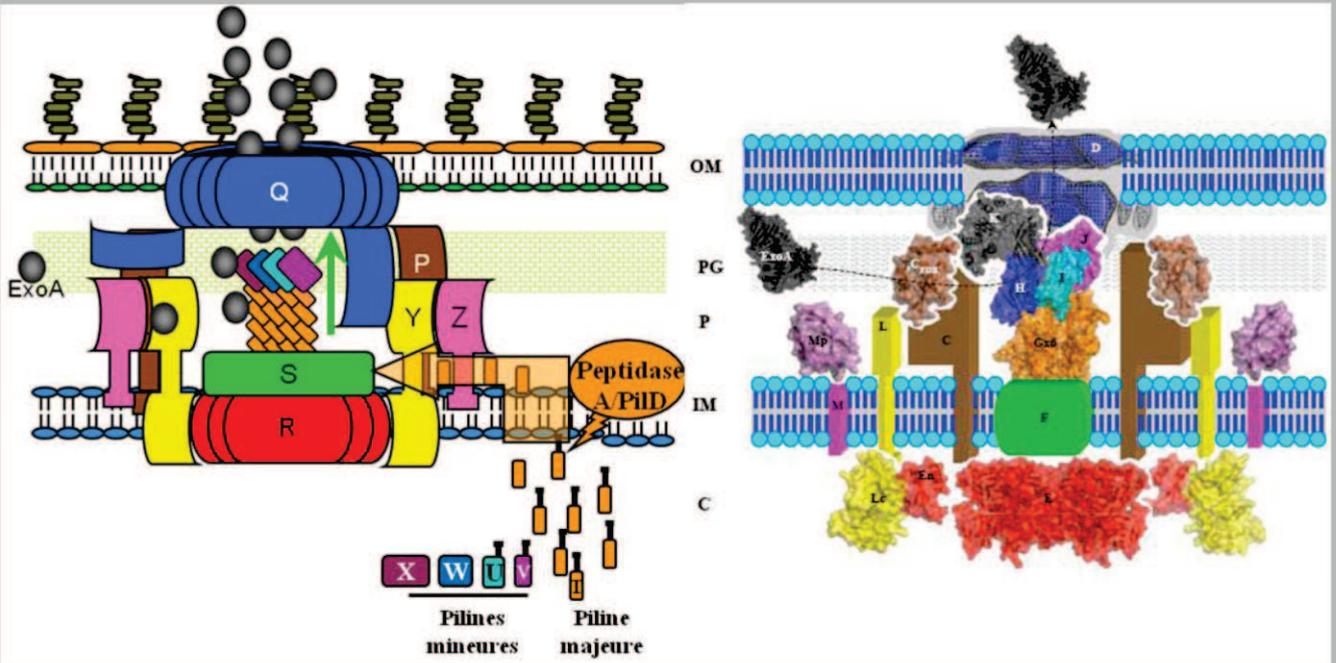
(D'après Mattick, 2002)

Le rôle du flagelle dans la virulence de *P. aeruginosa* est avéré depuis les années 1980, où il fut d'abord considéré impliqué seulement dans la mobilité bactérienne (Montie *et al.*, 1982). Il a depuis été montré qu'il jouait un rôle dans l'adhérence sur supports abiotiques type lames de verre (Sauer *et al.*, 2002), ou sur des cellules de la cornée par exemple (Hazlett & Rudner, 1994). Malgré un rôle controversé, il semble que le flagelle puisse être nécessaire à la formation du biofilm, en fonction des conditions expérimentales, notamment lors des étapes d'attachement réversible et irréversible (Toutain *et al.*, 2007). Il est également impliqué dans l'internalisation de *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales (notamment au travers de sa protéine FlhA (Fleiszig *et al.*, 2001)), et dans la réponse pro-inflammatoire : la flagelline est reconnue par le récepteur TLR-5, ce qui induit la libération de cytokines par le biais du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Zhang *et al.*, 2003).

#### I.3.3.4. Les *pili* de type IV

Les *pili* de type IV sont des fibres constituées d'une sous-unité piline de 5 à 20 kDa. On les retrouve à la surface de nombreuses bactéries à Gram négatif et d'au moins un organisme à Gram positif. Ces filaments qui ont un diamètre de 6-9 nm et plusieurs  $\mu$ m de long, apparaissent lisses et sans particularité au microscope électronique (Fig.13A). Pourtant, leur structure n'est pas uniforme mais hélicoïdale, ce qui leur confère des propriétés d'extension et de flexibilité (Fig.13B). Ces propriétés leur permettent d'assurer de nombreuses fonctions telles que la mobilité par twitching (résultat d'une succession de polymérisations/rétractations du *pilus*), par swarming, l'adhérence à différents types de supports (surfaces abiotiques ou cellules hôtes), l'échappement immunitaire, l'entrée d'ADN, la formation de biofilm, la sécrétion, l'attachement de phages et la transduction de signaux (Craig & Li, 2008).

Les *pili* de type IV sont classés en deux groupes, a et b, en fonction de la séquence primaire de la sous-unité piline. Pour les *pili* de type IVa, il s'agit de la protéine PilA. Au sein des *pili* de type IVb, il existe une sous-famille particulière, la famille Flp. Malgré près d'un millier de génomes séquencés et disponibles, *P. aeruginosa* est la seule bactérie possédant ces trois types de *pili* : type IVa, type IVb, Flp.



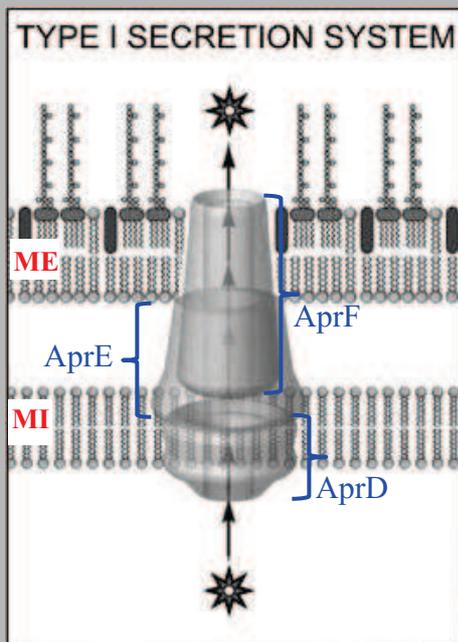
- Figure 14 -

### Le système de sécrétion de type II

Le système est représenté de manière schématique avec (B) ou sans (A) superposition des structures obtenues pour les différents composants de la machinerie. Les nomenclatures notées en (A) et en (B) sont respectivement celles du système Xcp de *P. aeruginosa* (Q représente XcpQ) et du système général Gsp (D représente GspD).

S = Surnageant; OM = Membrane Externe; PG = Peptidoglycan; P = Périplasm; IM = Membrane Interne; C = Cytoplasme.

(D'après Durand et al., 2009 et adaptation de Filloux, 2004)



- Figure 15 -

### Le système de sécrétion de type I

Modélisation du SST1 de *P. aeruginosa*. AprD: ABC transporter; AprE: MFP (Membrane Fusion Protein); AprF: TolC-like. ME: Membrane Externe; MI: Membrane Interne

(D'après Kipnis et al., 2006)

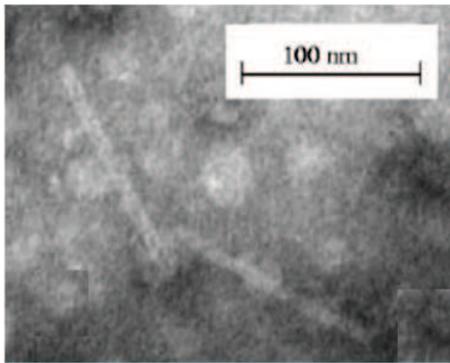
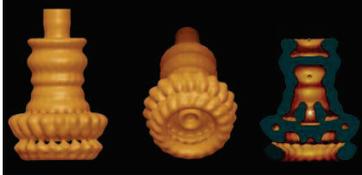
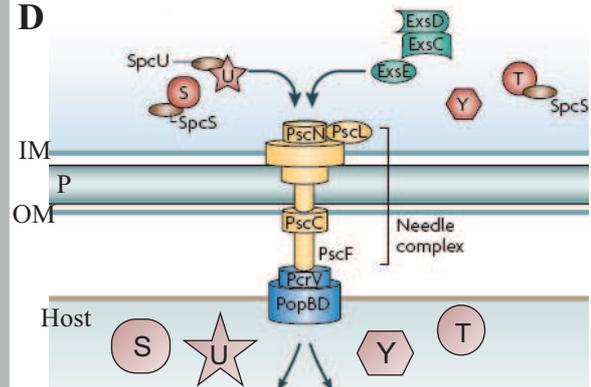
#### I.3.3.5. Les adhésines

Le flagelle et les *pili* de type IV sont des appendices qui confèrent à *P. aeruginosa* des capacités d'adhérence, notamment aux cellules épithéliales (Hardie *et al.*, 2009). Mais d'autres protéines peuvent permettre l'adhérence. Les lectines par exemple sont des adhésines qui lient les sucres, et sont impliquées dans la formation du biofilm (Diggle *et al.*, 2006; Tielker *et al.*, 2005). LecA se lie au galactose et LecB se lie au mannose et au fucose.

#### I.3.4. Les systèmes de sécrétion

Comme pour de nombreuses bactéries pathogènes, la virulence de *P. aeruginosa* repose largement sur sa faculté à sécréter dans le milieu extracellulaire des enzymes dégradatives et des toxines, voire à en injecter certaines dans les cellules cibles. La sécrétion est définie comme le transport ou export d'une protéine depuis son lieu de synthèse, le cytoplasme, vers le milieu extracellulaire, en traversant la membrane interne (MI), le périclasme, et la ME. Dans les conditions de croissance en erlen au laboratoire, les protéines sécrétées sont par conséquent retrouvées dans le milieu extracellulaire ou de culture : les surnageants de culture. Dans un environnement naturel, les protéines sécrétées ont accès à leurs substrats, leurs cibles, comme la cellule hôte par exemple. L'injection est un mode de sécrétion faisant intervenir un niveau supplémentaire. Il s'agit cette fois de transport d'une protéine depuis le cytoplasme bactérien vers le cytoplasme eucaryote, en une seule étape. Dans ce cas, l'effecteur injecté n'est jamais relargué dans le milieu extracellulaire, il arrive directement dans le cytoplasme de l'hôte à l'aide de systèmes de sécrétion qui lui permettent d'être transloqué (de traverser) à travers la membrane plasmique de l'hôte.

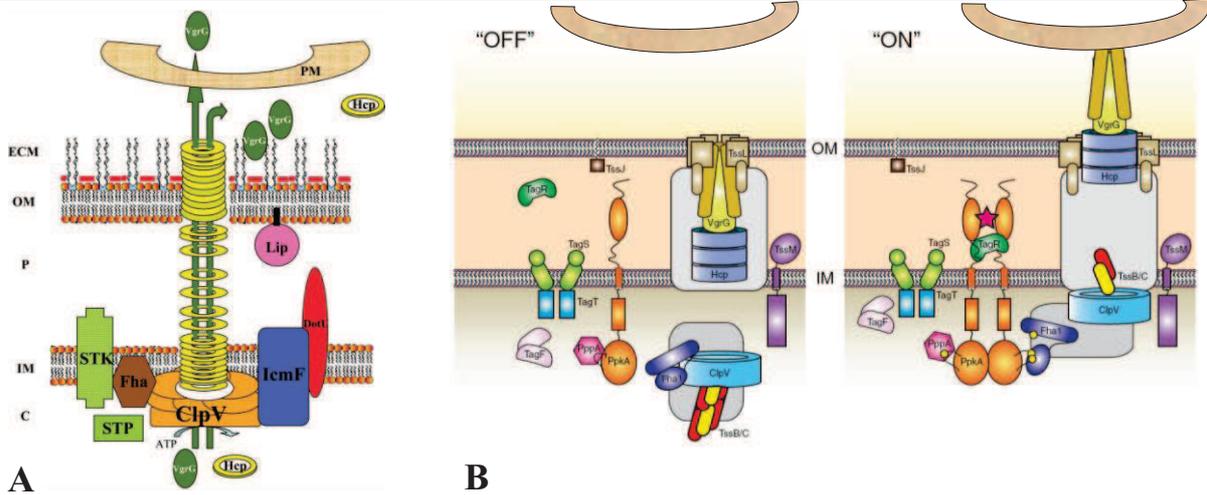
La grande majorité des protéines sécrétées par *P. aeruginosa* empruntent le système de sécrétion de type II (SST2) ou GSP (pour general secretion pathway) (Fig.14). Chez *P. aeruginosa*, il existe deux SST2 complets, le système Xcp (pour extracellular protein deficient) (Filloux *et al.*, 1989), et le système Hxc (pour homologous to Xcp) (Ball *et al.*, 2002), ainsi qu'une sous-unité orpheline (XphA-XqhA) interchangeable avec la sous-unité XcpP-XcpQ du système Xcp (Michel *et al.*, 2007). Il a récemment été découvert que la souche clinique PA7 possède un troisième SST2, appelé Gsp3 (Roy *et al.*, 2010). A l'exception de ce dernier, les autres systèmes ont été identifiés au sein de notre laboratoire.

**A****B****C****D**

- Figure 16 -

### Système de sécrétion de type III

(A) Image par microscopie électronique des aiguilles PscF la machinerie de type III de *P. aeruginosa* (Soscia *et al.*, 2007). (B) Représentation de la surface du corps basal du SST3. (C) Structure du corps basal du système de *S. typhimorium* (résolution à 17Å) (Marlovits *et al.*, 2004). (D) Organisation de la machinerie de *P. aeruginosa*. PscN = ATPase; PscC: sécrétine; PcrV-PopB-PopD: Translocateurs; S,T,U, et Y: ExoS,T,U et Y (D'après Hauser, 2009).



- Figure 17 -

### Système de sécrétion de type VI

(A) Représentation schématique de la machinerie de type VI. (B) Activation post-traductionnelle du système de type VI de *P. aeruginosa*: l'activation de PpkA entraîne la mise en place de nanotubes qui incorporeraient VgrG en leur extrémité de sorte à percer la membrane externe et/ou la membrane plasmique de la cellule hôte.

(D'après Filloux *et al.*, 2008, et Hsu *et al.*, 2009)

Historiquement, le système Xcp est le premier à avoir été identifié (Filloux *et al.*, 1989), puis le système Hxc (Ball *et al.*, 2002), et enfin la sous-unité orpheline XphA-XqhA (Michel *et al.*, 2007).

*P. aeruginosa* possède également quatre SST1, dont deux pour lesquels des substrats sont décrits: le système Apr (Fig.15), et le système Has. Le premier SST1 identifié chez *P. aeruginosa*, le système Apr, l'a également été au sein de notre laboratoire, de façon concomitante au système Xcp (Guzzo *et al.*, 1991).

Par la suite, la découverte des protéines ExoS et ExoT ont conduit à l'identification du SST3, responsable de leur sécrétion (Yahr *et al.*, 1996). Ce système a la particularité de permettre l'injection de ces effecteurs directement dans le cytosol de l'hôte (Fig.12 et 16). Il n'existe qu'une seule copie de cette machinerie chez *P. aeruginosa*, qui est absente de la souche clinique PA7.

Cette bactérie possède également un flagelle unique, dont la machinerie d'export peut être considérée comme un système de sécrétion, puisque il a été montré notamment que *Y. enterocolitica* pouvait utiliser cette machinerie pour sécréter la phospholipase A<sub>2</sub> YpIA et d'autres protéines appelées Fops (Young *et al.*, 1999). Cependant, chez *P. aeruginosa*, il n'a à l'heure actuelle pas été observé de sécrétion de protéines autres que celles nécessaires à l'assemblage de cet appendice.

Plus récemment, un nouveau système de sécrétion des bactéries Gram négatives a été identifié chez *Vibrio cholerae* et *P. aeruginosa*, le SST6 (Fig.17) (Mougous *et al.*, 2006; Pukatzki *et al.*, 2006). Il semble que ce système puisse permettre aussi bien la sécrétion dans le milieu extracellulaire que l'injection de ses substrats dans l'hôte. Il existe trois SST6 chez *P. aeruginosa*, H1-SST6, H2-SST6 et H3-SST6. Avant la publication de ces résultats, au laboratoire, la recherche de protéines sécrétées à motifs eucaryotes nous avait conduit à nous intéresser à un système de sécrétion putatif qui s'est avéré être le système SST6.

Plusieurs SST5 existent également chez *P. aeruginosa*. Ils sont traités en détail dans le chapitre III de cette Introduction.



Au final, notre bactérie d'étude possède cinq des six systèmes de sécrétion connus à l'heure actuelle chez les bactéries à Gram négatif. Seul le SST4 n'a à ce jour pas été trouvé dans l'arsenal sécrétoire de *P. aeruginosa*.

Afin de ne pas trop densifier cette introduction, j'ai choisi de ne pas présenter les aspects structuraux et l'organisation moléculaire des constituants des machineries de sécrétion, qui sont abordés dans la revue que nous avons publiée dans *International Journal of Medical Microbiology*. Les paragraphes suivants sont en revanche consacrés à la présentation de certaines des toxines ou enzymes dégradatives sécrétées par ces systèmes.

### I.3.5. Toxines/enzymes dégradatives sécrétées

#### I.3.5.1. La protéase alcaline

La protéase alcaline AprA est sécrétée par le SST1 Apr. Elle possède un large spectre de substrats, pouvant notamment dégrader l'interféron  $\gamma$ , ou les composants du complément (Hong & Ghebrehiwet, 1992; Horvat & Parmely, 1988). Son rôle dans la pathogénicité a été essentiellement démontré lors d'infections de la cornée. Son action, combinée à celle de l'élastase (voir plus bas) contribue à la dégradation directe du tissu cornéen, mais aussi indirecte par l'activation des protéases endogènes de la cornée (Matsumoto, 2004; Twining *et al.*, 1993).

#### I.3.5.2. Quelques substrats du Système de Sécrétion du Type II (SST2)

##### I.3.5.2.1. L'exotoxine A

Cette protéine est communément considérée comme la toxine la plus puissante de *P. aeruginosa*, elle joue un rôle important dans la pathogénicité et elle facilite la colonisation et l'infection. Une souche mutante pour le gène *toxA* (qui code l'exotoxine A) est 20 fois moins virulente qu'une souche sauvage en cas d'injection chez la souris (Kipnis *et al.*, 2006; Yates *et al.*, 2006).



C'est une toxine de la famille des toxines A-B. Son domaine B (pour binding) se fixe à un récepteur de la cellule eucaryote, promouvant l'internalisation de la toxine par endocytose et après un transport rétrograde jusqu'au *réticulum* endoplasmique, elle est libérée dans le cytosol. Son domaine A (pour activity) possède une activité ADP-ribosyl transférase (ADPRT). Ainsi en transférant une ADP-Ribose sur le facteur d'élongation de la traduction EF2, elle bloque son activité et inhibe la synthèse protéique de la cellule (Iglewski & Kabat, 1975). C'est sans doute le facteur le plus toxique de *P. aeruginosa*.

#### I.3.5.2.2. Les élastases

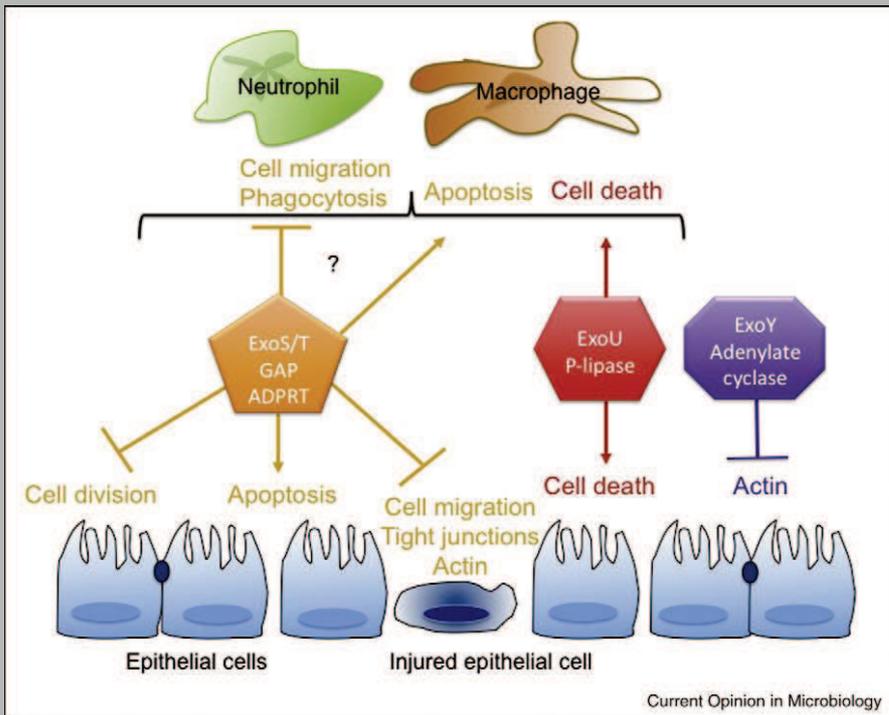
L'élastase LasB est une métalloprotéase. Elle joue un rôle dans les infections respiratoires (Kipnis *et al.*, 2006), puisqu'elle contribue à la dégradation de l'épithélium respiratoire en dégradant les jonctions serrées, ce qui a pour effet d'augmenter la perméabilité épithéliale et le recrutement des neutrophiles (Hardie *et al.*, 2009). Son nom est tiré du fait qu'elle peut, entre autres, dégrader l'élastine (un composant de plusieurs tissus, comme les vaisseaux sanguins, les tissus pulmonaires).

LasA est une autre protéase élastolytique de type staphylolytique. Elle est en effet capable de s'attaquer à des liaisons peptidiques présentes dans le peptidoglycane de *S. aureus*, ce qui confère probablement un avantage sélectif à *P. aeruginosa* dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose. Cette protéine augmente l'activité de LasB sur l'élastine.

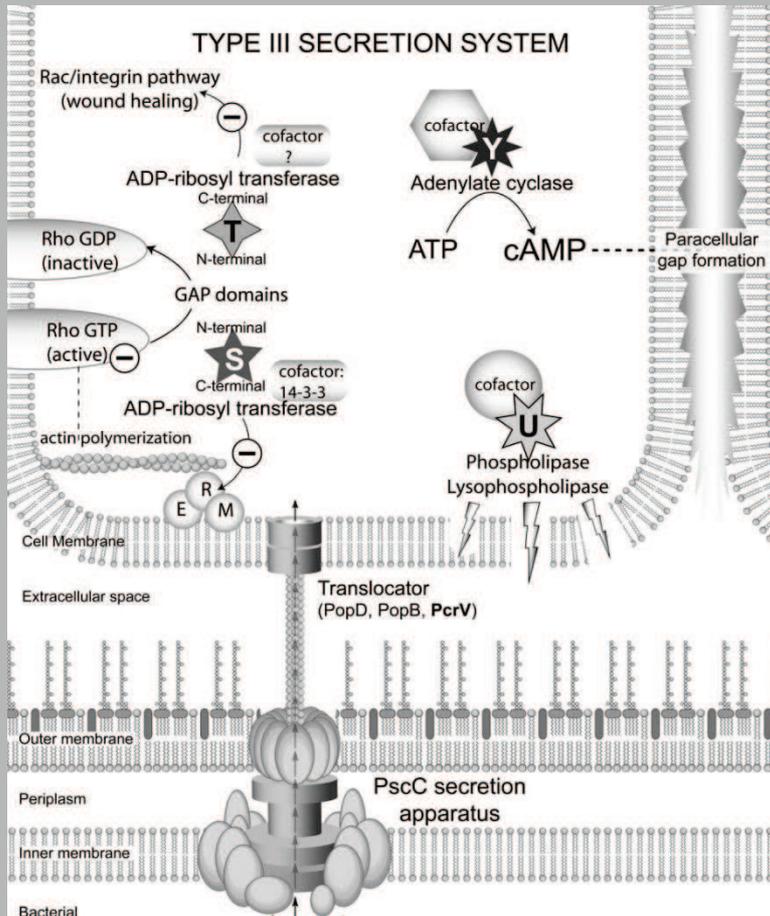
#### I.3.5.2.3. Les phospholipases C

Les phospholipases C PlcH et PlcN sont capables de dégrader des phospholipides comme la phosphatidylcholine (PC) par exemple. Cela permet, entre autres, de dégrader les membranes cellulaires eucaryotes, et d'interférer avec des voies de signalisation de l'hôte. PlcH active les voies des cyclooxygénases et des lipoxygénases, qui peuvent produire notamment des eicosanoïdes, molécules pouvant favoriser la génération de radicaux oxydants, d'un stress oxydatif cellulaire, et la mort cellulaire (Pompeia *et al.*, 2002; Songer, 1997). PlcH est aussi responsable d'inflammations et dommages aigus des poumons (Kipnis *et al.*, 2006).

A



B



- Figure 18 -  
Les effecteurs  
de type III

(A) Processus cellulaires de l'hôte modifiés par l'activité des effecteurs de type III.  
(B) Cibles moléculaires de ces effecteurs.

(D'après Engel & Balachandran, 2009 et Kipnis et al., 2006)

### I.3.5.3. Les exoenzymes du Système de Sécrétion du Type III (SST3) (Fig.18)

#### I.3.5.3.1. ExoS et ExoT

ExoS et ExoT sont deux protéines très similaires. Elles possèdent 75% d'identité, et dans un premier temps, il était considéré qu'ExoT (53 kDa) n'était que le précurseur d'ExoS (49 kDa). Ces protéines possèdent deux activités : le domaine N-terminal arbore une activité GTPase activating protein (GAP), et le domaine C-terminal est responsable d'une activité ADPRT. Toutefois l'activité ADPRT d'ExoT ne représente que 0,2% de celle d'ExoS.

Pour ces deux protéines, l'activité GAP sur les petites protéines G de la famille des GTPases Rho (Barbieri & Sun, 2004) inhibe la phagocytose en altérant le cytosquelette d'actine. L'activité ADPRT d'ExoS est très importante pour sa cytotoxicité, elle inhibe des voies de transductions de signaux, et entraîne la dépolymérisation des filaments d'actine du cytosquelette, en agissant notamment sur des protéines telles que Ras, Rap, RalA, Rac, Rab, Cdc42 et les protéines ERM (ezrine/radixine/moesine) (Maresso *et al.*, 2007). ExoT inhibe la cytokinèse au moyen de ses deux activités, ce qui se traduit par une inhibition de la réparation des blessures (Shafikhani & Engel, 2006). Son activité ADPRT lui permet en plus d'inhiber la migration cellulaire et le phénomène « d'arrondissement cellulaire ».

Pour ces deux enzymes, l'activité ADPRT est dépendante de la présence d'une protéine cofacteur eucaryote, appartenant à la famille des protéines 14-3-3, appelée FAS (pour factor activating exoenzyme S) (Coburn *et al.*, 1991; Fu *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 2008). Ce cofacteur est commun au deux exoenzymes (Shen *et al.*, 2008). Ces deux protéines partagent la même chaperonne (qui les maintient dans un état compétent pour la sécrétion), la protéine SpcS (Shen *et al.*, 2008).

ExoT est présent dans l'ensemble des souches de *P. aeruginosa*, contrairement à ExoS (72% des souches) (Feltman *et al.*, 2001).

#### I.3.5.3.2. ExoY

ExoY est une adénylate cyclase (Yahr *et al.*, 1998). Injectée dans le cytosol eucaryote, elle augmente la concentration cytosolique en AMP cyclique (AMPC). De fortes concentrations en AMPC endommagent les jonctions intercellulaires des cellules épithéliales



(Cowell *et al.*, 2005). Comme pour les autres effecteurs de type III, ExoY a besoin d'un cofacteur eucaryote (toujours non identifié) pour être actif.

#### I.3.5.3.3. ExoU

ExoU est une protéine qui a été identifiée de manière concomitante par deux équipes en 1997-1998. L'une d'entre elles avait observé que certaines souches cliniques possédaient un phénotype cytotoxique sur des cellules épithéliales polarisées MDCK *in vitro*, et un phénotype virulent *in vivo*, et ce malgré l'absence dans leur génome du gène *exoS* (Fleiszig *et al.*, 1997b). Ces souches sécrétaient un produit d'environ 70 kDa, identifié comme la protéine codée par un gène qu'ils ont nommé *exoU* (Finck-Barbancon *et al.*, 1997). Cette étude incrimina clairement ExoU comme responsable de ces phénotypes de virulence.

En parallèle, une autre équipe identifia la protéine PepA (codée par le gène *pepA*) en criblant une banque de mutants par transposition non cytotoxiques sur des cellules MDCK également (Hauser *et al.*, 1998). Ils observèrent la cytotoxicité induite par PepA, ainsi que sa sécrétion de manière dépendante du SST3. La nomenclature retenue par la suite pour cette protéine fut la 1<sup>ère</sup> publiée, à savoir ExoU. Cette protéine possède une activité de type phospholipase  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) (Phillips *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2003).

Comme tout effecteur du type III, une chaperonne lui est associée : SpcU, petite protéine (15 kDa) avec un point isoélectrique acide (Finck-Barbancon *et al.*, 1998), qui la maintient dans un état compétent pour la sécrétion. Son association à SpcU nécessite la présence du domaine allant des résidus 3 à 123 d'ExoU, et les deux gènes *exoU* et *spcU* forment un opéron contrôlé par le régulateur global du SST3, ExsA.

Les gènes *exoU-spcU* ont été vraisemblablement acquis par transfert horizontal, comme en témoignent la différence de leur teneur en G+C (58,8% contre 66,7 de moyenne pour *P. aeruginosa*), et la présence dans l'entourage génétique d'éléments classiquement rencontrés lors d'intégration d'éléments mobiles (gène d'ARNt, gène d'intégrase par exemple) (Kulasekara *et al.*, 2006).

Il est intéressant d'observer que dans l'ensemble des études menées sur différentes souches cliniques ou environnementale de *P. aeruginosa*, les gènes *exoU* et *exoS* ne sont



quasiment jamais retrouvés dans le même génome (Feltman *et al.*, 2001; Fleiszig *et al.*, 1997b; Wolfgang *et al.*, 2003). Seules deux souches échappent à cette règle, identifiées dans l'étude de Feltman, l'une est porteuse de ces deux gènes, et l'autre n'en possède aucun (Feltman *et al.*, 2001). Leur localisation à des loci différents sur le génome discrédite l'hypothèse selon laquelle l'acquisition de l'un entraîne l'excision de l'autre par échange allélique, et on peut écarter l'hypothèse de fonctions redondantes. Finalement, les raisons de cette incompatibilité restent assez mal connues.

Le paragraphe II.3.2 revient en détail sur cette protéine.

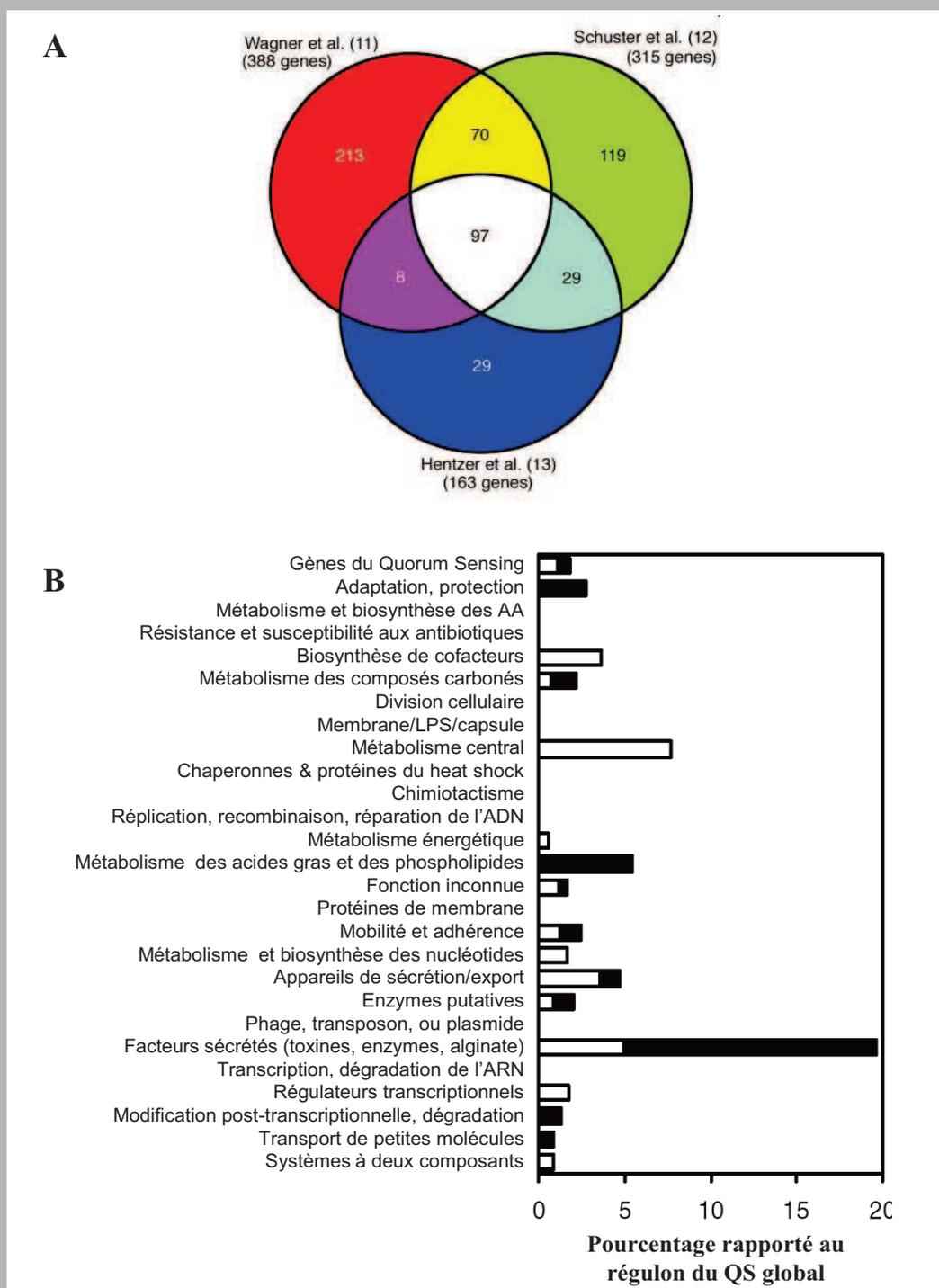
#### I.3.5.4. Autres facteurs

La pyoverdine est un sidérophore (protéine chélatrice de fer environnant) qui joue un rôle dans la virulence en régulant la sécrétion de facteurs de virulence, comme l'exotoxine A, ou l'endoprotéase PrpL (Lamont *et al.*, 2002)).

La pyocyanine est un pigment bleu responsable d'une réponse de pro-inflammatoire chez l'hôte en promouvant l'augmentation d'interleukines 8. Elle est aussi responsable de la diminution de la réponse de l'hôte et de l'apoptose des neutrophiles (Allen *et al.*, 2005; Leidal *et al.*, 2001). Elle participe aussi au stress oxydatif des cellules épithéliales en inactivant les catalases et en oxydant les glutathions (O'Malley *et al.*, 2003; O'Malley *et al.*, 2004).

## **I.4. Adaptabilité/régulation**

L'énorme faculté d'adaptation de *P. aeruginosa* constitue un autre des grands piliers de la pathogénicité de cette bactérie. Les mutations ne sont pas le seul moyen qu'elle possède pour s'adapter à son environnement. Contrairement à certaines bactéries comme *Neisseria meningitidis*, elle est pourvue d'un réseau de régulation très développé, et très complexe. Ainsi 8,4% de ses gènes codent des protéines impliquées dans des voies de régulation (Stover *et al.*, 2000). *P. aeruginosa* possède notamment un réseau complexe de systèmes de régulation variés et intriqués faisant intervenir le *Quorum Sensing* et les systèmes de régulation à deux composants.



- Figure 19 -

### Régulon du Quorum Sensing.

(A) Comparaison des gènes induits par le QS dans 3 études transcriptomiques indépendantes (*Schuster et al., 2003* ; *Wagner et al., 2003* ; *Hentzer et al., 2003*)

(B) Classification fonctionnelle des 97 gènes en communs dans les trois études. Les barres blanches correspondent aux gènes induits principalement par Las, les barres noires aux gènes induits principalement par Rhl.

(D'après *Schuster & Greenberg, 2006*)

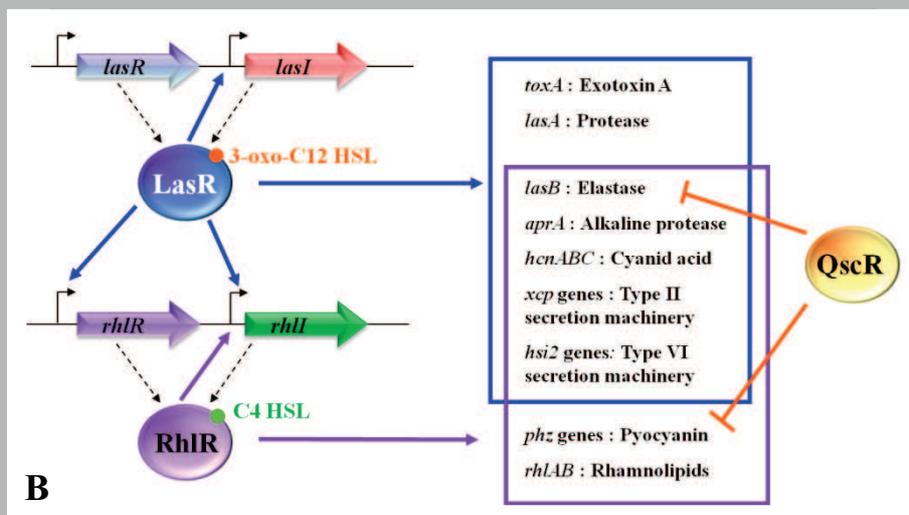
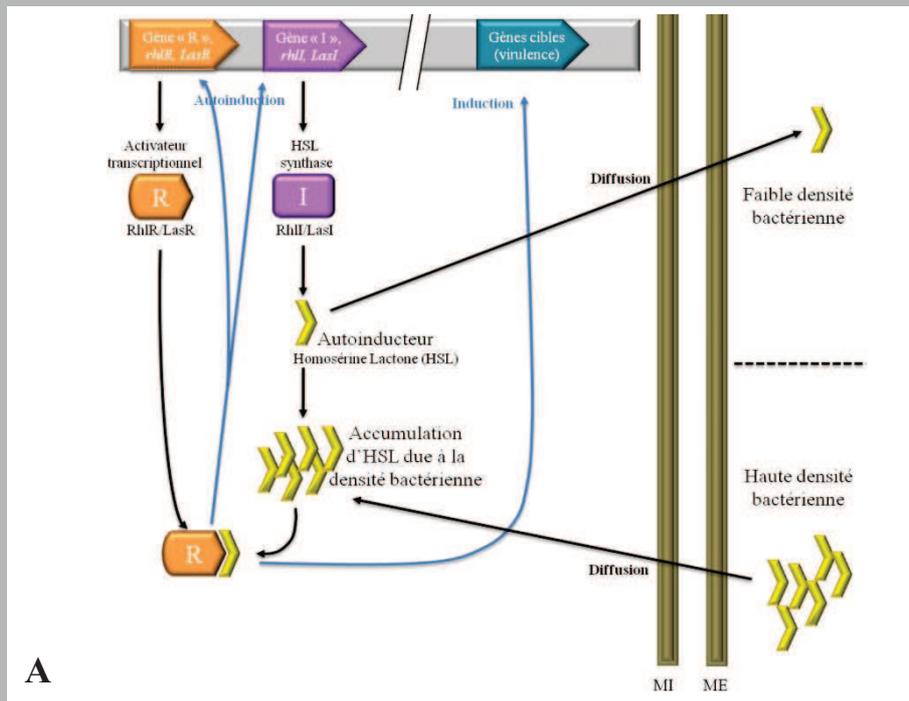
#### I.4.1. Le Quorum Sensing

Le *Quorum Sensing* (QS) est défini comme un mode de communication intercellulaire permettant à une population bactérienne de percevoir sa densité à l'aide de petites molécules chimiques appelées molécules signal, autoinducteurs (AI) ou phéromones.

Il s'agit d'un mécanisme de régulation global employé par *P. aeruginosa* pour induire l'expression d'une centaine de gènes (Fig.19A) en fonction de sa phase de croissance, en réponse à la densité de la population (Hentzer *et al.*, 2003; Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003). Hormis les gènes codant le SST3 qui sont réprimés par le QS (Bleves *et al.*, 2005), on retrouve parmi les gènes induits un grand nombre de facteurs de virulence (Fig.19B). Chez les bactéries à Gram négatif, l'AI est généralement une homosérine lactone (HSL) et fait intervenir un couple de protéines de type LuxR-I de *Vibrio fischeri* (Fuqua *et al.*, 1996). Les HSLs sont produites grâce à l'activité d'une homosérine lactone synthase de type LuxI ou protéine I. Une fois synthétisées, les HSLs sont progressivement relarguées dans le milieu extracellulaire. Au cours de la croissance bactérienne, la concentration en HSL dans le milieu extracellulaire augmente jusqu'à atteindre une concentration seuil qui va déclencher une réponse coordonnée de l'ensemble de la population bactérienne. A ce moment-là, au niveau moléculaire, l'HSL se lie au régulateur transcriptionnel, de type LuxR ou protéine R, qui va alors réguler l'expression d'un ensemble de gènes cibles (Fig.20A). Ainsi toutes les cellules de la population bactérienne initient une action concertée et coordonnée.

*P. aeruginosa* possède deux systèmes complets de QS, le système LasR/LasI (Gambello & Iglewski, 1991) et le système RhlR/RhlI (Latifi *et al.*, 1995; Ochsner *et al.*, 1994). L'HSL du système Las est la 3-oxo-C12-HSL, et celle du système Rhl est la C4-HSL. Le phénomène a été décrit par le terme d'autoinduction car les systèmes Las et Rhl induisent, entre autres, l'expression des gènes *lasR/lasI* et *rhlR/rhlI*. De plus, il existe une cascade de régulation entre ces deux systèmes : LasR lié au C12-HSL est capable d'activer l'expression des gènes *rhlR/rhlI* (Latifi *et al.*, 1996) (Fig.20B).

Il existe un régulateur orphelin, homologue à LasR et RhlR, qui n'a pas de synthase d'HSL associée, le régulateur QscR (Chugani *et al.*, 2001). QscR semble retarder l'activation de plusieurs gènes contrôlés par QS (Chugani *et al.*, 2001), probablement en formant des hétérodimères avec LasR ou RhlR (Ledgham *et al.*, 2003). Par ailleurs, QscR est également capable de fonctionner en tant qu'activateur transcriptionnel en utilisant l'HSL du système



- Figure 20 -

### Le quorum-sensing chez les bactéries à Gram négatifs

(A) La protéine de type I (HSL synthase) produit l'HSL, qui peut diffuser à travers les membranes. A faible densité bactérienne, la concentration en HSL dans le milieu extracellulaire est faible. A forte densité bactérienne, la concentration en HSL est suffisamment élevée pour que la diffusion des HSL à travers les membranes permettent la liaison entre une HSL et une protéine de type R. Il y a alors une activation des gènes cibles, doublée d'une autoinduction, qui amplifie le mécanisme de régulation. MI = Membrane Interne ME = Membrane Externe. (B) Cascade de régulation entre les systèmes Las et Rhl de *P. aeruginosa*. Une partie des gènes régulés par ces systèmes sont indiqués.

(Adapté de Kipnis et al., 2006)

Las, et contrôle un régulon spécifique qui chevauche partiellement les régulons de LasR et RhlR (eux-mêmes chevauchants) (Lee *et al.*, 2006b; Lequette *et al.*, 2006). Ainsi, la capacité de QscR à former des hétérodimères inactifs ne semble pas être son seul mode d'action.

Une quatrième protéine de type R a été décrite, le régulateur transcriptionnel VqsR. Ce dernier est atypique puisqu'il ne possède pas le domaine de liaison de l'HSL. VqsR est cependant essentiel à la production d'HSL et à l'expression d'un grand nombre de gènes régulés par le QS (Juhas *et al.*, 2004).

Enfin, la protéine RsaL, dont le gène est localisé entre les gènes *lasR* et *lasI*, joue un rôle dans la régulation par QS (de Kievit *et al.*, 1999). RsaL est activée par la C12-HSL, et son expression est induite par LasR. Pour autant, elle réprime l'expression du gène *lasI* en se liant sur son promoteur, vraisemblablement de manière compétitive avec LasR (Rampioni *et al.*, 2006).

Le QS est donc un mécanisme de régulation global faisant intervenir des niveaux de contrôle complexes et très fins.

#### I.4.2. Les systèmes de régulation à deux composants

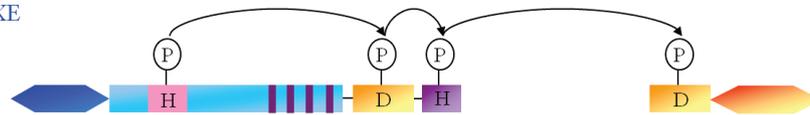
Si le QS permet de coupler l'expression de certains gènes à la densité cellulaire au sein d'une population bactérienne, les systèmes de régulation à deux composants (TCS pour Two-Component System) permettent de percevoir l'environnement et d'adapter la réponse cellulaire en fonction de ces signaux environnementaux.

Dans le cas des systèmes dits « classiques », ces signaux sont perçus par le domaine de détection d'une protéine souvent membranaire, dite senseur (Fig.21). Ce stimulus induit une cascade de phosphorylation (au niveau de résidus Histidine et Aspartate) depuis le domaine transmetteur du senseur jusqu'au domaine receveur d'une seconde protéine nommée régulateur de réponse (RR). La phosphorylation du domaine receveur du RR déclenche l'activation de son domaine effecteur, avec pour conséquence une réponse cellulaire en adéquation avec le signal perçu. Le plus souvent le RR est un régulateur transcriptionnel capable de se lier à l'ADN. Dans d'autres cas, le RR possède une activité enzymatique régulée par phosphorylation de son domaine receveur.

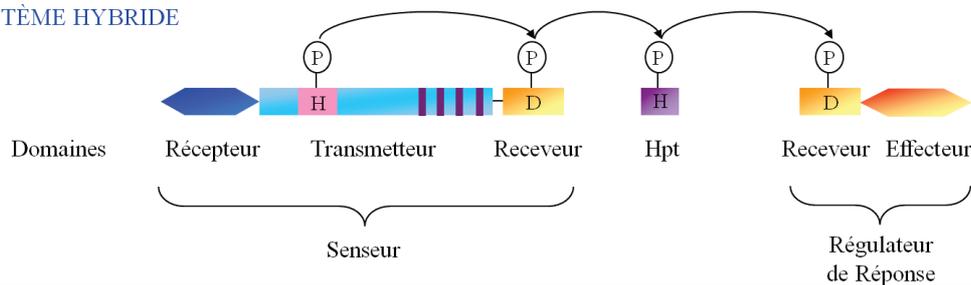
SYSTÈME CLASSIQUE



SYSTÈME NON ORTHODOXE



SYSTÈME HYBRIDE



- Figure 21 -

Les différents systèmes de régulation à deux composants

Senseur/Régulateur

Processus régulé(s)

Référence(s)

FimS/AlgR	Alginate, « Twitching motility »	Whitchurch <i>et al.</i> , 1996; Ma <i>et al.</i> , 1998
KinB/AlgB	Alginate	Ma <i>et al.</i> , 1997
RocS1/RocA1/RocR	Fimbriae, Biofilm, Sécrétion de type III	Kulasekara <i>et al.</i> , 2005; Kuchma <i>et al.</i> , 2005
PprA/PprB	Motilité, Gènes de virulence, Quorum sensing, Perméabilité membranaire	Dong <i>et al.</i> , 2005; Wang <i>et al.</i> , 2003
PilS/PilR	Pili de type IV	Hobbs <i>et al.</i> , 1993
FleS/FleR	Assemblage du flagelle	Ritchings <i>et al.</i> , 1995
PhoQ/PhoP	Résistance aux peptides antimicrobiens	Macfarlane <i>et al.</i> , 1999, 2000
PmrB/PmrA	Résistance aux peptides antimicrobiens	McPhee <i>et al.</i> , 2003
CzcS/CzcR	Résistance aux métaux lourds	Perron <i>et al.</i> , 2004
RoxS/RoxR	Résistance à l'acide cyanidrique	Comolli & Donohue, 2002
RetS	Facteurs de virulence dont sécrétion de type III, Type VI, Biofilm	Goodman <i>et al.</i> , 2004; Laskowski <i>et al.</i> , 2004; Zolfaghar <i>et al.</i> , 2005
LadS	Sécrétion de type III et Effecteurs, Biofilm	Ventre <i>et al.</i> , 2006
GacS/GacA	Facteurs de virulence, Biofilm, Quorum sensing	Tan <i>et al.</i> , 1999; Reimmann <i>et al.</i> , 1997; Kay <i>et al.</i> , 2006
PirS/PirR	Acquisition du fer	Hobbs <i>et al.</i> , 1993
PfeS/PfeR	Acquisition du fer	Dean <i>et al.</i> , 1993

- Figure 22 -

Exemples de systèmes à deux composants de *P. aeruginosa* et processus régulés

La cascade de phosphorylation peut être plus complexe et faire intervenir des domaines phosphorylables additionnels, présents soit sur des protéines indépendantes, les Hpts (Histidine phosphotransfer), soit sur le senseur lui-même. Ces systèmes sont respectivement appelés « systèmes hybrides » ou « non orthodoxes » (Fig.21).

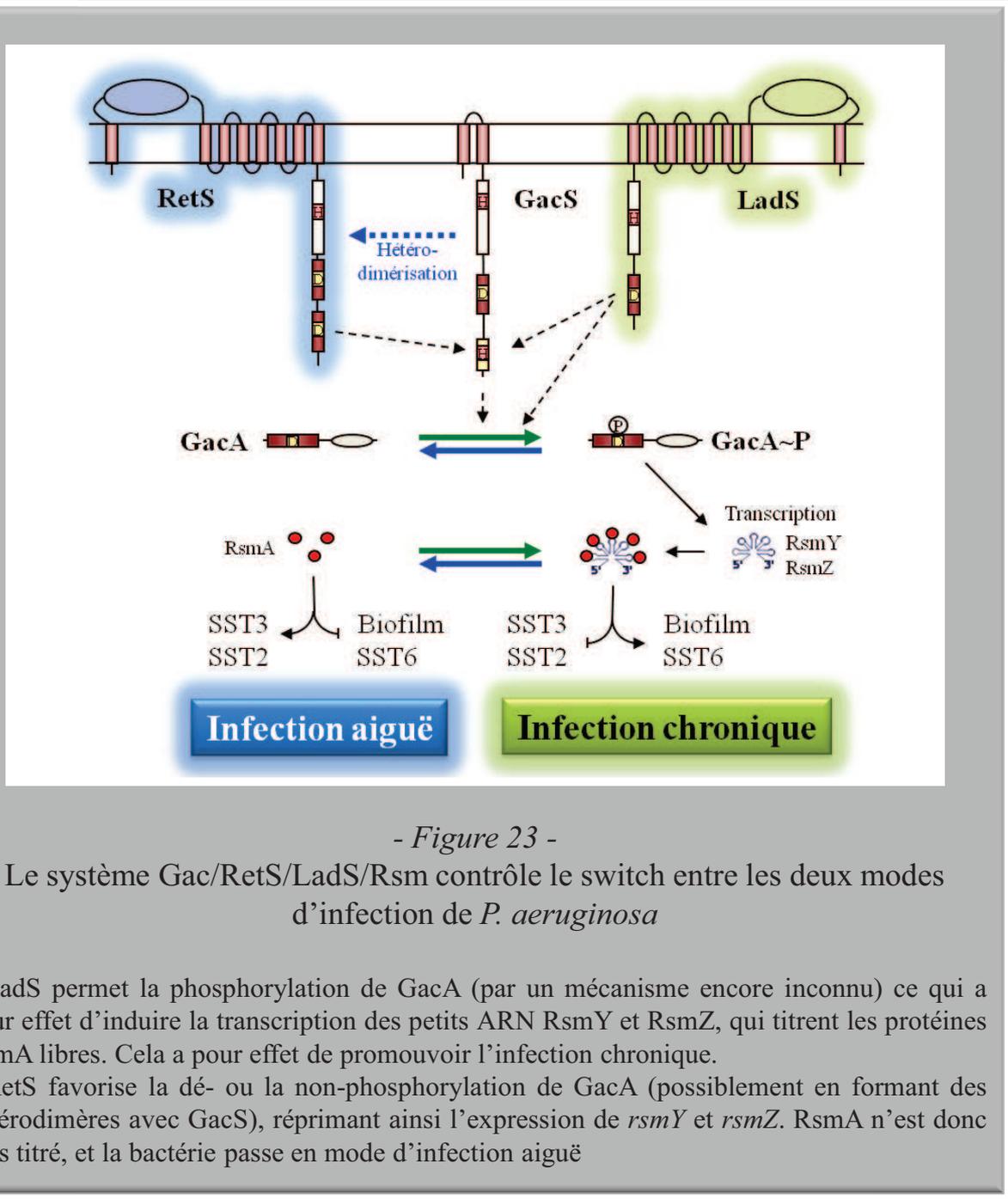
La recherche systématique des TCSs au sein du génome de *P. aeruginosa* a permis l'identification de 63 senseurs, 64 RRs, et 3 Hpts (Rodrigue *et al.*, 2000).

Les TCSs ont un rôle dans de nombreux processus physiologiques dont le chimiotactisme, le métabolisme, mais également dans la régulation de nombreux facteurs de virulence dont quelques exemples sont répertoriés dans le tableau de la figure 22. Voici une présentation succincte de quelques TCSs, impliqués dans la régulation de la virulence de *P. aeruginosa*, et choisis pour en avoir entendu parler par mes collègues de laboratoire.

#### I.4.2.1. Le système GacS/GacA/RsmAZY

Appelé ainsi pour « global activation of antibiotic & cyanide synthesis », il constitue l'une des voies de régulation des facteurs de virulence les mieux caractérisées du genre *Pseudomonas* (Parkins *et al.*, 2001; Rahme *et al.*, 1995; Reimmann *et al.*, 1997). C'est un régulateur majeur de la virulence impliqué dans un très grand nombre de mécanismes au cours de l'infection chez de nombreux hôtes. Ainsi GacS et GacA sont requises pour la virulence de *Pseudomonas* sur les plantes (*A. thaliana*), le nématode (*Caenorhabditis elegans*), les insectes (*Drosophila melanogaster*, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*), et au cours de l'infection aiguë chez la souris (Gooderham & Hancock, 2009). Ce système est imbriqué dans un système de régulation complexe qui contrôle le switch entre les deux modes d'infection de *P. aeruginosa* : l'infection aiguë ou l'infection chronique (Fig.23). Il réprime indirectement le SST3 (Soscia *et al.*, 2007), et est impliqué dans l'installation d'une infection chronique (Coleman *et al.*, 2003). GacA contrôle l'expression de *lasR*, *rhlR* et *qscR*, ainsi que la production de C4-HSL (Reimmann *et al.*, 1997).

Le régulateur GacA active la transcription de deux petits ARN non codants, similaires à 72 %, RsmZ (117 nucléotides) et RsmY (124 nucléotides) (Fig.23). RsmZ et RsmY activent ou répriment indirectement l'expression de nombreux gènes en titrant RsmA (regulator of second metabolism). Cette petite protéine exerce une régulation globale post-transcriptionnelle en se liant sur les ARNm, en contrôlant l'accès au site de fixation du



- Figure 23 -

Le système Gac/RetS/LadS/Rsm contrôle le switch entre les deux modes d'infection de *P. aeruginosa*

- LadS permet la phosphorylation de GacA (par un mécanisme encore inconnu) ce qui a pour effet d'induire la transcription des petits ARN RsmY et RsmZ, qui titrent les protéines RsmA libres. Cela a pour effet de promouvoir l'infection chronique.

- RetS favorise la dé- ou la non-phosphorylation de GacA (possiblement en formant des hétérodimères avec GacS), réprimant ainsi l'expression de *rsmY* et *rsmZ*. RsmA n'est donc plus titré, et la bactérie passe en mode d'infection aiguë

ribosome et empêchant ainsi la traduction de différents facteurs de virulence. RsmA régule négativement la production de HSLs et agit donc comme un régulateur transcriptionnel pléiotrope direct et indirect *via* la modulation du circuit du QS (Pessi *et al.*, 2001). Il inhibe ainsi la production de pyocyanine, de l'élastase et de la lectine LecA, et il régule positivement la production de lipase, de rhamnolipides, et la mobilité par swarming.

#### I.4.2.2. Le senseur RetS

RetS (regulator of exopolysaccharide & Type III secretion sensor) est un senseur hybride qui possède un domaine kinase et deux domaines receveurs non équivalents de régulateur de réponse, disposés en tandem (Fig.23). RetS agit inversement à GacS/GacA (Goodman *et al.*, 2004). Il semble que RetS interagisse directement avec GacS en formant des hétérodimères qui empêcheraient le phosphorelai entre GacS et GacA (Fig.23) (Goodman *et al.*, 2009). Des données de transcriptome suggèrent que RetS : (i) réprime la transcription de plusieurs systèmes impliqués dans la formation du biofilm comme les opérons *pel* et *psl*, et H1-T6SS et ses substrats ; (ii) active l'expression des gènes du SST3, du SST2, de la lipase A, de l'exotoxine A et de l'assemblage des *pili* de type IV (Fig.23) (Goodman *et al.*, 2004). Ainsi, un mutant *retS* est caractérisé par un phénotype hyper-biofilm dû en partie à la surexpression de l'opéron *psl* (Goodman *et al.*, 2004). RetS est donc impliqué dans le swithch entre les deux modes d'infection et favorise la phase aiguë.

#### I.4.2.3. Le senseur LadS

LadS (lost adherence sensor) est un senseur hybride qui agit inversement à RetS. Il régule à la fois les étapes précoces de la formation du biofilm *via* l'activation de l'opéron *pel* et l'inhibition du SST3 (Ventre *et al.*, 2006). LadS est un composant du système GacS/GacA/RsmYZ et la transcription de *rsmZ* est inhibée dans un mutant *ladS* (Fig.23). Le mode d'action n'est pas encore défini, mais il est possible que LadS active GacA *via* le domaine Hpt H2 de GacS.

A l'inverse de RetS, LadS promeut donc des infections chroniques.



Voici donc une présentation succincte de plusieurs traits de caractère de *P. aeruginosa* liés à son mode de vie et sa pathogénicité. Mais comme je l'ai souligné en début de ce chapitre d'Introduction, ces aspects ne concernent pas ou très peu le travail que j'ai effectué. Le sujet qui m'a été confié au cours de ma thèse consistait en la caractérisation et l'étude de la sécrétion de protéines homologues à l'effecteur de type III ExoU, qui est la première patatin-like protein (PLP) bactérienne identifiée. Le chapitre II de cette Introduction présente les connaissances actuelles sur les protéines de la famille des patatines.



## II. Que sont les patatines et les Patatin-like proteins (PLPs) ?

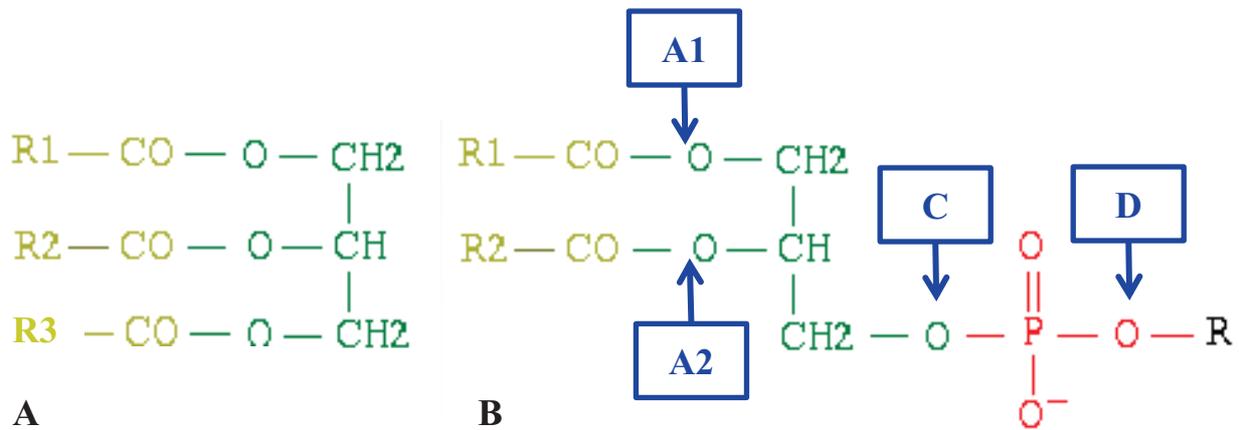
---

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à des protéines homologues à ExoU, une protéine de *P. aeruginosa* qui a la particularité de posséder un domaine avec des motifs eucaryotes : le domaine patatine. Cette Patatin-like protein (PLP) est la première PLP bactérienne à avoir été décrite. Ce chapitre est consacré à la présentation des patatines et autres PLPs.

### II.1. Les Patatines

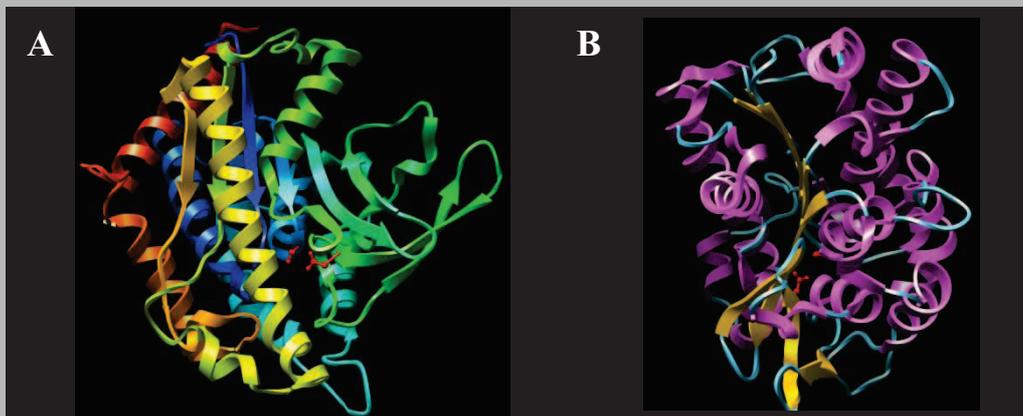
#### II.1.1. Définition

Les patatines sont des protéines qui tirent leur nom de l'organisme dans lequel elles furent identifiées. Dès 1896, Osborne et Campbell rapportèrent que la protéine la plus abondante des pommes de terre (*Solanum tuberosum*) était une globuline, et ils la nommèrent « tuberine » (Shewry, 2003). Elle fut rebaptisée « patatine » en 1980, suite à l'étude de Racusen et Foote qui déterminèrent sa taille (45 kDa environ). Les patatines représentent 40 à 45% de la masse totale des protéines solubles chez ces tubercules (Paiva *et al.*, 1983) et sont des protéines de stockage (*i.e.* des protéines dont le rôle est de stocker des éléments tels le carbone, le soufre ou l'azote, pour survivre durant les périodes hostiles). Elles sont glycosylées avec des complexes glycosyl composés notamment de xylose, fucose, mannose et N-acétylglucosamine (Racusen & Foote, 1980; Sonnewald *et al.*, 1989a). Elles sont localisées dans des vacuoles, ce qui est en concordance puisque la N-glycosylation intervient dans l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (Sonnewald *et al.*, 1989b). Des homologues de patatines sont retrouvés chez de nombreux végétaux, les mammifères, les parasites ou bien encore les bactéries.



- Figure 24 -  
Triglycérides (A) et phospholipides (B)

Le squelette glycérol est représenté en vert, les acides gras en jaune, le groupement phosphate en rouge. Une phospholipase A1, A2, C ou D coupe au niveau indiqué par les flèches bleues. R1, R2, R3 représentent des chaînes alkylées qui peuvent être de différentes tailles, saturées ou insaturées. R représente les groupement spécifique aux phospholipide (comme la choline, la sérine, ou l'éthanolamine).



- Figure 25 -  
Structure de la patatine Pat17

(A) Structure tertiaire de la patatine végétale Pat17 (Rydel *et al.*, 2003). La coloration du bleu au rouge représente l'orientation de l'extrémité N→C-terminale. Les résidus de la dyade Ser-Asp sont représentés en rouge.

(B) Pat17 est organisée en 3 couches,  $\alpha/\beta/\alpha$ . Les hélices  $\alpha$  sont représentées en mauve, les brins  $\beta$  en orange, les éléments non structurés en bleu.

### II.1.2. Activité

L'activité de ces protéines a été rapportée pour la première fois dans des études anciennes (Galliard, 1971; Racusen, 1984; Racusen, 1986). Il avait été observé une activité lipase et estérase envers différents types de substrats lipidiques. Ces deux activités catalysent l'hydrolyse des liaisons esters de substrats de types mono-, di-, et triglycérides ou phospholipides, libérant ainsi des acides gras et du glycérol (Fig.24). Les lipases catalysent la libération d'acides gras de grandes tailles alors que les estérases agissent préférentiellement sur des substrats à chaînes courtes (Arpigny & Jaeger, 1999; Jaeger *et al.*, 1994).

D'autres études sont venues par la suite compléter notre compréhension de l'activité des patatines. Il a été montré qu'elles ont une activité plus efficace avec des chaînes de 10 et 16 carbones sur les esters *p*-nitrophényles (*p*NP) (Andrews *et al.*, 1988). Elles sont aussi capables d'agir sur les phospholipides, avec des acides gras de 16 et 18 carbones, et l'activité PLA<sub>2</sub> est plus efficace que l'activité phospholipase A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) (*i.e.* les acides gras greffés en position *sn*-2 sont préférentiellement libérés que ceux positionnés en *sn*-1) (Fig.24B) (Andrews *et al.*, 1988; Senda *et al.*, 1996).

Une étude de 2001 proposait que l'activité des patatines soit portée par une dyade catalytique, composée d'une Sérine et d'un Aspartate (Hirschberg *et al.*, 2001). Leur hypothèse de travail se basait sur (i) l'homologie établie entre les patatines et la PLA<sub>2</sub> cytosolique (cPLA<sub>2</sub>) humaine, à l'aide d'alignements de séquences, (ii) la résolution de la structure de la cPLA<sub>2</sub> humaine, qui montrait un type de site actif nouveau pour l'époque, une dyade catalytique Ser-Asp (Dessen *et al.*, 1999).

Cette proposition fut confirmée par la résolution de la structure de la patatine Pat17 (Rydel *et al.*, 2003) (Fig.25A). Cette structure, qui est d'ailleurs la seule structure de patatine résolue à ce jour, identifie non seulement les résidus de la dyade, mais montre également que l'agencement général de la structure est organisé en trois couches  $\alpha/\beta/\alpha$  (Fig.25B). A contrario, le repliement des lipases classiques est de type  $\alpha/\beta$ , et leur activité est portée par une triade catalytique de type Ser-Asp-His. Les patatines constituent donc une famille de protéines à activité lipolytique distinctes des autres.



### II.1.3. Rôle dans la réponse aux stress et infections

Les patatines ont une double fonction. La première est évidemment leur rôle de stockage. La seconde est liée à l'activité lipolytique. Plusieurs études ont rapporté que les patatines jouaient un rôle dans la défense de la plante lors d'infections ou de stress. Lorsque des patatines sont ajoutées au régime alimentaire de larves de coléoptères *Diabrotica* spp., la croissance de ces larves est inhibée (Strickland *et al.*, 1995). Que ce soit chez la plante d'étude modèle *A. thaliana*, ou chez des plants de tabac, des gènes codants des patatines voient leur expression augmentée lors de stress générés par des infections fongiques, virales ou bactériennes (Dhondt *et al.*, 2000; Dhondt *et al.*, 2002; Narusaka *et al.*, 2003a).

Des résultats un peu moins marqués sont observés concernant des stress abiotiques. Parmi les molécules majeures impliquées dans les signaux de défense des végétaux contre les infections, on compte l'acide salicylique, l'éthylène, et le jasmonate. L'effet de ces substances, de quelques autres (acide salicylique, éthylène, méthyl-jasmonate, fer, cuivre) et de stress environnementaux (blessure physique, froid, UV, déshydratation) ont été testés (Dhondt *et al.*, 2000; Dhondt *et al.*, 2002; La Camera *et al.*, 2005; Matos *et al.*, 2001; Narusaka *et al.*, 2003a; Narusaka *et al.*, 2003b). Ces études ont tour à tour rapporté que la plupart de ces stimuli étaient capables, et incapables, d'induire l'expression de ces gènes. Il est donc difficile de conclure définitivement sur l'influence réelle de ces stimuli.

Il faut néanmoins considérer ces résultats avec précaution car ils proviennent parfois d'organismes différents, et qui possèdent généralement plusieurs copies de gènes codant des patatines. Il y a donc potentiellement une redondance fonctionnelle entre ces différents paralogues. De plus, la présence de plusieurs paralogues sur un génome peut conduire à une spécialisation des protéines correspondantes. Cela peut se traduire par une différenciation dans la régulation (avec mise en place d'un réseau très fin), et/ou dans le processus dans lequel chaque copie est impliquée. Il apparaît cependant de manière générale que lorsque la plante est confrontée à un stress, des gènes de patatines sont induits.

Il est également possible de mesurer l'augmentation de l'activité PLA<sub>2</sub> à la suite de ces stress, révélée par une libération d'acides gras, qui vont pouvoir être oxydés, formant ainsi des oxylipines, molécules précurseurs du jasmonate. L'accumulation de jasmonate a par ailleurs été observée après infection, confirmant ainsi qu'une infection provoque l'augmentation d'une activité PLA<sub>2</sub> (Dhondt *et al.*, 2000; Dhondt *et al.*, 2002).



Cependant, la conséquence de l'activité des patatines dans de telles situations est plutôt mal comprise. Il a en effet été rapporté que dans le cas d'*A. thaliana*, le gène *PLP2* est induit après infection par le champignon *Botrytis cinerea* ou par *Pseudomonas syringae* (La Camera *et al.*, 2005). Cependant, la protéine PLP2, ici, est responsable d'une plus grande sensibilité à l'infection, et permet une meilleure propagation de l'infection. Inversement, les auteurs de cette étude ont montré que cette même protéine permettait la résistance d'*A. thaliana* à l'infection par un parasite, *Cucumber mosaic virus* (La Camera *et al.*, 2009). On a donc ici un exemple précis d'une protéine qui va avoir deux effets à priori antagonistes dans deux cas d'infections différents.

Il semble finalement que l'implication des patatines dans la défense du végétal, rôle lié à leur activité lipolytique, soit imbriquée dans un réseau de signalisation très complexe, permettant lors de situations représentant un stress pour l'organisme végétal d'induire soit la survie, soit la mort de cet organisme.

## **II.2. Les PLPs eucaryotes**

Si les patatines sont présentes chez un grand nombre de végétaux, on trouve néanmoins de nombreuses PLPs dans l'ensemble du règne du vivant, notamment chez au moins un parasite (*Toxoplasma gondii*), chez les bactéries (ce qui sera détaillé dans les prochains paragraphes) et chez les mammifères (en l'occurrence chez l'homme et la souris).

### **II.2.1. Les PLPs humaines**

Le génome humain code pour 9 PLPs, appelées PNPLA 1 à 9 (pour patatin-like phospholipase domain containing) dans notre organisme. Elles possèdent une activité acyl hydrolase, et elles semblent jouer un rôle important dans plusieurs processus physiologiques, comme l'ont montrées diverses études menées sur la souris (Kienesberger *et al.*, 2009). De manière générale, ces protéines sont présentes dans de nombreux tissus ou organes, mais les mutants permettent d'avoir une idée sur leur rôle prépondérant dans l'organisme.



Très peu de données sont connues sur PNPLA1. Les autres sont en revanche un peu mieux caractérisées. Certaines ont une activité PLA<sub>2</sub>, d'autres une activité lysophospholipase A (LPLA).

PNPLA2, PNPLA3, PNPLA5 et PNPLA7 sont régulées en fonction de l'état nutritionnel (jeûne, différenciation en adipocytes, relation avec l'insuline et le foie, expression dans les tissus adipeux). Elles semblent jouer un rôle dans le processus de l'obésité et le contrôle de l'état énergétique des cellules (stockage/dégradation des triglycérides).

Des mutations ou des mutants de PNPLA6 et PNPLA9 provoquent (entre autres) des maladies d'ordre neurologique (paralysie, maladies neuro-dégénératives). PNPLA6 est d'ailleurs la première cible identifiée de l'empoisonnement aux organo-phosphates.

PNPLA4 pourrait contribuer à la morphogénèse de l'épiderme. PNPLA8 est principalement retrouvée dans le cœur, et serait associée au maintien de l'intégrité mitochondriale. Sa mutation est responsable de problèmes cardiaques diverses.

### II.2.2. La phospholipase A<sub>2</sub> cytosolique humaine (cPLA<sub>2</sub>)

Cette protéine est une enzyme qui possède une activité similaire à celle des patatines. Elle hydrolyse les phospholipides de la membrane grâce à son activité hautement spécifique envers les phospholipides qui contiennent un acide arachidonique en position *sn*-2 (Clark *et al.*, 1991; Hanel *et al.*, 1993). Son site actif est également constitué d'une dyade Sérine-Aspartate et il est obstrué par un couvercle extrêmement flexible qui peut se déplacer pour laisser le substrat accéder à la poche catalytique (Dessen *et al.*, 1999). Cette dyade constitue un élément tout à fait intéressant qui différencie cette protéine des lipases traditionnelles de type  $\alpha/\beta$ , dont le mécanisme repose sur une triade catalytique Sérine-Aspartate-Histidine.

La cPLA<sub>2</sub> est activée par phosphorylation et par la mobilisation du calcium intracellulaire (Lin *et al.*, 1993; Qiu *et al.*, 1998). Cela entraîne sa translocation à la membrane nucléaire où elle est colocalisée avec les cyclooxygénases et lipoxygénases qui métabolisent l'arachidonate libéré par la cPLA<sub>2</sub> en prostaglandines et leukotriènes (molécules de la famille des eicosanoïdes) (Glover *et al.*, 1995; Schievella *et al.*, 1995). Elle est considérée comme une enzyme centrale dans le métabolisme des eicosanoïdes et joue un rôle majeur dans le processus des maladies inflammatoires : la délétion du gène codant la cPLA<sub>2</sub>



chez la souris réduit les effets de nombreuses maladies inflammatoires (Burke & Dennis, 2009; Uozumi & Shimizu, 2002).

### II.2.3. Un exemple chez les parasites

Il a été observé chez le parasite *T. gondii*, agent de la toxoplasmose, qu'un gène codant une PLP, *TgPL1*, était responsable de la survie du parasite dans des macrophages activés (Mordue *et al.*, 2007). La protéine codée par ce gène, TgPL1, permet en effet de supprimer l'oxyde nitrique produit par le macrophage activé. Elle n'est en revanche pas nécessaire pour la survie du parasite dans les macrophages naïfs.

Cependant, le domaine patatine de cette protéine est muté : le résidu Sérine de la dyade catalytique est ici remplacé par une Glycine, prévenant ainsi toute activité. Par conséquent, cette PLP joue ici probablement plus le rôle de protéine de stockage qui permet au parasite de survivre lors de conditions de stress physiologique, comme lors de l'activation des macrophages par exemple.

## II.3. Les PLPs bactériennes

### II.3.1. Définition/représentation

La découverte chez *P. aeruginosa* d'une protéine bactérienne d'un nouveau genre (ExoU) (Finck-Barbancon *et al.*, 1997; Hauser *et al.*, 1998) a soulevé quelques interrogations. « Nouveau genre » car cette protéine possède un domaine habituellement retrouvé sur des protéines eucaryotes, à savoir un domaine « patatine ». ExoU est donc une protéine à activité lipolytique, activité portée par la même dyade catalytique Ser/Asp que celle retrouvée chez les patatines végétales ou les PLPs eucaryotes.

Afin d'établir si ExoU et son domaine « patatine » inhabituel pour une protéine procaryote représentent un cas isolé dans le règne bactérien, Banerji et Flieger ont mené une analyse *in silico* sur l'ensemble des protéomes bactériens disponibles en 2004 (123 protéomes) afin d'identifier des homologues d'ExoU (Banerji & Flieger, 2004). Pour ce faire,

No.	Organism	Name of PLP and function	Gi no.	Δ	Block I (oxyanion hole)
1	<i>Solanum tuberosum</i>	Patatin B2, lipid acyl hydrolase	21510	34	DGGGIRGIIPAIILEF
2	<i>Agaricus arvensis</i> VF5	Conserved hypothetical protein	2985799	17	SGGAARKGIAHIGVLKA
3	<i>Rickettsia prowazekii</i> Miskid E	Unknown protein	3861083	67	SGGSAKGAIIYSGVYEA
4	<i>Shigella flexneri</i> 2a 301	Conserved hypothetical protein	24051538	23	SGGAARGWSHIGVINA
5	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933	Conserved hypothetical protein	12514952	23	SGGAARGWSHIGVINA
6	<i>Salmonella enterica typhimurium</i> LT2	Putative phosphoesterase	16420286	10	SGGAARGWSHIGVKA
7	<i>Salmonella typhi</i> CT18	Conserved hypothetical protein	16760129	10	SGGAARGWSHIGVKA
8	<i>Mycobacterium lipovae</i> TN	Conserved hypothetical protein	13093300	16	QGGGIRGIGLVGAVDA
9	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC 1551	Putative drug transporter	13883156	812	GGGARGFAHIGVLLLE
10	<i>Rattus norvegicus</i> GMI 1000	Probable transmembrane lipoprotein	17428192	57	GGGAARGFAHIGVKA
11	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> MR1	Conserved hypothetical protein	24374365	13	SGGAARKGWAHIGVLNG
12	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Conserved hypothetical protein	26991199	54	SGGAARGLAHIGVLKA
13	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Lai 56601	Conserved hypothetical protein	24214875	313	GGGARALAHVIGLKA
14	<i>Bacillus subtilis</i> C-125	Unknown conserved protein	10175208	13	SGGARGYAHIGVLKV
15	<i>Vibrio vulnificus</i> C.MCP6	Conserved hypothetical protein	27361160	53	AGGGARKGAHIGVLKA
16	<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	Conserved hypothetical protein	4981236	9	AAGGVKGAHTHTAPTFR
17	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC 1551	Conserved hypothetical protein	13880669	19	GGGILAGIAMPVIGVIRG
18	<i>Streptococcus mitis</i> 1021	Conserved hypothetical protein	15074351	44	GGGAARGWAHIGVLKA
19	<i>Citrobacter jejuni</i> TI.S	Conserved hypothetical protein	21647904	15	GGGVVLGAAHIGVLKA
20	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFJ 503099	Hypothetical protein	13471054	41	GGCARGWAHIGVLRA
21	<i>Nocardia novicida</i> Z2491	Possible lipoprotein	7378991	50	GGGASKGFHIVGIIKV
22	<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	Conserved hypothetical protein	9104836	100	GGGAARKGFAHIGVLKM
23	<i>Bacillus subtilis</i> 16M	Putative serine protease	17987191	39	GGGAARGWAHIGVLRA
24	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	Conserved hypothetical protein	15156852	41	GGGAARGWAHIGVLRA
25	<i>Vibrio cholerae</i> N16961 chr. I	Conserved hypothetical protein	9655035	39	AGGGARKGAHMGVLRA
26	<i>Campylobacter crescentis</i> CB15	Conserved hypothetical protein	13423668	322	SGGARAYAHIGAIQA
27	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA103	ExoU, phospholipase A	2429143	109	SGGSAKGAAYFGAMLA

No.	Δ	Block II (serine hydrolase motif)	Δ	Block III (conserved proline)	Δ	Block IV (active site aspartic acid)	Δ	Conserved serine	Δ
1	24	GTSTGGLLTAMITTFENENR	85	MYDICYSTAMAPIYFPP	15	NLVDGAVATVGDPP	28	MLLLSLQCTGN	123
2	12	GVSAGAIIVSVYASGYTPDE	68	LIPVLLGCSSTPGIFEP	6	LLVDGGIVNNL-P	-	-	91
3	14	GSSVGAITAAVVALGTPPKR	120	IALACRASASIPVFKP	6	KYVDGGYRDNL-P	-	-	326
4	12	GCSIGSLVGAAYACDRLS-A	71	LHLAIRASCSIPGLMAP	6	WLVDGAVVNFPI-P	-	-	138
5	12	GCSIGSLVGAAYACDRLS-A	71	LHLAIRASCSIPGLMAP	6	WLVDGAVVNFPI-P	-	-	138
6	12	GCSIGSLVGAAYACDRLS-A	71	LHLAVRASCSMPGLMSP	6	WLVDGAVVNFV-P	-	-	138
7	12	GCSIGSLVGAAYACDRLS-A	71	LHLAVRASCSMPGLMSP	6	WLVDGAVVNFV-P	-	-	138
8	12	GTSAGALVASLIAALQTAGE	109	VARAVHASSAIPYVFEP	6	TVVDGGLLSTP-P	-	-	121
9	12	GTSNGVIVNFGACGMDAAT	70	LVDVIGSLRLEGIYFP	6	LHVDGGVLDNL-P	-	-	100
10	12	GTSAGSVVAALYASGMSGIE	72	TQAVRASCSIPGVFQP	6	QYVDGGLVAFV-P	-	-	107
11	12	GCSVGAIVGAAYAHKFLA-E	71	LKQAVRASCSMPGILAP	6	WLVDGAVVNFV-P	-	-	149
12	12	GTSNGAVVGGLYATGMSAEE	103	LQVIRASMSIPAVFAP	6	LLVDGGMVDNI-P	-	-	511
13	12	GASFGAVIAALYARGENTET	70	VWEALAAAMSLPGMFP	6	LLVDGGVINNV-P	-	-	127
14	12	GSSNGALVASLYGACHPTEH	68	VAEAVRASIALPGIFVP	6	LLVDGGVIDRV-P	-	-	111
15	12	GTSNGAVVGGLYATGMSAEE	102	LVDAMMASMSVPGALFP	6	MLVDGGVNNM-P	-	-	541
16	9	GSSIGAVVGGLYALYGEFAL	78	LIDAVVASSVPGYFEP	6	FSLDGGVLAFT-P	-	-	87
17	19	GTSAGATVAAQTSAGCPPLDT	99	LVDVAASCSVPGAWFP	6	RYMDGGVASSV--	-	-	87
18	12	GTSIGALVGGCYLAGKLD-E	71	LITAIRASIALPGIFEP	6	LLVDGALVNFV-P	-	-	121
19	12	GTSIGSFIAMYPFGKSWRE	68	VATAVMASSTIPGIFEP	6	LLVDGVLTEV-P	-	-	94
20	12	GTSIGALVGGCYLAGKLD-E	71	LITAMRASIALPGVFP	6	MLVDGALVNFV-P	-	-	130
21	12	GTSAGSIVGSLFASGMS PDR	68	AGQAVRASAAIPNVFQP	6	TYVDGGLSQV-P	-	-	99
22	12	GTSAGSVVGGALYASGMSDFK	68	VGEAVRASCSIPGVFEP	6	HYVDGGITSPV-P	-	-	144
23	12	GTSIGALVGGCYLAGKLN-E	71	LVEAMRASIALPGVFP	6	VLVDGALVNFV-P	-	-	122
24	12	GTSIGALVGGCYLAGKLD-E	71	LVTALRSSYALPGIFEP	6	LLVDGALVNFV-P	-	-	121
25	12	GTSNGAVVGGLYATGMSAEE	102	LQVIRASMSVPGALFP	6	WLVDGGVNNM-P	-	-	540
26	12	GASMGAITAAGIAMGWDGGE	70	LQALRASISLPGVLP	6	VLVDGAVMKNF-P	-	-	135
27	14	GGSAAGGITRALLASGMSFAA	149	VAQAHHISGSPGVFQK	15	EFQDGGVMINV-P	-	-	335

- Figure 26 -

### Alignements de PLPs bactériennes

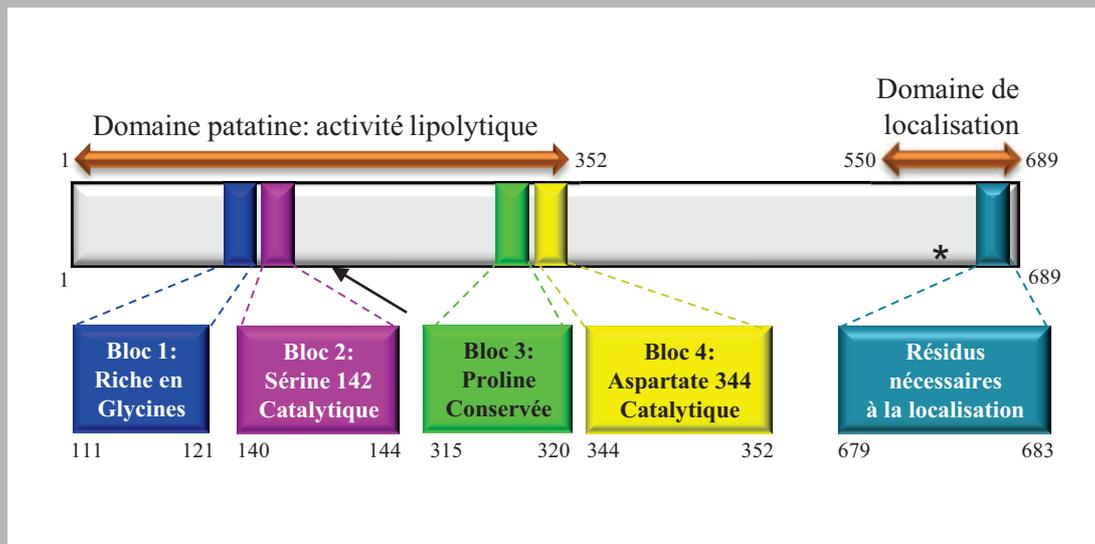
Soixante protéines avec des domaines PLP conservés ont été alignées, et une sélection d'entre elles sont présentées ici. Les résidus conservés dans plus de 80% de ces 60 protéines sont notés en gras. Les résidus de la dyade de la patatine Pat17 sont indiqués par une flèche (Rydel 2003). Δ représente le nombre de résidus entre les blocs conservés.

(D'après Banerji & Fliieger, 2004)

elles ont réalisé un BLAST d'ExoU contre ces banques de données, et elles ont utilisé le mot-clé « patatin » dans l'outil « recherche de texte » du serveur PEDANT, qui analyse les génomes/protéomes à l'aide de différents algorithmes (BLAST, PFAM, PROSITE). Elles obtinrent plus de 200 PLPs putatives, réparties sur 55 des 123 protéomes disponibles. Ces PLPs sont aussi bien retrouvées dans des organismes à Gram positif (*Bacillus sp.*) que négatif (*Yersinia sp.*). Il est intéressant d'observer qu'il y a une surreprésentation au sein des espèces en relation avec un hôte eucaryote, que ce soit chez des pathogènes ou des symbiotes. La présence de protéines possédant ce type de motif eucaryote chez des bactéries en contact étroit avec des hôtes doit certainement conférer un avantage sélectif pour l'interaction et l'adaptation à cet hôte.

Les auteurs ont également défini les caractéristiques communes à ces PLPs bactériennes en réalisant un alignement de 60 d'entre elles grâce à l'algorithme d'alignement multiple CLUSTALW. Cet alignement a permis d'identifier quatre blocs conservés au sein de cette famille de protéines (Fig.26). Le bloc 1 est une zone riche en Glycines qui possède un résidu basique (Lys ou Arg) qui sert probablement d'« oxyanion hole », vraisemblablement impliqué dans la stabilisation de l'état transitionnel du substrat au cours de la réaction enzymatique. Un motif consensus peut être généré : GGGxK/RGxxxxG. Le bloc 2 est composé du motif GxSxG, classiquement retrouvé chez les protéases à Sérine et chez les protéines à activité lipolytique. La Sérine constitue l'élément clé de ce motif, puisqu'elle est un des deux membres de la dyade catalytique. Le bloc 3 est composé d'une Sérine et d'une Proline conservées (A/ISxxxP). La Sérine pourrait jouer un rôle structural important par sa capacité à être phosphorylée ou à former des liaisons hydrogènes. Le bloc 4 comprend l'Aspartate catalytique, et le motif consensus généré est DGG/AxxxxxP. Les deux Prolines conservées dans les blocs 3 et 4 sont probablement des résidus importants pour la conformation et le repliement de la protéine. Ces quatre zones constituent les seules régions pour lesquelles l'identité/similarité peut être détectée, ce qui se traduit notamment par une grande difficulté à repérer les homologues d'ExoU au moyen d'un simple BLAST. Pour preuve, cette étude n'a réussi à identifier qu'une vingtaine de PLPs par le seul moyen du BLAST.

En comparant les quatre blocs avec les motifs des PLPs eucaryotes, on peut dresser un certain nombre de constats : (i) les blocs 1, 2 et 4 sont communs aux deux catégories. Ce sont par leur intermédiaire que les PLPs bactériennes furent annotées en tant que « patatine » ; (ii)



- Figure 27 -  
ExoU de *P. aeruginosa*

Localisation des régions importantes pour l'activité d'ExoU. Les numéros indiqués font référence au premier ou dernier résidu inclus du domaine/bloc concerné. La flèche indique la Lysine 178 qui subit une diubiquitination. L'astérisque indique la Leucine 618, qui semble impliquée dans l'activation d'ExoU par la SOD (Schmalzer *et al.*, 2010)

le bloc 3 est lui unique aux PLPs bactériennes, les eucaryotes arborant à la place le motif AAP ; (iii) un domaine additionnel est conservé au travers des PLPs eucaryotes, situé après le bloc 4 (Hirschberg *et al.*, 2001) qui est absent chez les PLPs bactériennes. On peut donc observer qu'il existe des caractéristiques communes et diverses entre ces deux familles de protéines.

Enfin, il est intéressant de noter que la plupart des cas, les PLPs bactériennes sont multi-domaines. Par exemple, des protéines possèdent un domaine N-terminal additionnel qui pourrait lier les nucléotides cycliques (*Caulobacter crescentus* gi13423668), pour d'autres un domaine C-terminal additionnel possède un domaine de type « bacterial surface antigen » (*V. cholerae* gi9655035) (Banerji & Flieger, 2004), ou la protéine ExoU de *P. aeruginosa*, dont le domaine C-terminal joue un rôle dans la localisation de la protéine (v. § II.3.2.4.1).

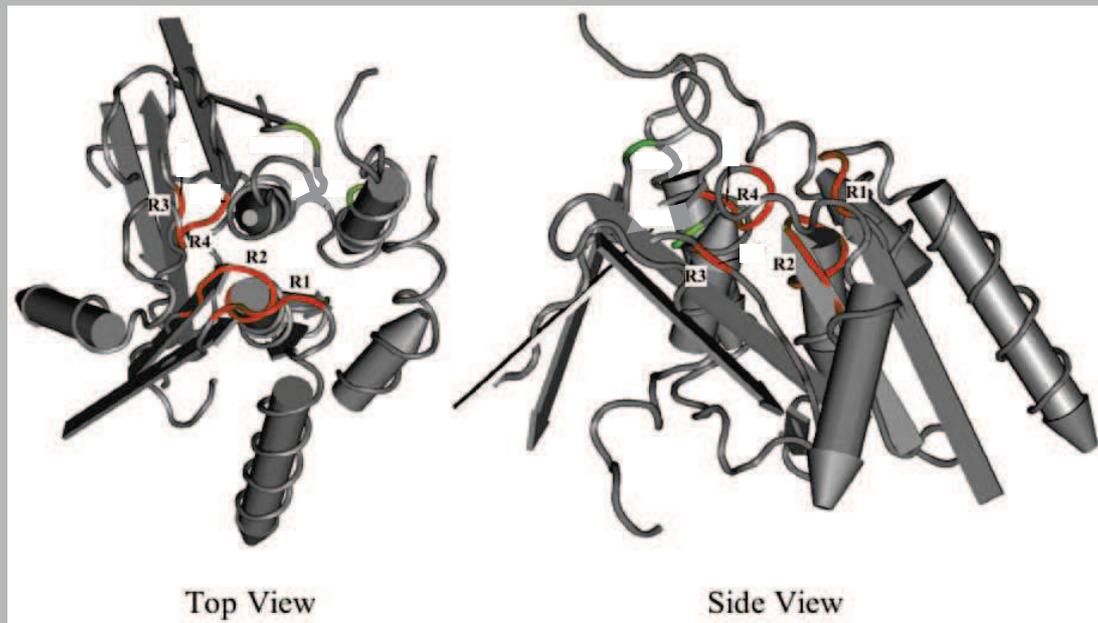
### II.3.2. ExoU de *P. aeruginosa*

ExoU est la première PLP découverte chez un organisme bactérien. Elle a été identifiée parallèlement par deux équipes, dans des souches cliniques et dans la souche d'étude PA103 de *P. aeruginosa* (Finck-Barbancon *et al.*, 1997; Hauser *et al.*, 1998). Cette protéine confère une très grande cytotoxicité aux souches la produisant.

#### II.3.2.1. Organisation et description

ExoU est une protéine de 689 résidus, au poids moléculaire de 74 kDa. De manière semblable aux autres effecteurs de type III, ExoU ne possède pas de peptide signal. En revanche, ses six premiers résidus sont identiques à ceux d'ExoS et ExoT (M-H-I-Q-S-L).

ExoU est composée de deux domaines, l'un N-terminal, et l'autre C-terminal. Le premier cité est porteur des quatre blocs patatines bactériens classiques déterminés par Banerji et Flieger, responsables de l'activité d'ExoU (Banerji & Flieger, 2004) (Fig.27). Le bloc 1 ou «oxyanion hole », de la Gly111 à la Gly121 (GGGAKGAAYPG), est bien une région riche en Glycines, comportant un résidu basique, ici la Lys115. Juste à côté se situe le bloc 2, où l'on retrouve la Ser142 (GSSAG), l'un des deux membres de la dyade catalytique. Le bloc 3 se situe entre l'Ile315 et la Pro320 (ISGSFP). Enfin, le bloc 4 s'étend des résidus 344 à 352



- Figure 28 -

Modélisation de la structure d'ExoU de *P. aeruginosa*

Modélisation du domaine N-terminal d'ExoU (Rabin & Hauser, 2005), obtenue par superposition sur la structure de Pat17 (Rydel *et al.*, 2003). Les régions notées R1, R2, R4 représentent respectivement les blocs 1, 2 et 4. La région R3 correspond à la région Asn278-Ala288, importante pour l'activité d'ExoU. Les boucles rouges et vertes font référence à des aspects traités dans l'étude de Rabin et collaborateurs (Rabin & Hauser, 2005).

(DGGVMINVP). On y retrouve le second partenaire de la dyade, l'Asp344. Ce dernier bloc marque la fin du domaine N-terminal.

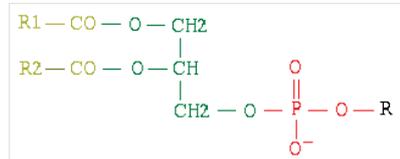
Une autre région dans ce domaine a été montrée comme importante pour la toxicité, malgré le fait qu'elle n'appartienne pas aux blocs PLP. Il s'agit de la région comprise entre les résidus 278 et 288 (QIKTLNITGTA) (Rabin & Hauser, 2005). En effet, la production en *trans* chez la levure d'un variant d'ExoU, dans lequel est inséré un pentapeptide au niveau de cette région, n'entraîne pas la mortalité de la levure, comme c'est le cas lors de la production en *trans* de la forme sauvage d'ExoU. Cette région se situe vraisemblablement à proximité de la poche catalytique d'ExoU comme le suggère la modélisation du domaine N-terminal d'ExoU (Rabin & Hauser, 2005), généré en superposant ExoU sur la structure résolue de Pat17 (Rydel *et al.*, 2003) (Fig.28). Ce modèle propose que les blocs 1, 2 et 4 soient localisés à proximité les uns des autres, formant la poche catalytique (le bloc 3 n'est pas représenté dans cette figure par les auteurs). On peut observer sur ce modèle que la région Asn278-Ala288, notée région R3, est bien située à proximité du site actif. Bien qu'aucune similarité de séquence ne permette de prime abord d'assigner une fonction à cette zone, il semble bien qu'elle joue un rôle dans la cytotoxicité d'ExoU. On peut conjecturer que cette région est peut-être importante pour que la protéine adopte une bonne conformation.

Le domaine C-terminal d'ExoU ne porte pas de motif spécifique, ce qui ne permet pas de lui assigner une fonction putative. Il a cependant été démontré qu'il est fondamental pour le phénotype cytotoxique d'ExoU (Finck-Barbançon & Frank, 2001; Rabin & Hauser, 2005; Stirling *et al.*, 2006) et pour son activité (Schmalzer *et al.*, 2010). Les régions importantes de ce domaine sont les 20 résidus entre la Lys601 et l'Arg620 (Rabin & Hauser, 2005; Schmalzer *et al.*, 2010), et les 5 résidus compris entre la Lys679 et l'Asn683 (KAWRN) (Stirling *et al.*, 2006). Les fonctions de ces deux régions sont traitées plus après.

### II.3.2.2. Activité

Bien que la cytotoxicité d'ExoU fût immédiatement démontrée, son activité n'a pas été directement identifiée et testée. Les premières études démontrant clairement l'activité d'ExoU datent de 2003 (Phillips *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2003). La présence des motifs PLP sur le domaine N-terminal a naturellement conduit à l'hypothèse d'une activité de type lipolytique.

Phospholipide

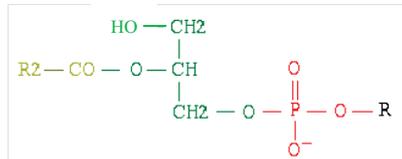


PLA<sub>1</sub>

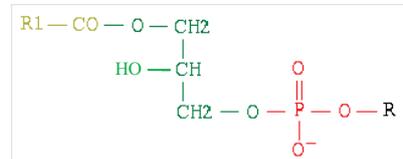
PLA<sub>2</sub>

Activité  
Phospholipase A

Lyso-  
phospholipide



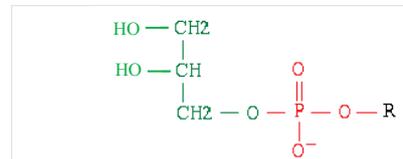
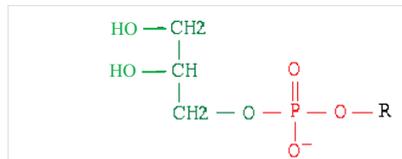
+ R1 - COOH



+ R2 - COOH

Activité  
Lysophospholipase A

Glycéro-  
phospholipide



Phosphatidyléthanolamine: R =  Ethanolamine

Phosphatidylcholine: R =  Choline

- Figure 29 -

Activités phospholipase A et lysophospholipase A

Différentes expériences *in vitro* de mesure d'activité lipase, phospholipase, lysophospholipase, ont été menées par ces deux équipes. Le principe était d'ajouter des doses d'ExoU purifiée sur des lipides ou phospholipides, branchés avec différents types d'acides gras. Aucune activité n'a pu ainsi être observée. Partant du principe qu'ExoU est un effecteur de type III, l'hypothèse d'un recours à un cofacteur de nature eucaryote (comme c'est le cas pour ExoS, ExoT et ExoY) a été ensuite testée. Phillips et ses collaborateurs cultivèrent des cellules d'ovaires d'hamsters chinois (CHO) en présence d' $[^3\text{H}]$ acide arachidonique (AA) tritié. Ce composé est incorporé en priorité dans les phospholipides (Balsinde & Dennis, 1996; Leidich *et al.*, 1998). La protéine ExoU purifiée a été par la suite injectée à la seringue dans les cellules CHO. Dans ce contexte, il a été observé le relargage de l'AA radio-marqué, témoignant ainsi de l'activité phospholipase d'ExoU. L'équipe du Pr Dara Frank a utilisé un type cellulaire différent, la levure, cultivée en présence d'acide palmitique marqué par de  $[^{14}\text{C}]$ uracile. L'acide palmitique est connu pour s'insérer chez la levure à la position *sn*-2 de la PC ou de la phosphatidyléthanolamine (deux phospholipides) (Fig.29) (Wagner & Paltauf, 1994). L'expression du gène *exoU* à partir d'un plasmide préalablement transformé chez la levure, est ensuite induite. La composition lipidique de la levure alors analysée par chromatographie sur couche mince révèle que l'induction de l'expression du gène *exoU* est accompagnée par l'apparition d'acide palmitique marqué libre.

Il semblait donc qu'un cofacteur eucaryote soit nécessaire pour activer ExoU. Afin de le confirmer, des lysats cellulaires de levures ont été ajoutés au mélange réactionnel lors de mesures d'activité *in vitro* sur substrats synthétiques (Sato *et al.*, 2003). Dans ce cas, il a été possible d'observer le relargage d'acides gras radio-marqués. L'ajout d'un lysat de type eucaryote apporte donc un cofacteur nécessaire au bon fonctionnement d'ExoU.

Ces expériences mettent donc en évidence une activité de type  $\text{PLA}_2$ , *i.e.* qui hydrolyse les acides gras greffés en position 2 sur les phospholipides (*sn*-2) (Fig.29).

Il est intéressant de noter que les deux équipes ont testé un mutant de l'Asp344 et/ou de la Ser142 d'ExoU, noté ExoU<sub>D344A</sub> et ExoU<sub>S142A</sub> respectivement, et ils ont mis en évidence que ces résidus sont nécessaires à l'activité d'ExoU. Ce résultat, ainsi que leur localisation dans les blocs PLP 2 et 4, indiquent clairement que ces deux résidus, la Ser142 et l'Asp344, constituent la dyade catalytique d'ExoU.



Une autre étude a par la suite apporté quelques précisions sur la nature de l'activité d'ExoU. Il apparaît qu'elle est vraisemblablement plus une LPLA qu'une PLA<sub>2</sub> (Tamura *et al.*, 2004). Un lysophospholipide est le produit généré par l'action d'une phospholipase sur un phospholipide (Fig.29). Une PLA<sub>2</sub> libère l'acide gras branché en position *sn*-2, laissant intact celui branché en position *sn*-1. Une LPLA hydrolyse cet acide gras. Tamura et collaborateurs montrèrent qu'ExoU libère beaucoup plus d'acide gras à partir d'un lysophospholipide qu'un phospholipide. Cette activité est également dépendante de la présence d'un cofacteur de nature eucaryote, et est portée par la dyade catalytique. Il a également été mis en évidence que l'addition de glycérol ou d'EDTA permettait d'améliorer l'efficacité d'ExoU, tant pour l'activité PLA<sub>2</sub> que LPLA, alors que l'ajout de triton X-100 inhibe l'activité LPLA.

Enfin, l'activité d'ExoU (PLA<sub>2</sub> et LPLA) a été mesurée en présence de différents inhibiteurs de PLA<sub>2</sub> (Tamura *et al.*, 2004). De manière surprenante, alors qu'ExoU est connu depuis 1997, cette étude de 2004 est la seule qui teste directement l'activité en présence d'inhibiteurs de PLA<sub>2</sub>. Dans les études précédentes, ces inhibiteurs ne sont testés que sur des expériences de cytotoxicité et non sur des mesures d'activité. Ici, Tamura et collaborateurs utilisent des inhibiteurs de cPLA<sub>2</sub> et/ou de PLA<sub>2</sub> indépendante aux ions Ca<sup>2+</sup> (iPLA<sub>2</sub>). Ainsi, l'utilisation de méthyl arachidonyl fluorophosphate (MAFP), inhibiteur irréversible des cPLA<sub>2</sub>, ou d'arachidonyl trifluorométhyl ketone (AACOCF), inhibiteur réversible des iPLA<sub>2</sub> et cPLA<sub>2</sub>, par exemple, permet de réduire de manière significative l'activité d'ExoU. Ces données confirment donc que les PLPs possèdent une activité similaire aux cPLA<sub>2</sub> et iPLA<sub>2</sub> eucaryotes, puisqu'elles sont inhibées par les mêmes inhibiteurs.

### II.3.2.3. Cofacteur

Les premiers tests d'activité menés pour identifier l'activité d'ExoU révélèrent qu'en l'absence d'un cofacteur de type eucaryote, aucune activité ne pouvait être observée. Ainsi l'ajout d'un lysat cellulaire eucaryote (levure ou cellules épithéliales) dans le mélange réactionnel ou l'incorporation de la protéine directement dans la cellule cible (soit par transfection du gène, soit par injection à la seringue) permettaient d'observer le relargage d'acide gras, tant pour l'activité PLA<sub>2</sub> que LPLA (Phillips *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2003; Tamura *et al.*, 2004).



Malgré cette observation, il fallut attendre 2006 pour identifier ce cofacteur. En combinant des approches biochimiques et protéomiques, Sato et ses collaborateurs ont établi que la superoxyde dismutase à  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  (SOD1) était le cofacteur responsable de l'activation d'ExoU (Sato *et al.*, 2006). La nature de ce cofacteur n'est pas si incongrue si l'on considère que l'épithélium pulmonaire, un des foyers d'infection préférentiels de *P. aeruginosa*, est particulièrement exposé au stress oxydant. Or les SODs sont des acteurs majeurs dans la défense des cellules contre les espèces réactives de l'oxygène, en particulier contre les radicaux superoxide  $\text{O}^{\bullet}_2$ . ExoU utilise donc un cofacteur fortement représenté au sein des tissus infectés par *P. aeruginosa*.

Cette étude montre également que l'activité de SOD1 n'est pas requise pour l'activation, et met en évidence l'interaction physique entre les deux protéines. Elle établit aussi que la SOD peut provenir aussi bien de la levure que de foie bovin, mais qu'en revanche, les SODs bactériennes, en toute logique, ne sont pas capables d'activer ExoU.

Par ailleurs, l'activation d'ExoU nécessite que la région bordant la Leucine 618 soit intacte. Il a été démontré qu'un variant d'ExoU dans lequel un pentapeptide était inséré au niveau de la Leucine 618 perdait une partie, voire la totalité, de son activité (Schmalzer *et al.*, 2010). Des tests d'activité enzymatiques *in vitro* ont montré qu'à concentration égale de SOD rajoutée dans le mélange réactionnel, ExoU<sub>wt</sub> est nettement plus actif que ce variant, alors qu'en parallèle, l'association entre ExoU<sub>wt</sub> ou ExoU<sub>L618</sub> avec la SOD est inchangée. Il s'agit donc d'un problème d'activation d'ExoU et non d'interaction.

Le recours à un cofacteur de nature exclusivement eucaryote représente une astuce des plus élégantes. Non seulement, l'association d'un tel cofacteur avec une enzyme arborant des motifs de types eucaryotes semble somme toute assez logique, mais de plus, elle permet également à *P. aeruginosa* de se prémunir de l'activité d'ExoU. Son activité extrêmement puissante, même à des doses infimes (voir paragraphe suivant), pourrait être létale pour la bactérie elle-même. Ainsi elle se protège de l'activité d'ExoU par deux processus : (i) l'absence totale de son activateur au sein de l'organisme procaryote ; (ii) ExoU étant un effecteur de type III, possède une chaperonne, SpcU, qui la maintient dans un état compétant pour la sécrétion, *i.e.* dans un état déplié, donc inactif.



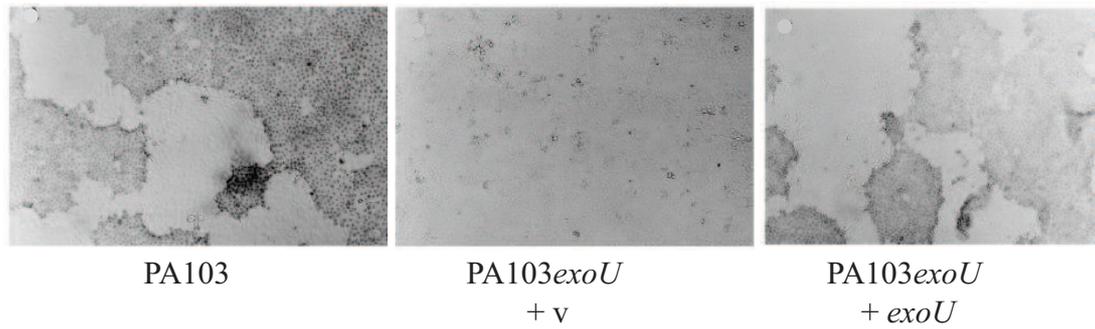
#### II.3.2.4. Cytotoxicité

C'est par son phénotype cytotoxique que cette protéine a été identifiée (Finck-Barbancon *et al.*, 1997; Hauser *et al.*, 1998) (Fig.30A). C'est une toxine cytolitique très puissante, puisque seulement 300 à 600 molécules d'ExoU par cellule sont suffisantes pour atteindre la DL50 sur des cellules CHO (dose létale 50) (Phillips *et al.*, 2003). Ceci explique certainement pourquoi il a été impossible de détecter ExoU par western blot dans les cellules cibles, la quantité d'ExoU étant probablement inférieure au seuil de détection de l'anticorps (Finck-Barbancon & Frank, 2001; Sato & Frank, 2004). ExoU est capable d'interagir sur différents types cellulaires comme les cellules épithéliales, les macrophages, les fibroblastes, les levures, et les amibes (Coburn & Frank, 1999; Cosson *et al.*, 2002; Finck-Barbancon *et al.*, 1997; Fleiszig *et al.*, 1997b; Hauser *et al.*, 1998; Hauser & Engel, 1999; Pukatzki *et al.*, 2002; Vallis *et al.*, 1999a). Elle est retrouvée dans environ 30% des isolats cliniques (Feltman *et al.*, 2001), et les patients infectés par des souches de *P. aeruginosa* produisant ExoU sont atteints de formes de maladies plus sévères que ceux infectés par des souches défectives pour ExoU (Hauser *et al.*, 2002). De plus, l'acquisition du gène *exoU* permet d'augmenter la virulence de souches de *P. aeruginosa* ne le possédant pas (Allewelt *et al.*, 2000). A l'inverse, l'interruption du cadre de lecture du gène *exoU* (Finck-Barbancon *et al.*, 1997; Hauser *et al.*, 1998) entraîne une meilleure survie cellulaire lors de tests de pneumonies aiguës sur modèles animaux. Il en est de même lorsque l'activité est interrompue par la mutation en Alanine des deux résidus catalytiques Ser142 et Asp344 (Pankhaniya *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 2003; Rabin & Hauser, 2003; Rabin & Hauser, 2005; Sato *et al.*, 2003). De fait, ceci illustre que l'activité d'ExoU est intrinsèquement liée à son pouvoir cytotoxique.

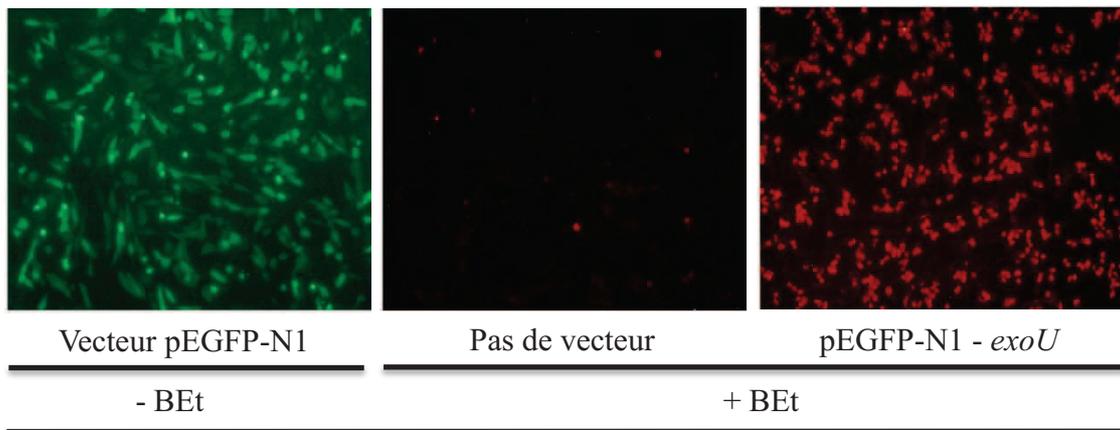
Ceci pose la question du processus conduisant à la mort cellulaire. Au-delà de l'évidente altération de l'intégrité membranaire, se concluant par une nécrose cellulaire, un autre mécanisme, directement lié à l'activité d'ExoU, provoque un effet létal, par le biais d'un stress oxydant. Enfin, ExoU joue un rôle dans la réponse inflammatoire de la cellule hôte.

##### II.3.2.4.1. Une histoire de membranes

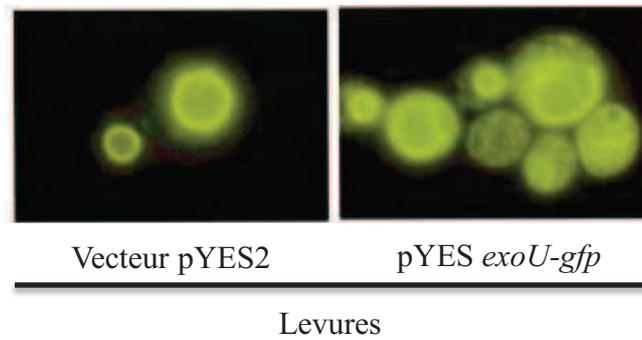
Les membranes plasmiques des cellules sont constituées de différents types de lipides et phospholipides. Elles constituent donc un substrat de choix pour les enzymes de la grande



**A**



**B**



**C**

- Figure 30 -

### Observations microscopiques de la cytotoxicité d'ExoU

(A) Infection de cellules épithéliales HeLa par des souches PA103 de *P. aeruginosa*. On observe de larges plages de lyse lors d'infection lorsque la souche peut exprimer le gène *exoU* (chromosomique ou plasmidique). +v indique le vecteur vide (Finck-Barbançon *et al.*, 1997).

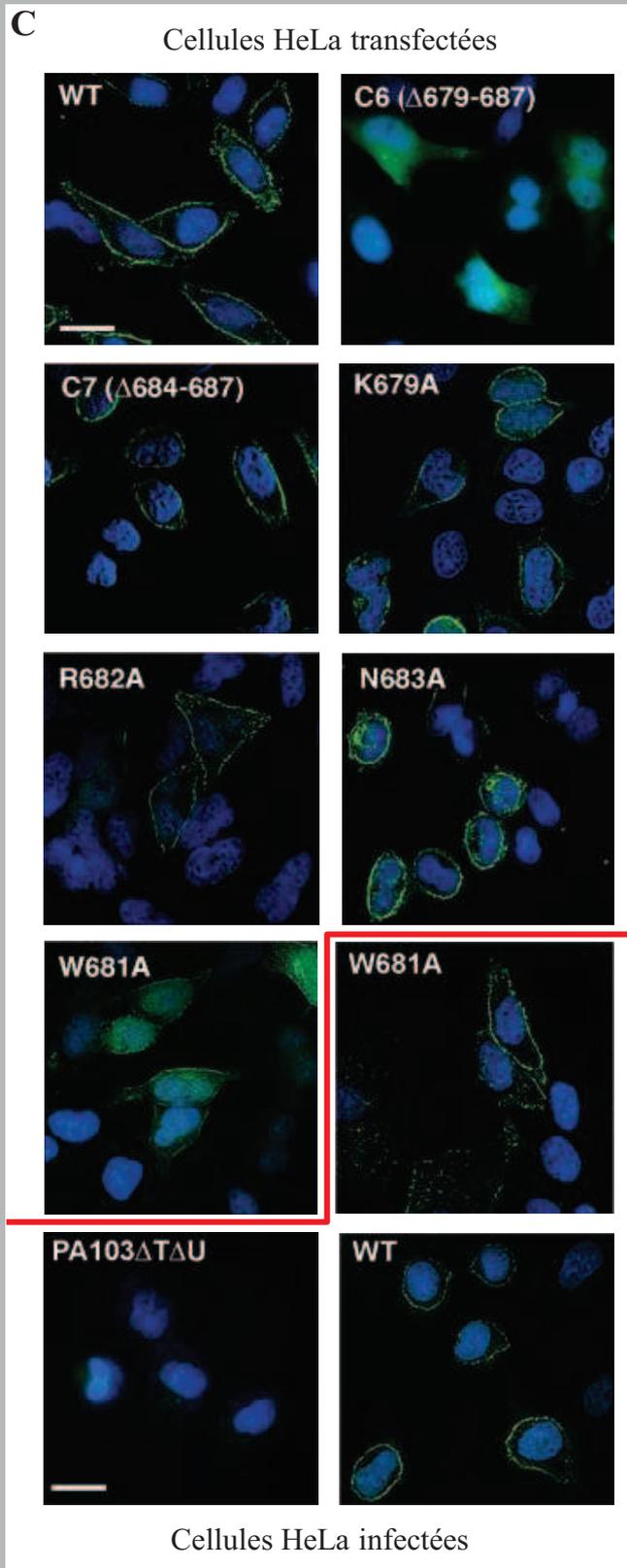
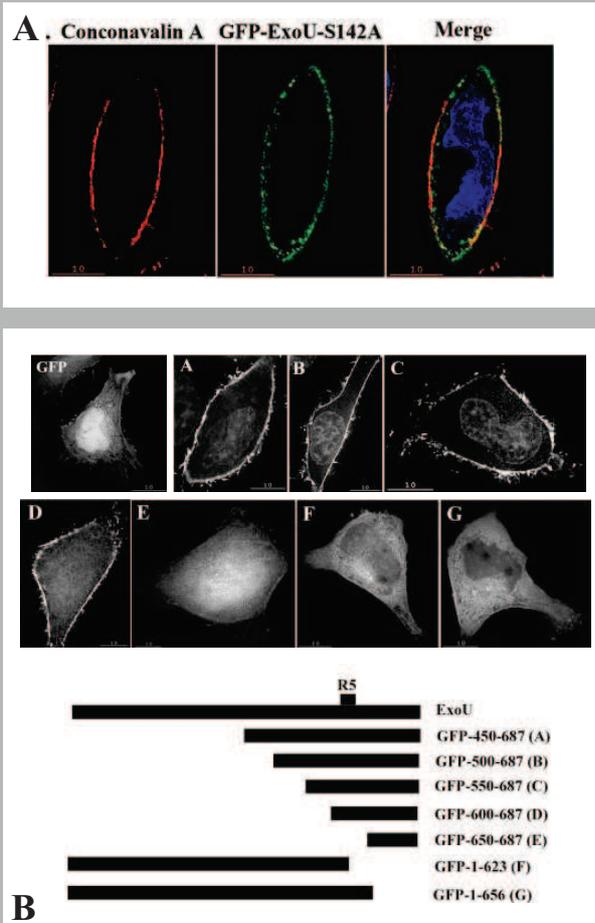
(B) Microscopie à fluorescence sur cellules CHO transfectées ou non avec le plasmide indiqué. Après 3h de culture, du BEt (témoin de perméabilisation) est rajouté ou non dans le milieu de culture des cellules. Panneau de gauche: fluorescence de la GFP; Panneau central et de droite: détection du Bet (Finck-Barbançon *et al.*, 2001).

(C) Microscopie à fluorescence sur des levures transformées avec le vecteur indiqué après 5h d'induction d'expression. Marquage au FM4-64 (marqueur spécifique des membranes vacuolaires de levure) (Sato *et al.*, 2003).

famille des lipases, telle ExoU. L'activité de cette dernière conduit inévitablement à l'altération des membranes des cellules cibles. Ceci se traduit par le déversement dans le milieu extracellulaire du contenu cytoplasmique de la cellule nécrosée, et par la disparition rapide de la cellule en question. Ainsi de larges plages de lyses peuvent être observées lors d'infection de cellules épithéliales avec des souches de *P. aeruginosa* possédant le gène *exoU* (Fig.30A) (Finck-Barbancon *et al.*, 1997), des composés de type bromure d'éthidium (BET) peuvent pénétrer et colorer des cellules infectées (et ainsi perméabilisées) (Fig.30B) (Finck-Barbancon & Frank, 2001), des marqueurs colorés cytosoliques ne sont pas retrouvés dans les cellules, indiquant leur relargage dans le milieu extracellulaire (Rabin & Hauser, 2003). De plus, l'action d'ExoU entraîne aussi la fragmentation, voire la destruction de certaines structures internes, telles les vacuoles (Fig.30C) (Rabin & Hauser, 2003; Sato *et al.*, 2003), sans pour autant altérer des structures de types mitochondries, ou appareil de Golgi (Sato *et al.*, 2003).

Cette activité sur les membranes nécessite la proximité, voire l'association, entre ExoU et les membranes, ce qui a été observé au moyen de fusion traductionnelle ExoU<sub>S142A</sub>-GFP, et d'anticorps anti-ExoU couplés à la rhodamine (Fig.31A) (Rabin *et al.*, 2006). Ce rapprochement est assuré par le domaine C-terminal d'ExoU. En 2005, Rabin et collaborateurs illustrèrent l'importance des résidus de la Lys600 à l'Arg620. Ils observèrent la disparition de la cytotoxicité lors de l'insertion d'un pentapeptide dans cette région, sans pour autant en connaître la raison (Rabin & Hauser, 2005). Par la suite, en 2006, ils mirent en évidence le rôle joué par la région 550-689 (Rabin *et al.*, 2006). En effet, ils montrèrent par microscopie à fluorescence que la GFP (normalement diffuse dans les cellules) est associée à la membrane lorsqu'elle est fusionnée à cette région 550-689 (Fig.31B). Ils montrèrent ainsi que cette région est suffisante pour l'adressage à la membrane plasmique. De plus, ils observèrent qu'ExoU n'est pas exposée à la surface de la cellule eucaryote, elle est associée à la membrane plasmique par la face interne.

Une autre étude a rapporté que les résidus allant de la Lys679 à l'Asn683 jouent un rôle particulier dans le mécanisme d'ExoU (Stirling *et al.*, 2006). La présence de ces résidus est nécessaire mais pas suffisante pour un adressage correct. La délétion de cette séquence entraîne (i) une localisation diffuse d'ExoU dans la totalité de la cellule (Fig.31C), (ii) une absence d'activité, et (iii) un phénotype non-cytotoxique. A contrario, des mutations ponctuelles de ces résidus ne provoquent pas un défaut de localisation à la membrane



- Figure 31 -  
 Localisation d'ExoU

(A) ExoU<sub>S142A</sub> est associée à la membrane plasmique de cellules HeLa transfectées. En rouge: la membrane plasmique (marquée par la concanavaleine A); en vert: la GFP; en bleu: le noyau (coloration de Hoechst).

(B) Le domaine 550-687 est suffisant pour adresser la GFP aux membranes des cellules HeLa transfectées, alors que la localisation de la GFP seule est diffuse.

(C) La région 679-683 joue un rôle particulier dans la localisation d'ExoU<sub>S142A</sub>: sa délétion entraîne un défaut de localisation, contrairement à des mutations ponctuelles des résidus de cette région. La substitution W681A n'entraîne pas le même effet sur la localisation selon qu'on observe une transfection ou une infection. Au-dessus de la ligne rouge, expression du gène à partir de plasmides transfectés, en dessous, les cellules sont infectées avec un souche PA103ΔexoTΔU, complémentée avec le variant d'exoU indiqué.

En vert: ExoU ( $\alpha$ -ExoU polyclonal + réactif fluorescent); en bleu: le noyau (marquage au DAPI).

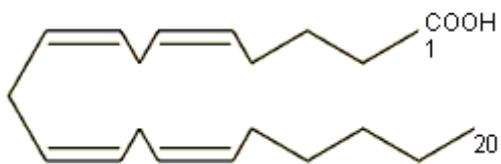
(D'après Rabin et al., 2006, et Stirling et al., 2006)

(Fig.31C) et n'altèrent pas la cytotoxicité. Néanmoins, un variant ExoU<sub>W681A</sub> montre un léger défaut d'adressage selon la méthode utilisée (Fig.31C), et possède une activité cinq fois inférieure à celle d'ExoU<sub>wt</sub>, sans que cela n'altère la cytotoxicité pour autant. Cette activité amoindrie (et non abolie) pourrait s'expliquer par ce léger défaut de localisation. De plus, le fait qu'une protéine arborant une activité cinq fois plus faible que la normale soit toujours capable d'engendrer un phénotype virulent est en accord avec la faible dose nécessaire pour obtenir la mort cellulaire (300 à 600 molécules par cellule seulement). Il est intéressant de noter également que ces cinq résidus jouent un rôle dans une modification post-traductionnelle subie par ExoU, du fait de sa présence à la membrane (Stirling *et al.*, 2006). En effet, la Lys178 subit une diubiquitination, seulement lorsqu'ExoU est adressée à la membrane. Cette modification entraîne une légère accélération dans sa dégradation intracellulaire.

L'effet létal de la protéine ExoU<sub>W681A</sub> malgré une activité bien plus faible que la version sauvage est à mettre en corrélation avec des résultats expérimentaux récemment publiés. En effet, il a été montré qu'un mutant dans lequel un pentapeptide est inséré au niveau de la Leucine 618 perdait la quasi-totalité de son activité *in vitro*, et malgré ce, cette protéine est toujours capable d'induire la mortalité de cellules épithéliales infectées (Schmalzer *et al.*, 2010). Ceci montre donc qu'un niveau quasi-résiduel d'activité d'ExoU s'accompagne toujours d'un effet cytotoxique, ce qui suggérerait qu'un autre mécanisme cytotoxique (différent de l'altération de l'intégrité membranaire) soit impliqué. Il pourrait s'agir d'un mécanisme faisant intervenir un stress oxydant.

#### II.3.2.4.2. Production d'un stress oxydant

L'activité d'ExoU engendre la dégradation des parois membranaires par l'hydrolyse des acides gras branchés sur les phospho- et lysophospholipides. Ceci implique donc le relargage dans la cellule de ces acides gras, comme par exemple l'AA (Phillips *et al.*, 2003). L'AA est un acide gras polyinsaturé, qui possède quatre liaisons doubles *cis*, extrêmement réactives vis-à-vis de l'oxygène (Fig.32). L'oxydation de ces liaisons peut se faire de manière non enzymatique, par réaction spontanée du dioxygène, générant ainsi de puissants radicaux réactifs (radicaux peroxydés, lipides hydroperoxydés). Ces radicaux peuvent endommager différents types de composés comme les protéines, l'ADN, ou les lipides, *et in fine*, provoquer



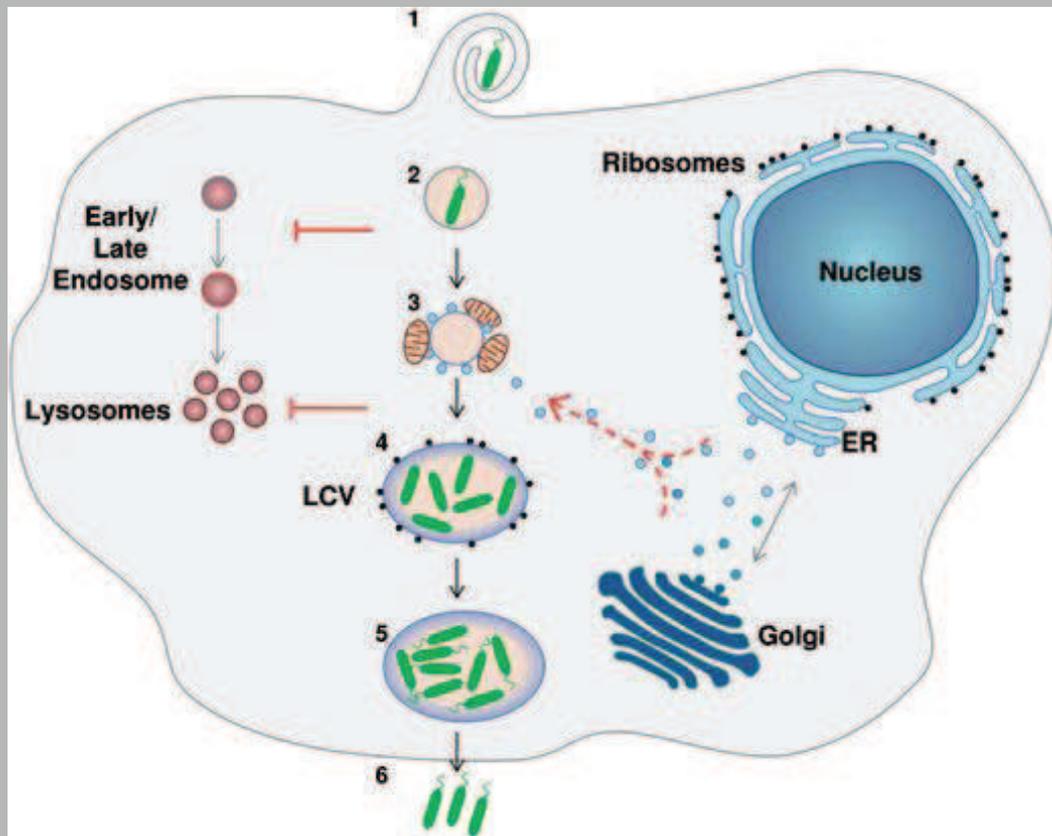
- *Figure 32* -  
Acide arachidonique

la mort cellulaire (Herbst *et al.*, 1999; Vento *et al.*, 2000). L'AA peut également être oxydé de manière enzymatique (par le biais d'enzymes telles que la cyclooxygénase, la lipoxygénase ou le cytochrome P-450) entraînant la formation d'eicosanoïdes, composés à effets diverses sur les tissus humains (modulation de la prolifération cellulaire par exemple). Ces molécules peuvent favoriser la génération de radicaux oxydants, d'un stress oxydatif cellulaire, et la mort cellulaire (Pompeia *et al.*, 2002).

Une étude de 2006 a montré qu'ExoU induisait la formation d'un stress oxydant intracellulaire, de manière non-enzymatique, conduisant à l'altération des lipides (Saliba *et al.*, 2006). En effet, l'ajout d'inhibiteur d'enzymes oxydatives de l'AA ne modifie pas la viabilité de cellules endothéliales infectées par la souche PA103 de *P. aeruginosa*. Ceci exclut que l'oxydation enzymatique de l'AA soit impliquée dans la toxicité. En revanche, après infection des cellules, le marquage des lipides cellulaires avec une sonde fluorescente (la fluorescéine) a permis d'observer la peroxydation de ces lipides (par diminution de la fluorescence de cette sonde). L'utilisation d'un anticorps polyclonal dirigé contre le 4-hydroxynonanal, un des produits majeurs formés au cours de la peroxydation des acides gras polyinsaturés, montre l'accumulation de ce composé après infection.

Dans les deux cas, ces résultats indiquent qu'une infection par une souche produisant ExoU est associée à une oxydation de l'AA par un processus non enzymatique. De manière concordante, l'ajout d'un antioxydant, l' $\alpha$ -tocophérol, améliore la viabilité au cours de l'infection avec une souche ExoU<sup>+</sup>.

Il semble donc qu'au-delà de l'évident processus de destruction de l'intégrité membranaire, un autre processus plus indirect, faisant intervenir un stress oxydant, soit aussi responsable de la cytotoxicité manifestée par ExoU. Cette observation est plutôt intéressante lorsque l'on sait que le cofacteur d'ExoU est la SOD, enzyme impliquée dans la résistance à ce phénomène de stress oxydant. On pourrait envisager que l'association avec la SOD pourrait permettre d'améliorer l'effet cytotoxique d'ExoU en « titrant » les acteurs chargés de contrecarrer ce stress oxydant, bien qu'il ne faille qu'une très faible quantité d'ExoU pour obtenir un effet létal (Phillips *et al.*, 2003).



- Figure 33 -

Cycle réplcatif de *L. pneumophila* dans le macrophage

*L. pneumophila* est phagocytée par le macrophage (1), inhibe la fusion entre le phagosome et l'endosome précoce ou tardif (2). Le phagosome recrute par la suite le *reticulum* endoplasmique (3) et devient une « *Legionella* containing vacuole » (LCV), qui inhibe la fusion avec le lysosome (4). Les bactéries continuent leur multiplication dans la LCV (5) jusqu'à dissémination à l'extérieur du macrophage (6).

(D'après Burke & Dennis, 2009)

#### II.3.2.4.3. Promotion de la réponse inflammatoire

ExoU est capable d'induire un effet cytotoxique au moyen d'un dernier mécanisme : la promotion de la réponse inflammatoire de l'hôte. Il a été démontré au cours d'infection de cellules épithéliales respiratoires qu'ExoU est capable d'activer des voies de signalisation de la cellule eucaryote, en particulier la voie JNK MAPK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase mitogen-activated protein kinase). Cette voie conduit à l'activation du facteur de transcription AP-1 (activator protein 1), qui conduit à la production et la sécrétion d'IL-8 (interleukine 8) (Hoffmann *et al.*, 2002). Ce phénomène est bien dépendant de l'activité PLA<sub>2</sub> d'ExoU, mais est indépendant de la mort cellulaire. Il s'agit donc là d'un autre processus d'action d'ExoU qui a pour but de permettre une meilleure colonisation et une meilleure dissémination (Cuzick *et al.*, 2006).

#### II.3.3. VipD de *L. pneumophila*

Bien que des gènes codants des PLPs aient été rapportés pour de nombreuses bactéries, très peu ont été caractérisés. Le gène *vipD* de *L. pneumophila*, et ses trois paralogues *vpdA*, *vpdB* et *vpdC* sont de ceux-ci. *L. pneumophila* est une bactérie intracellulaire facultative qui survit dans les cellules de l'hôte et notamment chez les macrophages (Fig.33). Après avoir été phagocytée par les macrophages, la bactérie empêche la maturation du phagosome en inhibant la fusion phago-lysosomale au moyen de son SST4. Cette fusion donne habituellement naissance au phagolysosome où sont détruites les bactéries (acidification du pH de la vacuole, et acquisition d'hydrolases, DNAses...). *L. pneumophila* modifie alors le phagosome en LCV (pour Legionella containing yacuole) et recrute le *réticulum* endoplasmique. Elle va se répliquer dans la LCV, jusqu'à éclatement du macrophage, ce qui libère les bactéries qui vont se disséminer et coloniser d'autres cellules (Franco *et al.*, 2009).

*L. pneumophila* est donc capable d'interférer avec le trafic des molécules entre les organelles quand elle est dans la LCV. C'est au cours d'un crible visant à découvrir des protéines impliquées dans ce processus chez la levure que VipD (produit du gène *vipD*), a été identifiée (Shohdy *et al.*, 2005). Son nom est tiré de cette propriété : VipD signifie VPS (Vacuole Protein Sorting) inhibitor protein D. Ses trois paralogues, VpdA, VpdB, et VpdC

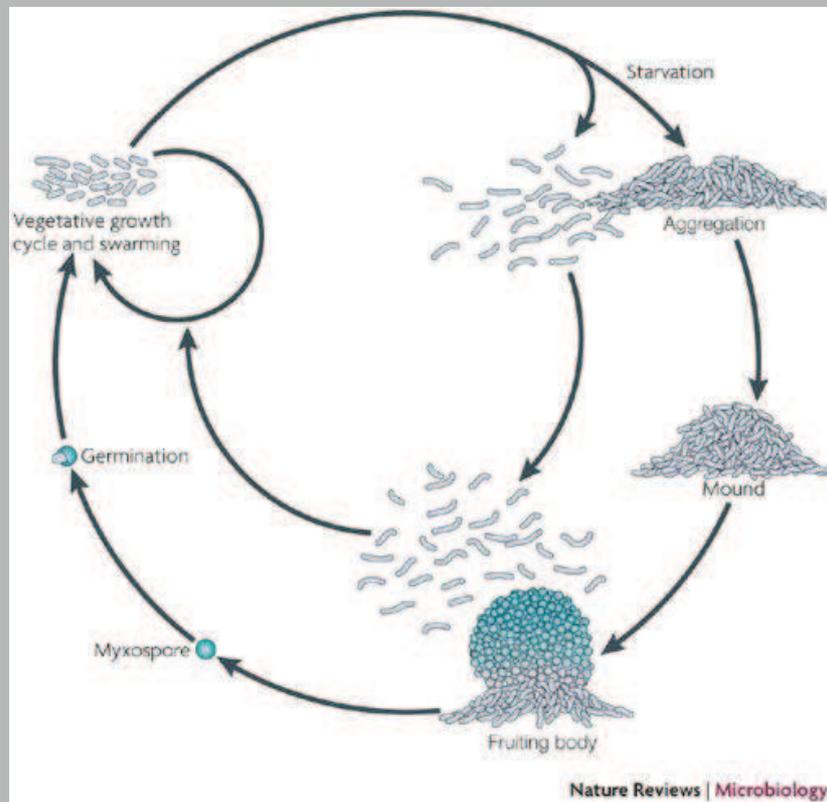


ont été identifiés par une autre équipe (VanRheenen *et al.*, 2006). Ces quatre protéines sont injectées directement chez l'hôte de *L. pneumophila* au moyen de son SST4b *dot/icm*, (système qui permet l'injection de plusieurs effecteurs de type IV) (Christie *et al.*, 2005). Bien que ces protéines possèdent les quatre blocs PLP, l'identification de VipD n'est en fait aucunement liée à ce domaine. En effet, c'est le seul domaine C-terminal de VipD qui a été identifié comme capable d'interférer dans le trafic entre organelles (Shohdy *et al.*, 2005). Or le domaine patatine de VipD est le domaine N-terminal. Les auteurs ont montré par la suite que la totalité de VipD est capable d'induire ce phénotype. Ils ont donc établi que le domaine patatine n'est pas acteur dans ce mécanisme, que ce soit en tant qu'activateur ou en tant que répresseur.

L'activité lipase de VipD a par ailleurs été testée et n'a pu être détectée (Shohdy *et al.*, 2005; VanRheenen *et al.*, 2006). Sa cytotoxicité a également été expérimentée, en introduisant directement le gène sur le génome de la levure. L'induction de l'expression du gène *vipD* provoque un léger défaut de croissance chez la levure, en comparaison avec sa répression (VanRheenen *et al.*, 2006). Les résidus Ser67 et Asp282 (la dyade catalytique supposée) semblent impliqués dans ce léger défaut de croissance, ce qui est plutôt surprenant au vu de l'absence d'activité lipase observée.

Ces données soulignent l'énorme différence existant entre les rôles joués par ExoU et VipD. Là où un phénotype létal très rapide est observé pour la première, la deuxième n'est responsable que d'un léger défaut de croissance. Cette différence est probablement due à la différence fondamentale de mode de vie entre ces deux organismes. *P. aeruginosa* est une bactérie extracellulaire alors que *L. pneumophila* est intracellulaire. Elles ne sont donc pas soumises aux mêmes contraintes et conditions de vie. Dans le cas de *L. pneumophila*, détruire rapidement le macrophage n'aurait pas de réel intérêt puisqu'elle peut y échapper, et qu'elle s'en sert comme refuge pour se répliquer. On observe donc ici probablement la spécialisation, l'adaptation entre deux orthologues.

De plus, bien que contrairement à ExoU, VipD n'ait pas montré d'activité lipolytique, il est difficile de croire que cette protéine ait conservé un domaine enzymatique qui ne lui profite pas. Ses conditions d'action, voire d'activation sont sans doute à caractériser.



- Figure 34 -  
Cycle de vie de *M. xanthus*

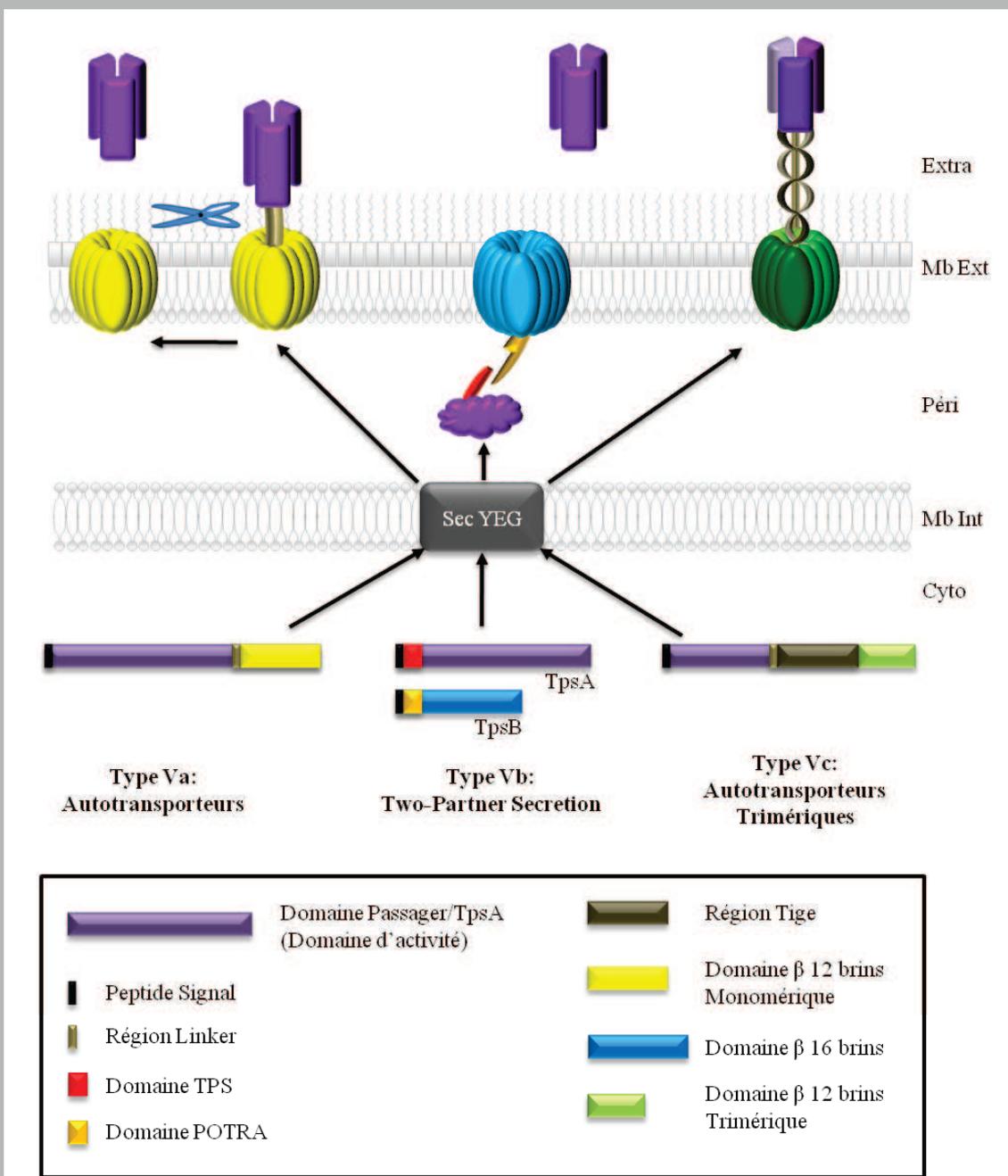
(D'après Zusman et al., 2007)

#### II.3.4. MXAN\_3852 de *Myxococcus xanthus*

La bactérie *Myxococcus xanthus* appartient au phylum des  $\delta$ -protéobactéries. C'est une bactérie qui possède un cycle de vie social, et qui se déplace en utilisant une mobilité particulière dite « gliding ». En période de carence nutritive, les bactéries forment un « fruiting body » multicellulaire, puis enchaînent une étape de sporulation, en attente d'une meilleure période pour germer et retourner à un nouveau cycle de vie classique (Dworkin, 1996; Zusman *et al.*, 2007) (Fig.34).

Le séquençage du génome de *M. xanthus* (Goldman *et al.*, 2006) a permis entre autre de prédire les capacités de sécrétion de cette bactérie (Konovalova *et al.*, 2010). Elle possède les systèmes Sec et Tat (Driessen & Nouwen, 2008; Kimura *et al.*, 2006), un cluster complet de gènes codant un SST2, un SST6, deux clusters incomplets de gènes codant un SST3 (il manque les deux gènes codant les sécrétines et celui d'une ATPase), et elle possède aussi plusieurs gènes codant des transporteurs ABC, donc potentiellement plusieurs SST1 (Konovalova *et al.*, 2010).

L'étude du génome a également permis de trouver des gènes codant des protéines appartenant à plusieurs familles de lipases, dont la famille des patatines. La protéine MXAN\_3852 est une de ces PLPs putatives. Peu de données sont connues sur cette protéine, mais il a été établi que son gène est induit après une longue période de carence lorsque la bactérie est cultivée sur boîtes en milieu TPM ou CF (Moraleda-Munoz & Shimkets, 2007). Son activité a été également observée contre des substrats synthétiques (*p*NP) branchés avec des acides gras de différentes longueurs (du C<sub>2</sub> à C<sub>16</sub>). MXAN\_3852 montre une activité nettement préférentielle pour les chaînes courtes, puisqu'une diminution drastique de l'activité est observée lorsque la longueur de la chaîne accroît. Il est intéressant de noter ici que cette expérience *in vitro* n'a pas nécessité l'ajout d'un lysat cellulaire afin d'observer l'hydrolyse du substrat. Ceci démontre que contrairement à ExoU, MXAN\_3852 ne requiert aucun cofacteur pour être active.



- Figure 35 -

### Le système de sécrétion de type V

Il existe trois branches de SST5: (i) les ATs ou SST5a, le domaine passager peut rester ancré à la ME, ou être clivé et relargué dans le milieu extracellulaire; (ii) les TPS ou SST5b, le domaine TPS du TpsA interagit avec le domaine POTRA du TpsB, puis le TpsA est sécrété au travers du TpsB, après une maturation finale; (iii) les AT trimériques ou SST5c trimérisent comme leur nom l'indique. Chaque monomère contribue pour 4 brins β afin de former un tonneau de 12 brins, et pour un tiers du domaine passager (toujours une adhésine) qui est donc aussi trimérique.

## III. Le Système de Sécrétion de Type V

---

### III.1. Définition

La sécrétion de protéines chez les bactéries joue un rôle important dans de nombreux processus, comme la virulence, l'adaptation à un environnement ou la captation de molécules exogènes (comme le fer avec les sidérophores par exemple).

Pour les bactéries à Gram négatif, la sécrétion dans le milieu extracellulaire implique la translocation (franchissement) à travers deux membranes : la MI et la ME. A ce jour, sept systèmes de sécrétion ont été caractérisés, dont six pour les bactéries à Gram négatif (Fig.6) (Economou *et al.*, 2006).

Le système de sécrétion de type V (SST5) est extrêmement répandu chez les bactéries pathogènes, où il est le plus souvent associé à la virulence, et il est probablement le système de sécrétion le plus simple connu à l'heure actuelle. Il est subdivisé en trois catégories : les autotransporteurs classiques (ATs ou SST5a), les autotransporteurs trimériques ou « trimeric autotransporters adhesins » (TAAs ou SST5c) et les « Two Partner Secretion » (TPS ou SST5b). Dans tous les cas, le principe de sécrétion est identique : la protéine sera sécrétée selon un processus en deux étapes, (i) translocation à travers la MI par l'intermédiaire de la machinerie Sec, (ii) puis translocation à travers la ME via un pore formé par un domaine (AT et TAA) ou une protéine (TPS) structuré(e) en tonneau  $\beta$  (Fig.35). Enfin, la protéine peut rester ancrée à la surface de la ME et donc être exposée au milieu extracellulaire (telles les adhésines par exemple), ou alors un clivage libère le domaine passager de son transporteur dans le milieu extracellulaire. Ce clivage peut être de nature autoprotéolytique, ou réalisé par une protéase accessoire. Cette vision canonique et sans doute simpliste du processus de sécrétion est cependant de plus en plus discutée en raison des données récemment collectées. Ce chapitre est consacré à la présentation de l'architecture des ATs (classiques et trimériques) et des TPS. La vision traditionnelle de la sécrétion de type V y sera par la suite détaillée et discutée, en tenant compte des publications récentes.



Pour de plus amples informations, consulter les revues de (Dautin & Bernstein, 2007; Henderson *et al.*, 2004; Hodak & Jacob-Dubuisson, 2007; Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004; Linke *et al.*, 2006; Mazar & Cotter, 2007).

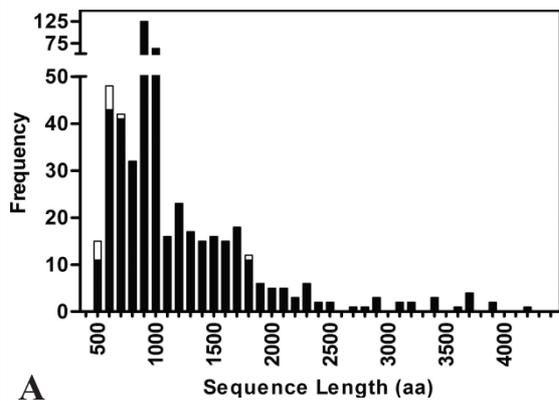
## III.2. Architecture

### III.2.1. Les Autotransporteurs (ATs ou SST5a)

Les ATs ont été appelés ainsi car il s'agit de protéines capables d'« autosécrétion », ce qui est largement discutable aujourd'hui. Elles sont composées de trois régions distinctes : (i) un peptide signal clivable qui se situe à l'extrémité N-terminale. Il assure l'adressage de l'AT à la machinerie Sec, lui permettant ainsi de traverser la MI ; (ii) un domaine dit « passager » (aussi appelé domaine N-terminal ou domaine  $\alpha$ ) est situé à la suite du peptide signal. Il est le domaine porteur de l'activité de l'AT; (iii) enfin, le domaine C-terminal de cette protéine, appelé domaine transporteur ou domaine  $\beta$ , forme un tonneau  $\beta$  de 12 brins qui va s'insérer dans la ME (Fig.35).

Le premier AT décrit est la protéase IgA de *Neisseria gonorrhoeae*, qui dégrade l'immunoglobuline IgA1 (Pohlner *et al.*, 1987). Cette protéine de 146 kDa est retrouvée dans le milieu extracellulaire à la taille de 106 kDa, à la suite d'un clivage autoprotéolytique. C'est en étudiant cette protéine que Pohlner et ses collaborateurs proposèrent un modèle pour ce processus de sécrétion, à savoir que le domaine passager est sécrété par le canal formé par le tonneau  $\beta$  (Fig.35). Ce modèle allait par la suite devenir le modèle « canonique » du SST5a.

Depuis lors, plus de mille protéines ont été décrites ou annotées comme appartenant à la famille des ATs. De plus, des ATs « trimériques » (ou SST5c) ont été découverts, les protéines YadA de *Y. enterocolitica*, et Hia de *Haemophilus influenzae* constituant les archétypes de ce mécanisme (pour plus d'informations, voir la revue de Cotter et collaborateurs (Cotter *et al.*, 2005)). Ces protéines trimérisent, et leurs domaines C-terminaux forment alors un tonneau  $\beta$  de 12 brins, chaque monomère contribuant pour 4 brins. Les domaines N-terminaux trimérisent également (voir § III.2.2).



- Figure 36 -

### Diversité des Autotransporteurs

(A) Distribution de la taille des ATs, incluant ceux qui sont prédits (barres noires) ou ne sont pas prédits (barres blanches) pour former une hélice  $\beta$ .

(B) Quelques exemples de fonctions des ATs. Même si les ATs sont le plus souvent des protéases ou des adhésines, ils agissent sur des cibles différentes ou dans divers processus biologiques.

(D'après Junker et al., 2006, et Henderson et al., 2004)

Protéine	Bactérie	Fonction
Pertactine	<i>B. pertussis</i>	Adhésine
AIDA-I	<i>E. Coli</i>	Adhésine
Hia	<i>H. influenzae</i>	Adhésine
YadA	<i>Y. enterocolitica</i>	Adhésine
BrkA	<i>B. pertussis</i>	Résistance au complément
Hap	<i>H. influenzae</i>	Protéase (Adhérence)
NalP	<i>N. meningitidis</i>	Protéase (maturation)
Hbp	<i>E. coli</i>	Protéase
IgA protéase	<i>N. gonorrhoeae</i>	Protéase
EspP	<i>E. coli</i>	Protéase-SPATE (Toxine)
EspC	<i>E. coli</i>	Protéase-SPATE (Toxine)
VacA	<i>H. Pylori</i>	Toxine vacuolisante
EstA	<i>P. aeruginosa</i>	Lipase (Toxine)
IcsA	<i>S. flexneri</i>	Polymérisation d'actine

**B**

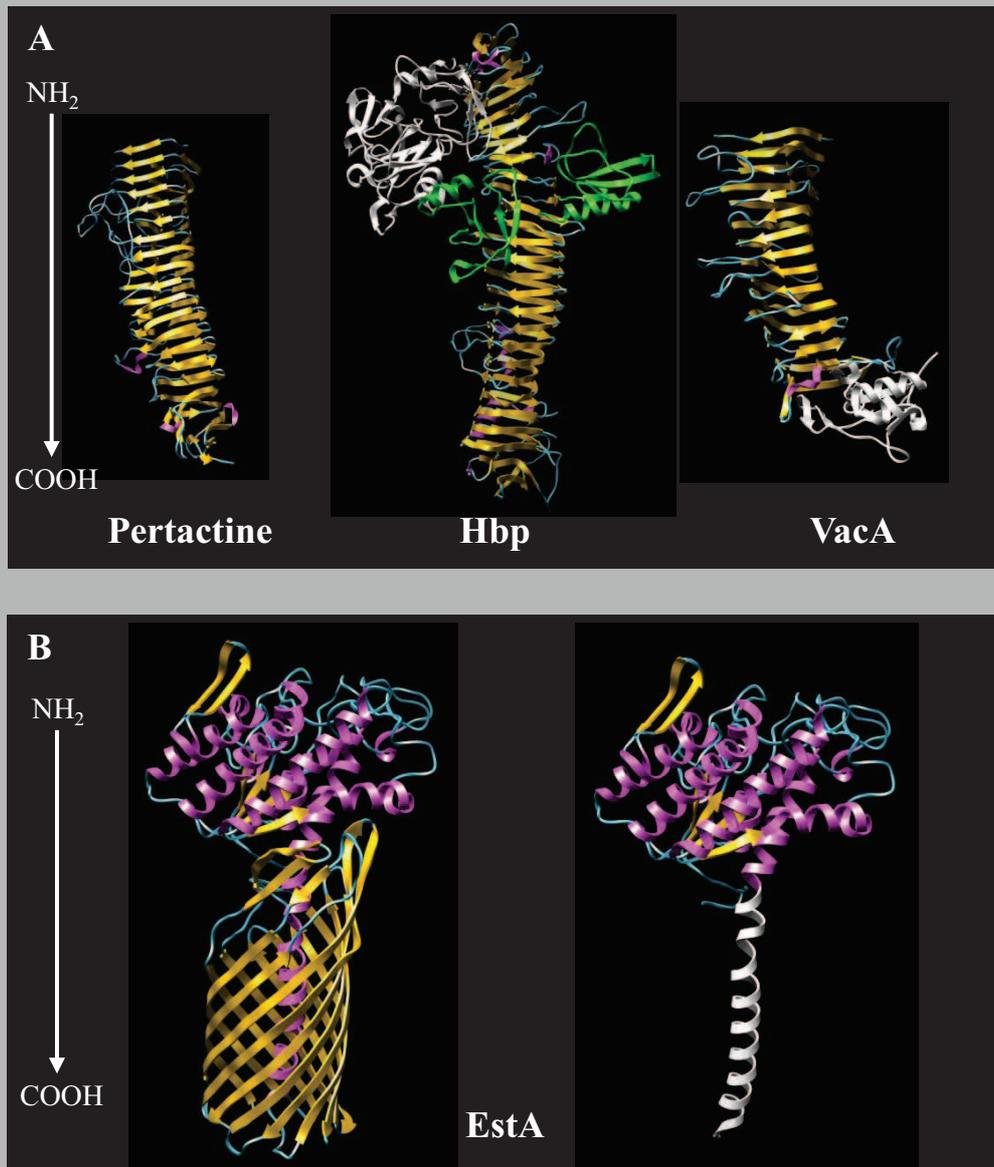
Les paragraphes suivants sont consacrés à la description des domaines  $\alpha$  et  $\beta$  des ATs traditionnels. Le modèle classique de sécrétion et les données le remettant en cause seront discutés plus loin, de manière concomitante à celui des TPS.

### III.2.1.1. Le domaine passager

#### III.2.1.1.1. Une structure quasi universelle ...

Les domaines passagers des ATs sont de natures extrêmement variables en termes de taille, de séquence, et de fonction. Dans la plupart des cas, les ATs permettent la sécrétion de larges domaines passagers. Bien que les plus petits soient de l'ordre de 20 kDa, ils dépassent souvent 100 kDa, pouvant même atteindre 400 kDa, ce qui représente une variation allant de moins de 500 résidus à plus de 4000 (Fig.36A). Leurs activités sont principalement liées à la virulence de la bactérie, et peuvent être par exemple des adhésines, ou des enzymes dégradatives (type protéases ou lipases) (Fig.36B). Au niveau de la séquence primaire, aucun motif commun caractéristique ne se dégage au sein de ces domaines protéiques. En revanche, plusieurs études *in silico* et structurales suggèrent que, bien qu'ils soient porteurs d'activités diverses, ils possèdent une structure tertiaire commune. Les structures résolues de la pertactine, une adhésine de *Bordetella pertussis* (Emsley *et al.*, 1996), de la protéase Hbp d'*E. coli* (Otto *et al.*, 2005), et de la toxine vacuolisante VacA d'*Helicobacter pylori* (Gangwer *et al.*, 2007) révèlent un type de repliement commun : la formation d'un  $\beta$ -solénoïde (Fig.37A). Il s'agit d'une hélice droite de type  $\beta$ , dont les tours sont composés de plusieurs brins  $\beta$  parallèles connectés par des boucles ou des tours  $\beta$ . Ce type de structure semble être également celui de la protéine BrkA (*Bordetella* resistance to killing) de *B. pertussis* comme l'indiquent les premières données obtenues expérimentalement (Zhao *et al.*, 2009). Des études bioinformatiques suggèrent que la grande majorité (97%) des ATs putatifs sont ainsi structurés (Junker *et al.*, 2006; Kajava & Steven, 2006) (Fig. 36A).

La grande majorité ne signifie pas la totalité, et ceci a été confirmé par la structure récemment résolue de la lipase EstA de *P. aeruginosa* (Fig.37B) (van den Berg, 2010). Cette protéine est une lipase de la famille des lipases GDSSL (Akoh *et al.*, 2004) qui n'est pas clivée après sa translocation, elle reste donc ancrée à la ME, exposée au milieu extracellulaire. Sa structure montre que le repliement du domaine  $\alpha$  de cette protéine n'est pas de type hélice  $\beta$ ,



- Figure 37 -

### Le système de sécrétion de type Va

(A) Domaines passagers de la pertactine (Emsley *et al.*, 1996), Hbp (Otto *et al.*, 2005) et VacA (Gangwer *et al.*, 2007). Le  $\beta$ -solénoïde est l'élément commun à ces 3 protéines, mais leurs tailles varient, et des domaines additionnels (en blanc et vert sur Hbp, en blanc pour VacA) déterminent la différence entre ces protéines. Le domaine en blanc sur Hbp est responsable de l'activité protéase.

(B) Structure d'EstA (van den Berg, 2010). À gauche: structure de la totalité de la protéine; à droite: domaine passager globulaire d'EstA, et l'hélice  $\alpha$  (en blanc) qui le relie au tonneau  $\beta$ . En mauve: hélices  $\alpha$ ; en orange: brins  $\beta$ ; en bleu: régions non structurées.

mais correspond à un repliement globulaire, typique des lipases de cette famille. Il existe donc au moins un exemple décrit illustrant un type de repliement différent du traditionnel  $\beta$ -solénoïde.

#### III.2.1.1.2. ... qui autorise une grande variabilité

On pourrait supposer qu'un type de repliement commun impose une activité commune, or il n'en est rien : une grande diversité de fonctions et de tailles des domaines passagers a en fait été répertoriée (Fig.36). Ce type de repliement autorise au contraire cette variabilité. En effet, les domaines  $\alpha$  de la pertactine et de Hbp ont une taille différente, ce qui se traduit par un nombre de tour d'hélices différents (16 et 24 respectivement) (Fig.37A). Cela s'observe aussi au niveau de la forme de l'hélice, puisque 3 types de formes sont répertoriés, une en forme de V ou L (pertactine ou BrkA), une autre en forme de T (Hbp, ou YadA de *Yersinia pestis*) et la dernière en forme de O (XadA de *Xylella fastidiosa*) (Fig.38) (Kajava & Steven, 2006). De plus, au-delà du squelette central que constitue l'hélice  $\beta$ , on observe sur Hbp par exemple la présence de modules additionnels, dont l'un est responsable de l'activité protéase de cette protéine (Fig.37A).

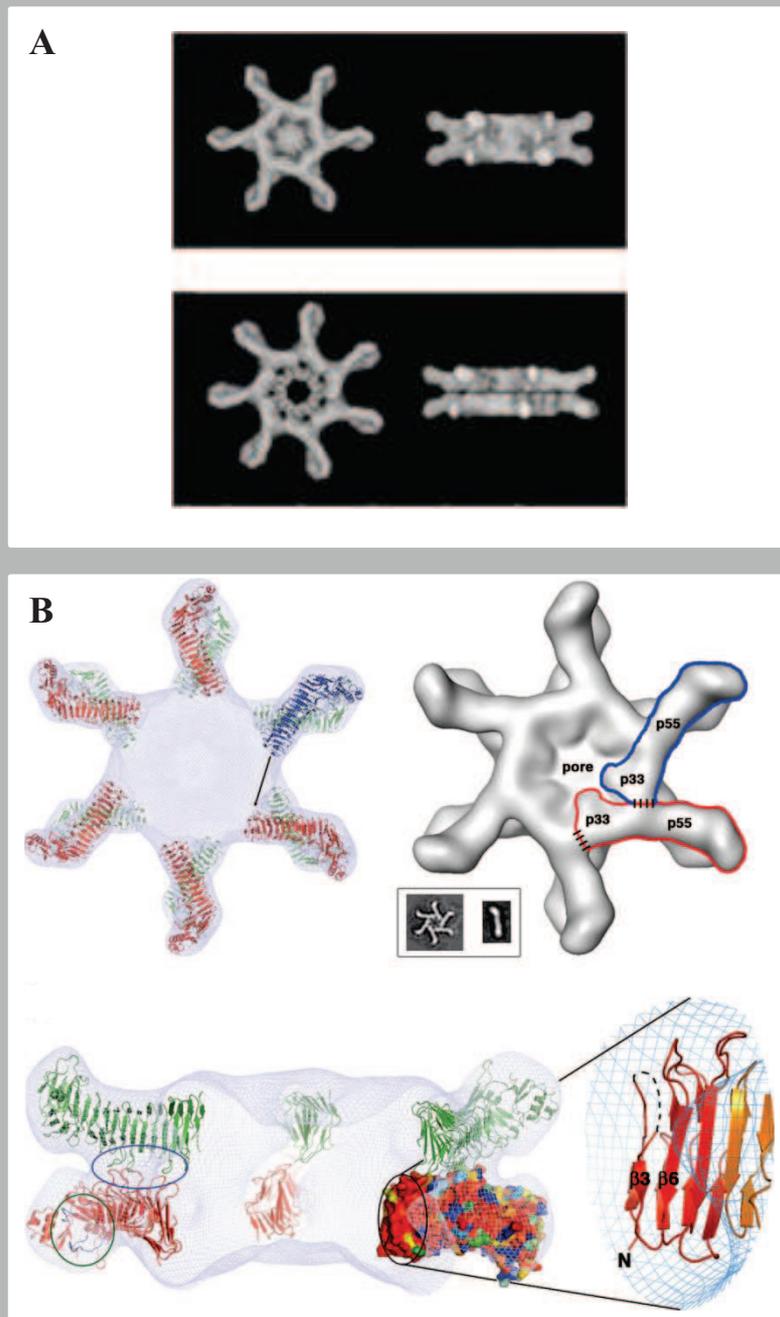
Un module additionnel est aussi retrouvé en C-terminal du domaine passager de VacA, lié à l'hélice  $\beta$  par un pont disulfure (Fig.37A) (Gangwer *et al.*, 2007). Cette protéine, détectée dans le milieu extracellulaire sous une forme de 88 kDa (domaine passager) (Cover & Blaser, 1992), a par ailleurs une autre particularité très rare chez les ATs. Elle a la faculté de s'insérer dans la membrane de la cellule cible infectée par *H. pylori* (Czajkowsky *et al.*, 1999; Iwamoto *et al.*, 1999; Tombola *et al.*, 1999). Elle est responsable d'une série d'évènements moléculaires et cellulaires (vacuolisation de la cellule, dépolarisation du potentiel de membrane, altération de la perméabilité de la membrane mitochondriale, apoptose...) dépendants de sa faculté à former des canaux sélectifs pour les anions dans la membrane de l'hôte (Cover & Blanke, 2005; de Bernard *et al.*, 2004). Pour ce faire, et contrairement aux autres ATs classiques, le domaine  $\alpha$  de VacA oligomérisse. Il a en effet été observé par microscopie électronique à transmission sous la forme d'anneaux hexa- et heptamériques, constituant ainsi un canal dans la membrane eucaryote (El-Bez *et al.*, 2005; Lupetti *et al.*, 1996) (Fig.39A). La structure du domaine passager d'un monomère de VacA

N°	Representative protein	Repeat length	Consensus sequence of repeat	Coil of $\beta$ -solenoid
L1	Serum resistance protein brkA ( <i>B. pertussis</i> )	22-26 res	$g \bullet x \bullet xx - ax \bullet x \bullet xxgx \bullet xx - xxxx$ $\beta_1 \quad \beta_2 \quad \beta_3$	
L2	Slr1753 protein ( <i>Synechocystis sp</i> )	23-28 res	$x \bullet xt \bullet xxxxx - Gx \bullet x \bullet xaxx \bullet x \bullet xx$ $\beta_1 \quad \beta_2 \quad \beta_3$	
L3	AGRL_3085 protein ( <i>Agrobacterium tumefaciens</i> )	25-27 res	$xxGx \bullet x \bullet x - xaxsx \bullet xxxgx \bullet x \bullet xxx$ $\beta_1 \quad \beta_2 \quad \beta_3$	
T1	FHA protein <i>B. pertussis</i>	18-19 res	$x \bullet x \bullet gxxx \bullet x \bullet xx \bullet xaxx$ $\beta_1 \quad \beta_2 \quad \beta_3$	
T2	FHA protein <i>B. pertussis</i>	19-20 res	$x \bullet x \bullet xaxx - xNxgx \bullet xaxxx$ $\beta_1 \quad \beta_2 \quad \beta_3$	
T3	HBP protein <i>E. coli</i>	18-20 res	$s \bullet x \bullet x \bullet xx - ax \bullet x - xx \bullet xaxx$ $\beta_1 \quad \beta_2 \quad \beta_3$	
T4	TibA protein <i>E. coli</i>	18-19 res	$g \bullet xQx \bullet x - xxgxaxxTx \bullet xxg$ $\beta_1 \quad \beta_2 \quad \beta_3$	
T5	YapA protein <i>Y. pestis</i>	18-19 res	$g \bullet xFx \bullet x - xxxaxxxtx \bullet xxx$ $\beta_1 \quad \beta_2 \quad \beta_3$	
T6	Hap protein <i>Haemophilus influenzae</i>	19-20 res	$s \bullet x \bullet x \bullet xxax \bullet xgx \bullet x \bullet xxx$ $\beta_1 \quad \beta_2 \quad \beta_3$	
T7	Hemagg.-hemolysin related protein <i>E. coli</i>	20-22 res	$g \bullet x \bullet x \bullet sxx - x \bullet x \bullet x \bullet sxx - gx \bullet xNx$ $\beta_1 \quad \beta_2 \quad \beta_3$	
T8	LSPA1 <i>Haemophilus ducreyi</i>	20-21 res	$s \bullet x \bullet xax - x \bullet x \bullet xaxxx \bullet x \bullet xx$ $\beta_1 \quad \beta_2 \quad \beta_3$	
O1	XadA protein <i>Xylella fastidiosa</i>	13-14 res	$s \bullet xax - xxxs \bullet a \bullet Gxx$ $\beta_1 \quad \beta_2$	
O2	UspA2H protein <i>Moraxella catarrhalis</i>	15 res	$N \bullet xax - Gxxs \bullet aGGxx$ $\beta_1 \quad \beta_2$	

- Figure 38 -  
Forme de l'hélice  $\beta$

Les hélices des ATs (ou des TPS) ont 3 types de formes (N°): en L (L), triangulaire (T), ou ovale (O) (pour les ATs trimériques).

(D'après Kajava & Steven, 2006)

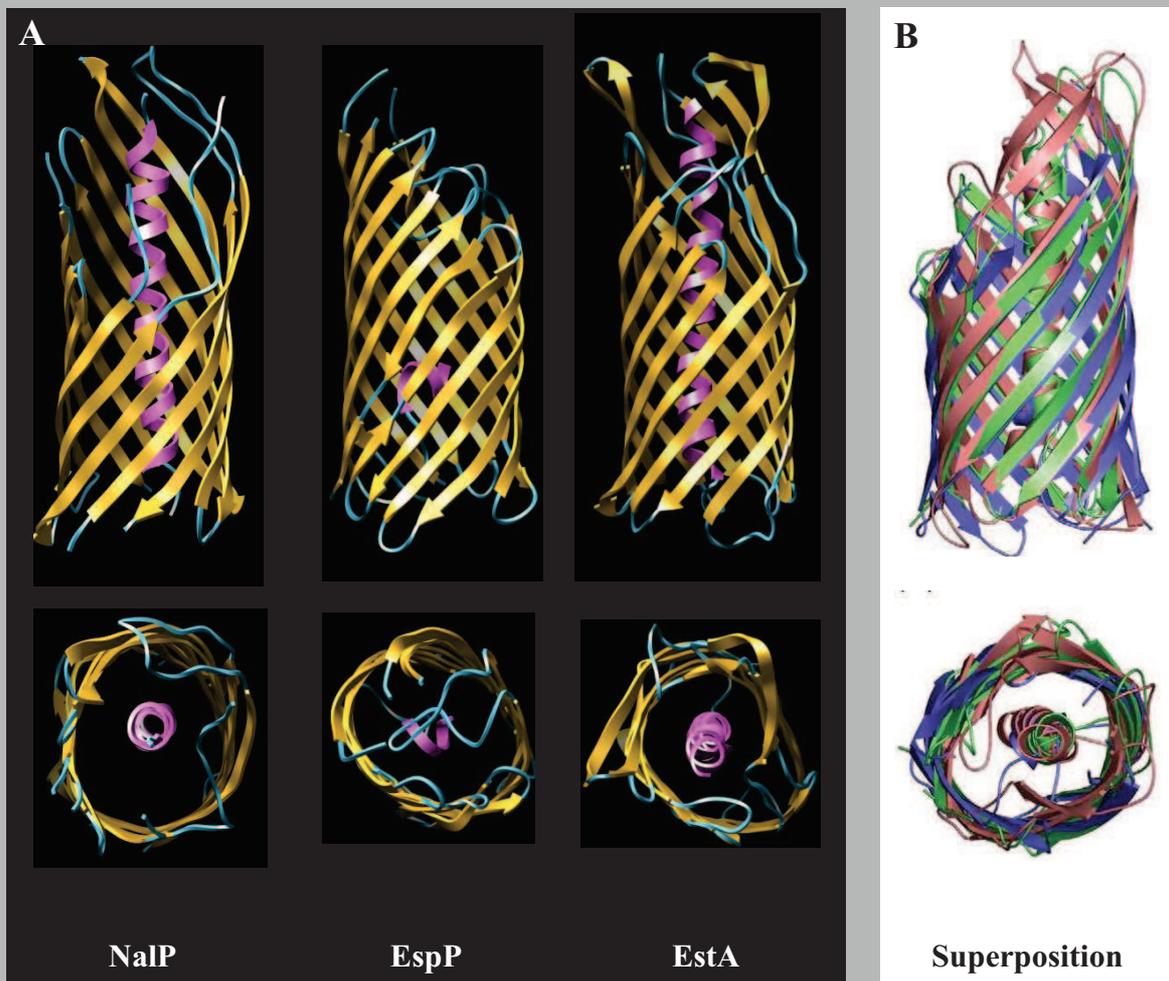


- Figure 39 -

VacA oligomérisé et forme des anneaux qui trouent la membrane plasmique

(A) Image par microscopie électronique à transmission des anneaux formés par l'oligomérisation de VacA. En haut, un double anneau d'hexamères, en bas un double anneau d'heptamère (El-Bez *et al.*, 2005).

(B) Docking de la structure du domaine passager de VacA sur une structure d'un double anneau d'hexamère obtenue par cryo-microscopie électronique (résolution à 19Å) (Gangwer *et al.*, 2007)



- Figure 40 -

### Les domaines transporteurs des ATs

(A) Présentation des tonneaux  $\beta$  de NalP (Oomen *et al.*, 2004), EspP (Barnard *et al.*, 2007), EstA (van den Berg, 2010). Les tonneaux sont très similaires, malgré la différence de site de clivage du domaine passager entre NalP (non connu), d'EspP (en milieu d'hélice) ou d'EstA (pas de coupure). En haut: vue de côté, l'extrémité N-terminale de l'hélice est en haut; en bas: vue du dessus. En orange: les brins  $\beta$ ; en mauve; les hélices  $\alpha$ , en bleu les régions non structurées.

(B) Superposition des tonneaux (van den Berg, 2010). En vert: NalP; en bleu: EspP; en saumon: EstA. Les trois structures se superposent très bien.

s'intercale parfaitement dans la superstructure du pore oligomérique observé (Gangwer *et al.*, 2007) (Fig.39B).

Un exemple similaire a récemment été publié, concernant la protéine PmpD de *Chlamydia trachomatis* (Swanson *et al.*, 2009). Dans ce cas, une structure oligomérique a été détectée, aussi bien pour la protéine entière que les domaines  $\alpha$  et  $\beta$  séparément. Ici, un anneau penta- ou hexamérique a été observé par microscopie électronique à transmission.

De même, la taille à laquelle est purifiée le domaine passager de l'adhésine AIDA d'*E. coli* (entre 450 et 600 kDa, au lieu des 100 kDa observés en condition dénaturantes) laisse supposer que le domaine  $\alpha$  peut adopter une conformation en pentamère ou hexamère (Laarmann & Schmidt, 2003).

Cette hélice  $\beta$ , commune à la plupart des domaines passagers, n'est donc visiblement pas un obstacle à la variabilité des ATs.

### III.2.1.2. Le domaine transporteur

Le domaine transporteur est le domaine C-terminal des ATs. La première structure résolue d'un tel domaine est celle de la protéase à Sérine NalP de *N. meningitidis* (Fig.40A) (Oomen *et al.*, 2004). Il forme un tonneau  $\beta$  de 12 brins antiparallèles, qui va s'insérer dans la ME de la bactérie, et son diamètre est d'une dizaine d'angströms. De manière assez surprenante, le conduit que forme ce domaine est obstrué par une hélice  $\alpha$ , qui pourrait correspondre à l'extrémité N-terminale du domaine transporteur, situé après le site de clivage putatif. La structure du domaine C-terminal de la protéase à Sérine EspP d'*E. coli* O157:H7 a également été résolue, et elle est semblable à celle de NalP (Fig.40A) (Barnard *et al.*, 2007). Ces données structurales sur un domaine  $\beta$  isolé (après clivage du domaine passager correspondant) sont identiques à celles observées pour un domaine  $\beta$  greffé à son domaine passager, comme en témoigne la structure d'EstA (Fig.40A) (van den Berg, 2010). Dans ce cas, on peut remarquer que le tonneau de 12 brins est également occupé par une hélice  $\alpha$  connectée au domaine passager, exposé à la surface de la ME (Fig.37B). Il semble donc qu'il y ait une structure commune aux domaines transporteurs, qu'ils soient liés ou non au domaine passager (Fig.40B). Le domaine  $\beta$  des ATs est annoté dans la banque de données PFAM, et il correspond au domaine PFAM03797. Il est donc relativement simple d'identifier une région de ce type sur une protéine grâce à une recherche de domaines.

Na1P - SGRVGVGYRF  
EspP - AVNANFRYSF  
EstA - SVSLALSLDF  
9 7 5 321

*-Figure 41 -*  
Motif des OMPs

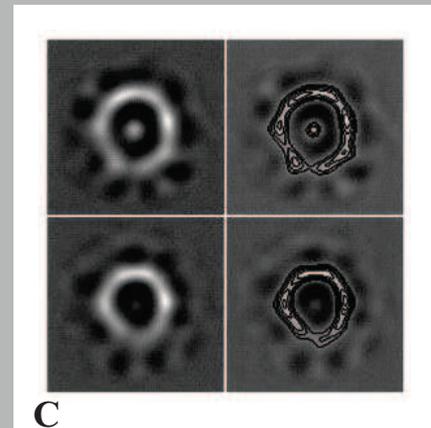
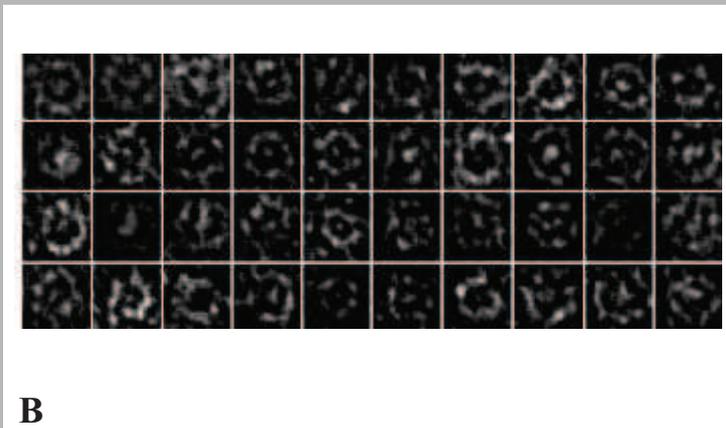
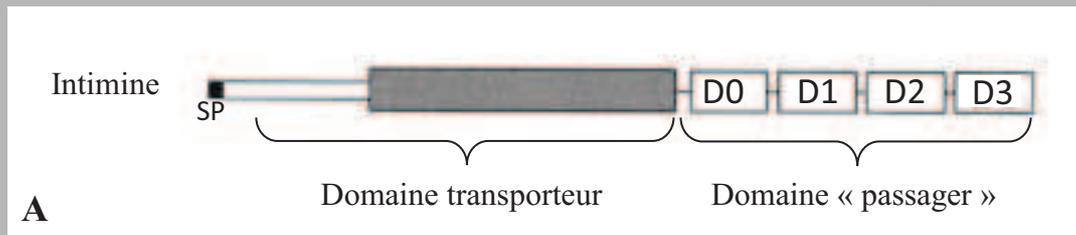
En noir: résidus hydrophobes; en bleu: résidus chargés ou polaires  
en rouge: Phe ou Trp; en gris; résidus quelconque

Du fait de leur forte similarité au niveau structural, ces domaines sont assez semblables en termes de taille, ils sont généralement composés de 250 à 300 résidus. L'homologie est d'ailleurs quasi exclusivement observable sur le plan structural, puisqu'il y a une très grande variabilité de séquence entre ces domaines, rendant leur identification impossible par le jeu des alignements de séquences.

Le seul motif que l'on retrouve sur la séquence est celui des protéines de ME (OMPs), puisque ce domaine transporteur s'insère dans la ME, comme le font les OMPs. Ce motif est porté par les tous derniers résidus du domaine (Fig.41). Le dernier acide aminé (position 1) est toujours une phénylalanine, ou un tryptophane, il est précédé par un résidu polaire ou chargé (position 2), lui-même précédé par une alternance de résidu hydrophobes (positions 3, 5, 7, 9) et quelconques (positions, 4, 6, 8). Ce motif correspond à la formation du dernier brin  $\beta$  du tonneau (Henderson *et al.*, 1998; Jose *et al.*, 1995; Loveless & Saier, 1997; Struyve *et al.*, 1991).

### III.2.1.3. Distribution/évolution

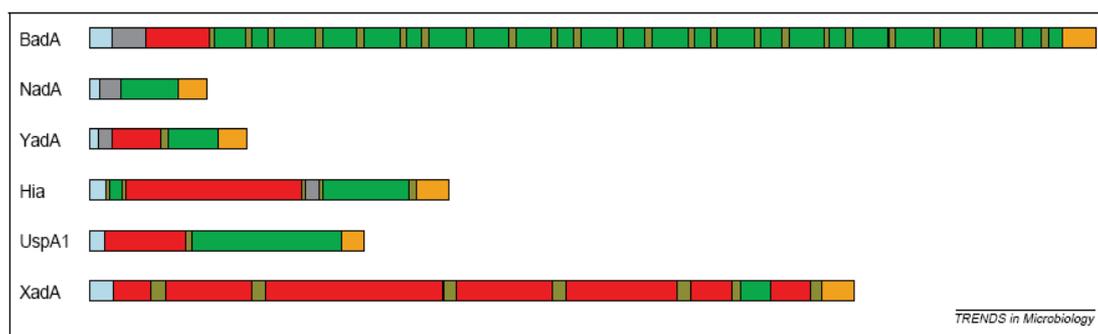
Les ATs ne sont retrouvés que dans le règne bactérien, principalement chez les protéobactéries (Henderson *et al.*, 2004; Yen *et al.*, 2002). Il a été proposé que ces gènes puissent être nouvellement acquis au moyen de transferts horizontaux entre des espèces partageant la même niche, comme la flore respiratoire (Davis *et al.*, 2001). Il est également supposé que leur apparition soit le fruit de fusion entre un domaine enzymatique, et un domaine  $\beta$  : (i) on peut observer par exemple une différence du pourcentage en GC entre ces deux domaines (Davis *et al.*, 2001) ; (ii) il existe une différence sur le plan phylogénétique (Henderson *et al.*, 2004). Là où l'étude des domaines  $\beta$  seuls conduit à proposer un classement de ces transporteurs en 11 catégories (Henderson *et al.*, 2004; Yen *et al.*, 2002), le classement des domaines passagers correspondant peut donner une classification différente. Par exemple, les domaines  $\beta$  de la protéase IgA et des protéines de la famille des protéases ATs à Sérine des *Enterobacteriaceae* (SPATEs) appartiennent à des clusters phylogénétiques différents, bien que leurs domaines passagers soient reliés sur un plan évolutif et appartiennent à la même famille de protéases à Sérine (Henderson *et al.*, 2004). Ceci suggère que malgré de possibles transferts horizontaux d'ATs complets, le transfert de domaines



- Figure 42 -  
L'intimine

(A) A l'inverse d'un AT, le tonneau  $\beta$  de l'intimine est localisé sur le domaine N-terminal. L'équivalent du domaine passager des ATs est ici en C-terminal, il est constitué de 3 domaines immunoglobulines (D0-D1-D2), et d'un domaine lectine (D3). Rectangle noir: peptide signal; rectangle gris: région conservée entre les homologues putatifs des intimines. SP: Peptide Signal. (B) Structures en anneau formées par l'intimine dans la membrane externe de la bactérie. (C) Grossissement de ces anneaux.

(D'après Touze et al., 2004)



- Figure 43 -

### L'organisation des domaines des TAAs

Les TAAs peuvent avoir des tailles et des nombres de répétitions de domaines différents, mais leur organisation est toujours la même: la tête est précédée par les tiges, elles-mêmes précédées par l'ancre. Entre deux domaines, on trouve fréquemment des « cous ». En rouge: les têtes; en vert: les tiges; en orange: les ancres; en kaki: les cous; en gris: domaines non annotés, en bleu: peptide signal. BadA de *Bartonella henselae*; NadA de *N. meningitidis*; YadA de *Y. pestis*; Hia de *H. influenzae*; UspA1 de *Moraxella catarrhalis*; XadA de *Xanthomons campestris*.

(D'après Linke et al., 2006)

transporteurs isolés est un évènement plutôt rare, bien plus que celui des domaines passagers, ce qui corrobore l'hypothèse de formation d'AT par fusion de domaines.

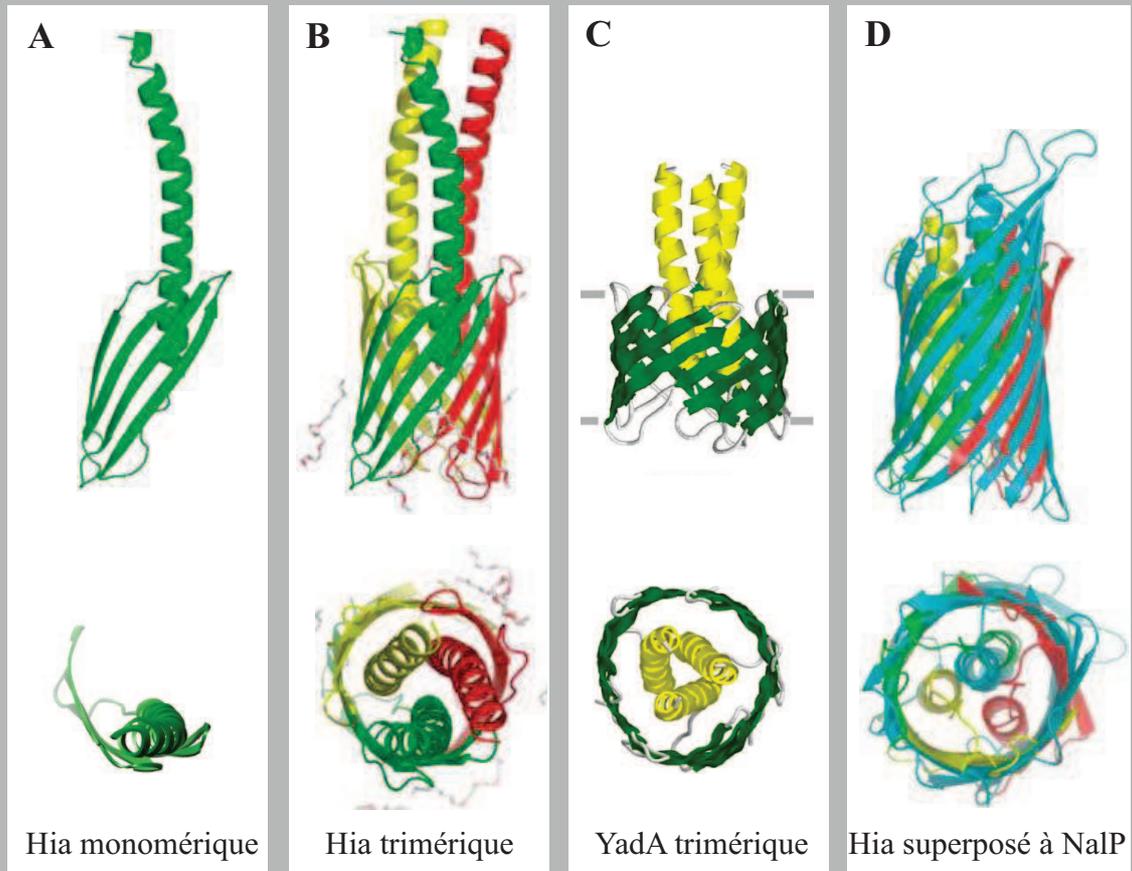
#### III.2.1.4. Curiosité : l'intimine

Les *E. coli* entéro-pathogènes EPEC et entéro-hémorragiques EHEC provoquent des lésions dites d'attachement et d'effacement (A/E) de l'épithélium intestinal qui se traduisent par la destruction des microvilli. Ce phénotype est la conséquence de l'action d'une série de protéines codées majoritairement par un cluster de gènes groupés dans un îlot de pathogénicité nommé « locus d'effacement de l'entérocyte » (LEE) (Ochoa *et al.*, 2008).

L'intimine est une adhésine présente à la surface des bactéries possédant le LEE. Elle dimérise et se lie à un récepteur spécifique de membrane de la cellule hôte, le récepteur Tir, qui est préalablement injecté par le SST3 d'*E. coli*. L'intimine est donc transloquée à travers la ME et il a été proposé que le système de sécrétion responsable de cette translocation soit de type V (Newman & Stathopoulos, 2004). En effet, cette protéine possède un peptide signal qui lui permet le passage de la MI via la machinerie Sec, et elle est composée de deux domaines supplémentaires (Fig.42A). Le domaine qui suit le peptide signal est un domaine  $\beta$  qui permet l'ancrage de la protéine à la ME, et il est prédit qu'il forme un tonneau  $\beta$  (PFAM11924, différent donc des ATs) (Touze *et al.*, 2004). Le domaine C-terminal est lui composé de 3 sous-domaines de type immunoglobuline (D0, D1 et D2) et un sous domaine de type lectine C (D3) qui permet la fixation au récepteur Tir. Il a par ailleurs été montré que le domaine  $\beta$  forme des pores dans la ME (Fig.42B et C), et qu'il est en outre responsable de la dimérisation de la protéine (Touze *et al.*, 2004). L'intimine ressemble donc beaucoup à un AT classique, mais dont les domaines seraient inversés.

#### III.2.2. Les Autotransporteurs trimériques (TAAs ou SST5c)

Un autre type d'AT a été identifié avec les descriptions des protéines YadA de *Y. enterocolitica* (Roggenkamp *et al.*, 2003) et Hia de *H. influenzae* (Surana *et al.*, 2004) : les ATs trimériques, ou SST5c. Ces protéines trimérisent (Fig.35) et, au contraire des ATs classiques dont les fonctions sont diverses, elles sont toutes des adhésines, d'où le nom de



- Figure 44 -

L'ancre (le tonneau  $\beta$ ) des TAAs

(A) Monomère de Hia (Meng *et al.*, 2006). Il est composé de 4 brins  $\beta$  et d'une hélice  $\alpha$ .

(B) Trimères de Hia (Meng *et al.*, 2006). Le tonneau  $\beta$  est ici fermé, il s'agit de la conformation naturelle de Hia. En rouge, vert et jaune, 3 monomères.

(C) Trimères de YadA (Wollmann, *et al.*, 2006). En vert: les brins  $\beta$ ; en jaune: les hélices  $\alpha$ .

(D) Superposition du tonneau d'un trimère de Hia avec le tonneau de NalP (Meng *et al.*, 2006). Malgré la présence de 3 hélices  $\alpha$  au centre d'un tonneau de Hia (au lieu d'une seule pour NalP), les 2 tonneaux sont identiques. En rouge, jaune et vert, 3 monomères de Hia; en bleu: NalP

En haut: vue de côté; en bas; vue de dessus (A, B, et C), ou du dessous (D).

TAA (trimeric autotransporter adhesins). Elles ont été classées dans la famille des ATs sur la base de leur mode de sécrétion, mais quelques différences les séparent des ATs classiques.

Sur le plan architectural, ces protéines sont composées de cinq types de domaines, qui peuvent être répétés plusieurs fois sur l'ensemble du polypeptide : le peptide signal, la « tête », le « cou », la « tige », et enfin « l'ancre » (Fig.43).

#### III.2.2.1. L'« ancre »

L'ancre membranaire est un petit domaine (environ 70 résidus pour YadA et Hia), nécessaire et suffisant pour assurer le transport du domaine passager à travers la ME (Roggenkamp *et al.*, 2003; Surana *et al.*, 2004). La détermination de la taille de ce domaine sur gel d'acrylamide indiquait la formation d'un trimère. La résolution de la structure de ce domaine pour YadA et Hia est venue confirmer et éclaircir le modèle (Fig.44A, B et C) (Meng *et al.*, 2006; Wollmann *et al.*, 2006). Dans les deux cas, la structure est identique : chaque monomère apporte un feuillet de 4 brins  $\beta$  antiparallèles (Fig.44A) qui va s'associer en trimères et ainsi former un tonneau  $\beta$  de 12 brins (Fig.44B), à l'image de ce qui se passe pour les ATs classiques. De plus, ici, ce n'est pas une, mais trois hélices  $\alpha$  qui sont insérées dans le tonneau  $\beta$ , ce qui n'empêche pas une très bonne superposition des tonneaux de Hia et NalP (Fig.44D). Les dimensions du pore sont du même ordre (18 Å de diamètre pour Hia, contre 10 Å pour NalP), de même que le nombre et l'orientation des brins par rapport à l'axe du canal (Meng *et al.*, 2006; Oomen *et al.*, 2004). Cette ancre est chargée d'assurer l'adressage à la membrane externe. Le numéro de domaine PFAM03895 a été attribué à ce type de domaine.

#### III.2.2.2. La « tige »

La tige est une région de taille variable, fibrillaire, constituée d'hélices  $\alpha$  associées en « coiled-coils » (Linke *et al.*, 2006). Elle est le prolongement des trois hélices qui sont insérées dans le tonneau  $\beta$  (Fig.44A, B et C, et Fig.46B). Les motifs qui la constituent peuvent être répétés de nombreuses fois, séparées par des régions « cous », conduisant à des TAAs de tailles diverses, conférant ainsi une spécificité à la bactérie dans sa capacité à adhérer à des



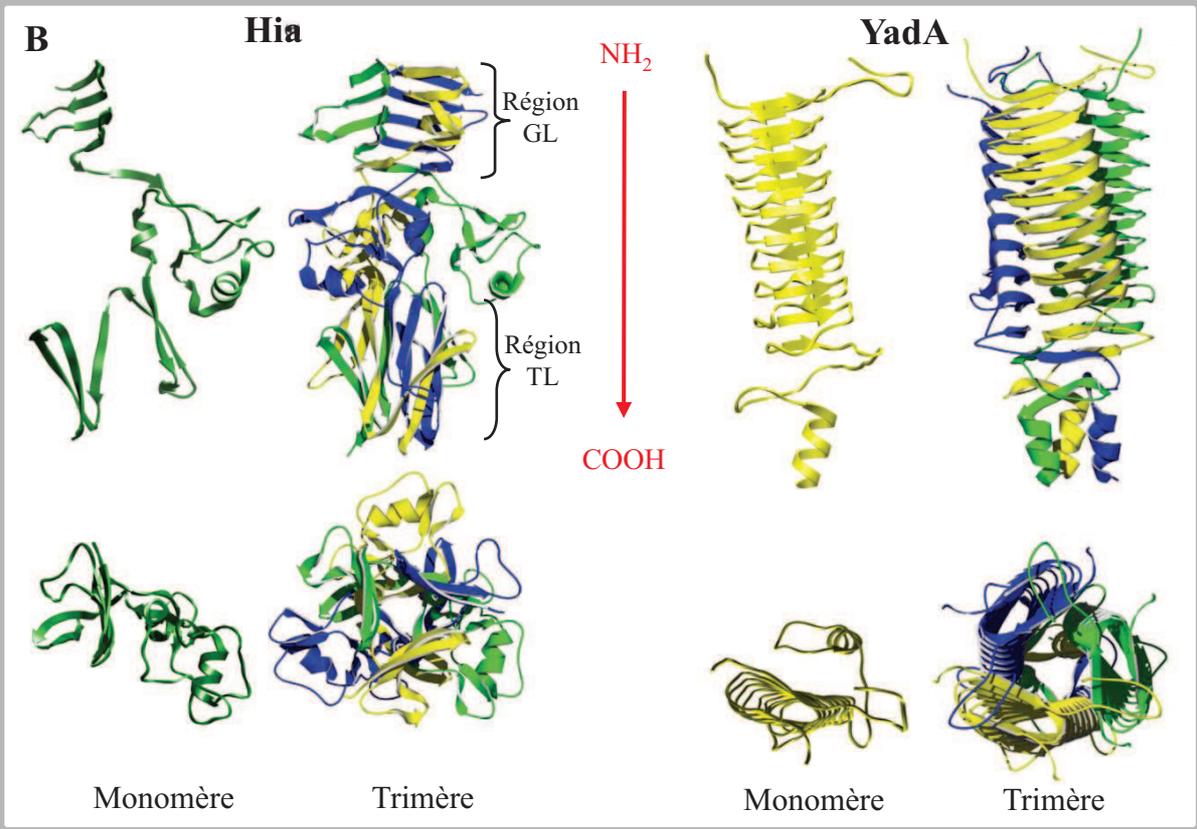
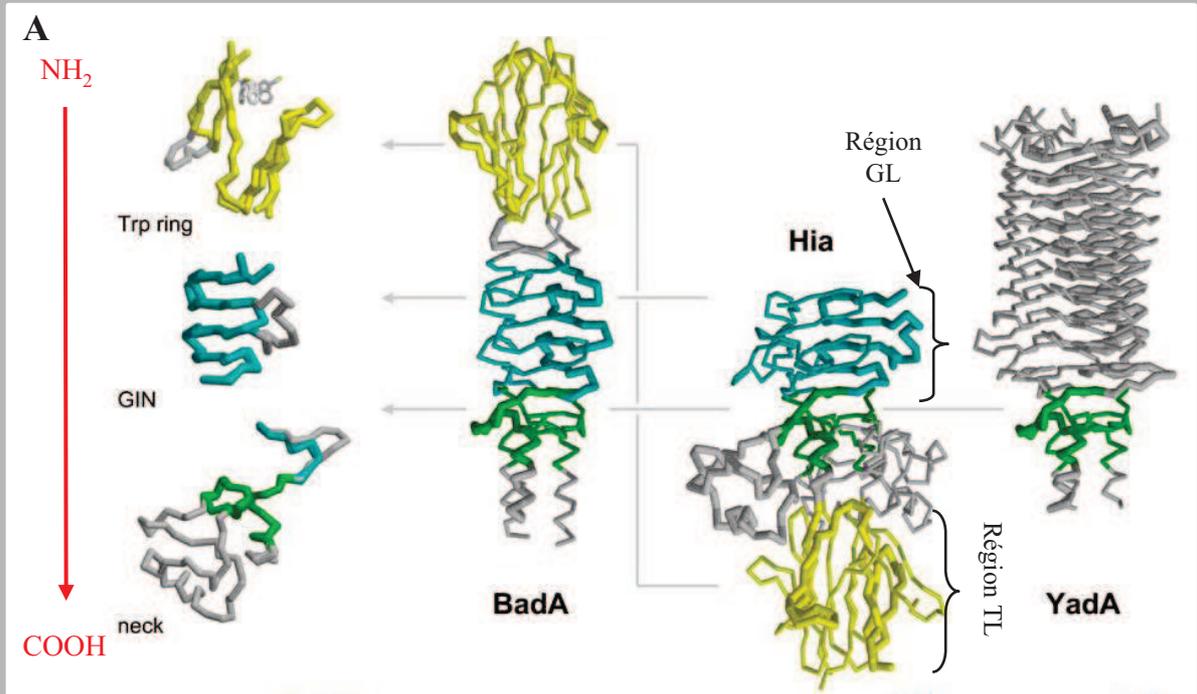
récepteurs sur les cellules cibles (puisque les TAAs sont des adhésines). Dans certains cas, les tiges peuvent posséder des domaines particuliers. C'est par exemple le cas de la protéine UpaG présente chez les *E. Coli* uropathogènes : elle possède plusieurs répétitions de motifs trouvés sur les invasines et les hémagglutinines (motif Hep-Hag et motif Him respectivement) (Valle *et al.*, 2008).

### III.2.2.3. Le « cou »

Les régions cou sont des petites zones qui connectent deux régions tiges ou une tige et la tête (Fig.43). Elles ne possèdent pas d'éléments de structure secondaire réguliers, mais leur structure est très proche d'une protéine à l'autre si l'on compare celles de Hia, YadA et BadA de *Bartonella henselae* (Fig.45A) (Szczesny *et al.*, 2008). Elles forment une zone riche en liaisons hydrogènes, créant un cœur hydrophobe, ne faisant néanmoins pas intervenir les chaînes latérales des résidus. Ceci est plutôt étonnant dans la mesure où l'identité de séquence de cette région entre deux protéines données est de l'ordre de 50% (Hoiczkyk *et al.*, 2000).

### III.2.2.4. La « tête »

Enfin, la tête, région située à l'extrémité N-terminale (après le peptide signal) est responsable de la capacité d'adhérence des TAAs. Elle est également trimérique et est principalement composée d'hélices  $\beta$ . La structure de la tête de Hia (Yeo *et al.*, 2004) révèle un agencement en deux régions (Fig.45B). La première (du côté N-terminal) est composée de feuillets de 4 brins  $\beta$  antiparallèles, formant une hélice  $\beta$  proche de ce qui est vu pour les ATs classiques, et les brins sont orientés perpendiculairement à l'axe de la protéine. Pour faciliter la lecture j'appellerai cette région GL (pour GIN-like, voir plus loin). La deuxième partie est un agencement de 3 feuillets mixtes de 5 brins  $\beta$  formant une structure « fermée » (à la manière d'un triangle). Chaque feuillet est composé de brins provenant des 3 monomères. Ici, les brins  $\beta$  sont orientés parallèlement à l'axe de la protéine. Je nommerai cette région TL (pour Trp-ring like, voir plus loin). Entre ces deux parties se trouve un « cou » entouré par quelques éléments de structures secondaires.



- Figure 45 -  
Les têtes des TAAs

(voir légende page suivante)

- Figure 45 -

### Les têtes des TAAs (page précédente)

(A) La structure de BadA (Szczeny *et al.*, 2008) est composée d'un « Trp Ring » (en jaune) que l'on retrouve aussi chez Hia (région TL), suivie d'une région GIN (en bleu), également présente chez Hia (région GL), séparée de la tige par un cou (en vert), que l'on retrouve chez Hia, entre les parties TL et GL, et chez YadA entre la tige et la tête.

(B) Structures de Hia (Yeo *et al.*, 2004) et de YadA (Nummelin *et al.*, 2004). Hia est composée de 2 régions: une avec les brins perpendiculaires à l'axe de la protéine (GL, pour GIN-like), l'autre avec les brins parallèles (TL, pour Trp-ring like). Les 3 monomères de YadA forment des hélices  $\beta$  qui s'associent pour créer une super structure d'hélice  $\beta$ . En haut: vue de côté; en bas: vue du dessus.

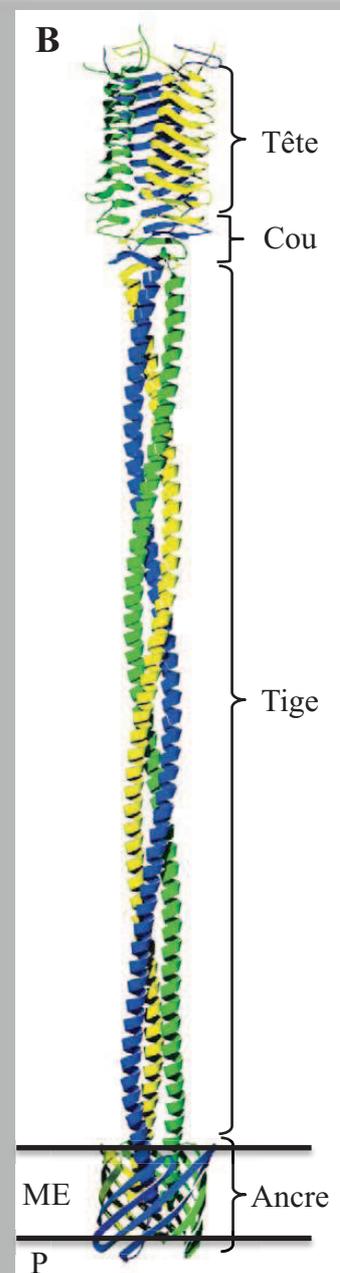
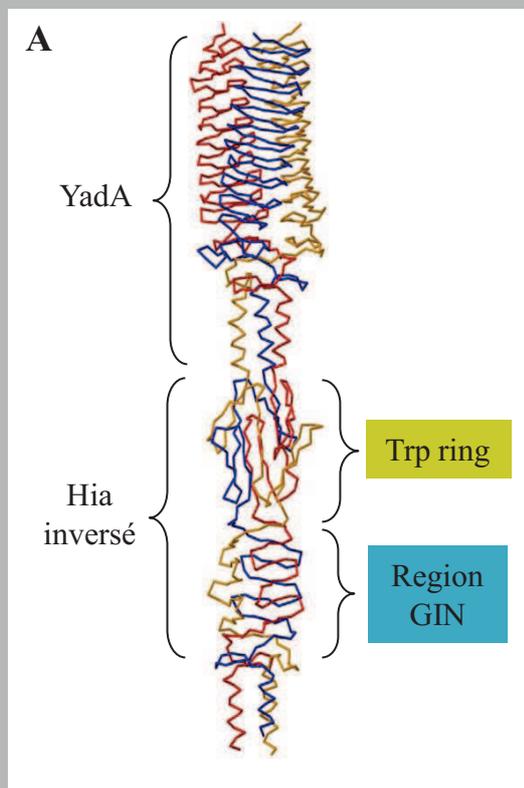
- Figure 46 -

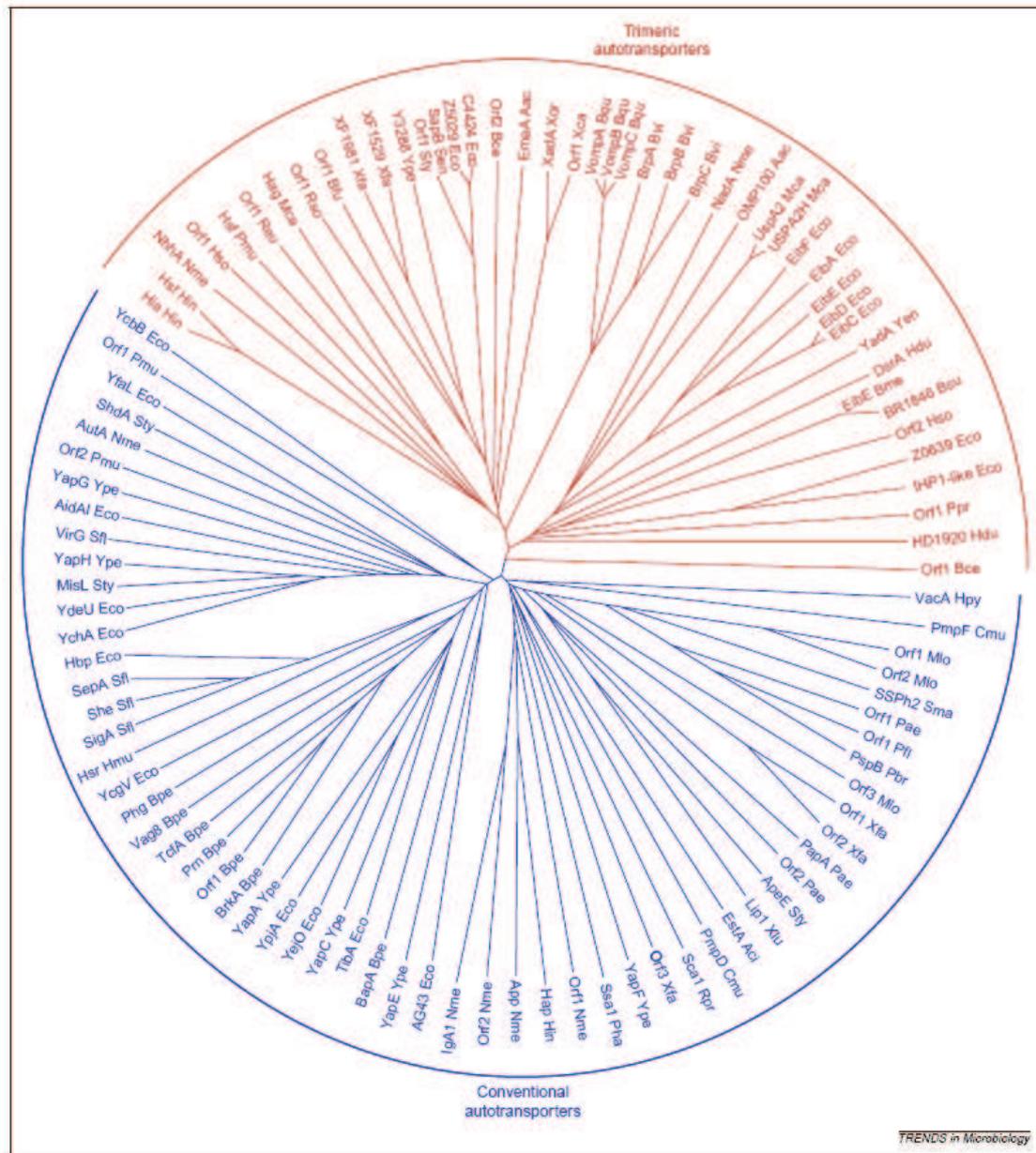
### Modélisation des TAAs

(A) Modélisation de la totalité de la tête de BadA (Szczeny *et al.*, 2008). BadA est la somme de la tête de YadA, et de Hia (avec une inversion du Trp Ring et de la région GIN par rapport aux régions TL et GL de Hia).

(B) Modélisation de la protéine YadA entière (Linke *et al.*, 2006).

ME: Membrane Externe; P: Périplasma.





- Figure 47 -

Séparation des tonneaux monomériques (SST5a) et trimériques (SST5c)

Alignement des 300 derniers résidus d'une série d'AT classiques (SST5a, en bleu) et trimériques (SST5c, en rouge).

(D'après Cotter et al., 2005)

La tête de la protéine YadA est relativement différente (Fig.45B) (Nummelin *et al.*, 2004). Également trimérique, elle est organisée en 3 hélices  $\beta$  (dont chaque tour est lui-même composé de 2 brins  $\beta$ ) qui s'associent pour former une superstructure de type hélicoïdale. Elle est reliée à la tige par un « cou ». Malgré quelques différences structurales, la prédominance de structure  $\beta$  dans la tête des TAAs est flagrante et présuppose un rôle dans le mode de sécrétion.

La protéine BadA, quant à elle, est une somme de ces deux derniers exemples (Fig.45A, Fig.46A), puisque la tête de BadA est composée de trois parties (du C→N-terminal) : (i) une région « GIN », similaire à la région GL de Hia (Fig.45A), nommée ainsi en raison de la conservation d'un motif Gly-Ile-Asn); (ii) une région appelée « Trp ring », en raison d'un motif Gly-Trp conservé, également retrouvée chez Hia (région TL, Fig.45A); (iii) la dernière partie montrant une grande similarité avec la tête de YadA, les auteurs ont choisi de la modéliser plutôt que de déterminer sa structure par cristallographie. Finalement la tête de BadA est une somme des différentes parties retrouvées chez Hia et YadA, en notant toutefois que chez BadA de la région « GIN » et du « Trp ring » sont inversées par rapport à celles de Hia, et qu'elles sont séparées par des « cous » (Fig.45A, Fig.46A).

### III.2.2.5. Des Autotransporteurs dédiés

L'architecture de ces protéines (formation de tonneau  $\beta$  de douze brins, s'insérant dans la membrane externe, obstrués par des structures de type hélice  $\alpha$ , reliées *in fine* à un domaine actif agencé en hélice  $\beta$ , voir Fig.46B) et son rôle d'export à travers la ME ont conduit à considérer ces protéines comme des ATs, mais d'une catégorie différente. Cette différence se visualise notamment par leur rassemblement en deux groupes phylogénétiques différents (obtenus par l'alignement des 300 derniers résidus d'une série d'ATs classiques et trimériques, voir Fig.47) (Cotter *et al.*, 2005). Une autre différence intéressante est qu'alors que les ATs classiques sont des protéines associées à la virulence de la bactérie, on retrouve des TAAs chez des souches tant pathogènes qu'environnementales (Hoiczuk *et al.*, 2000). La prédominance de domaines adhésines au sein des TAAs témoigne vraisemblablement d'une stratégie évolutive développée pour améliorer la force de l'interaction entre la bactérie et un ligand donné (Cotter *et al.*, 2005). La présence sur un même complexe peptidique de trois



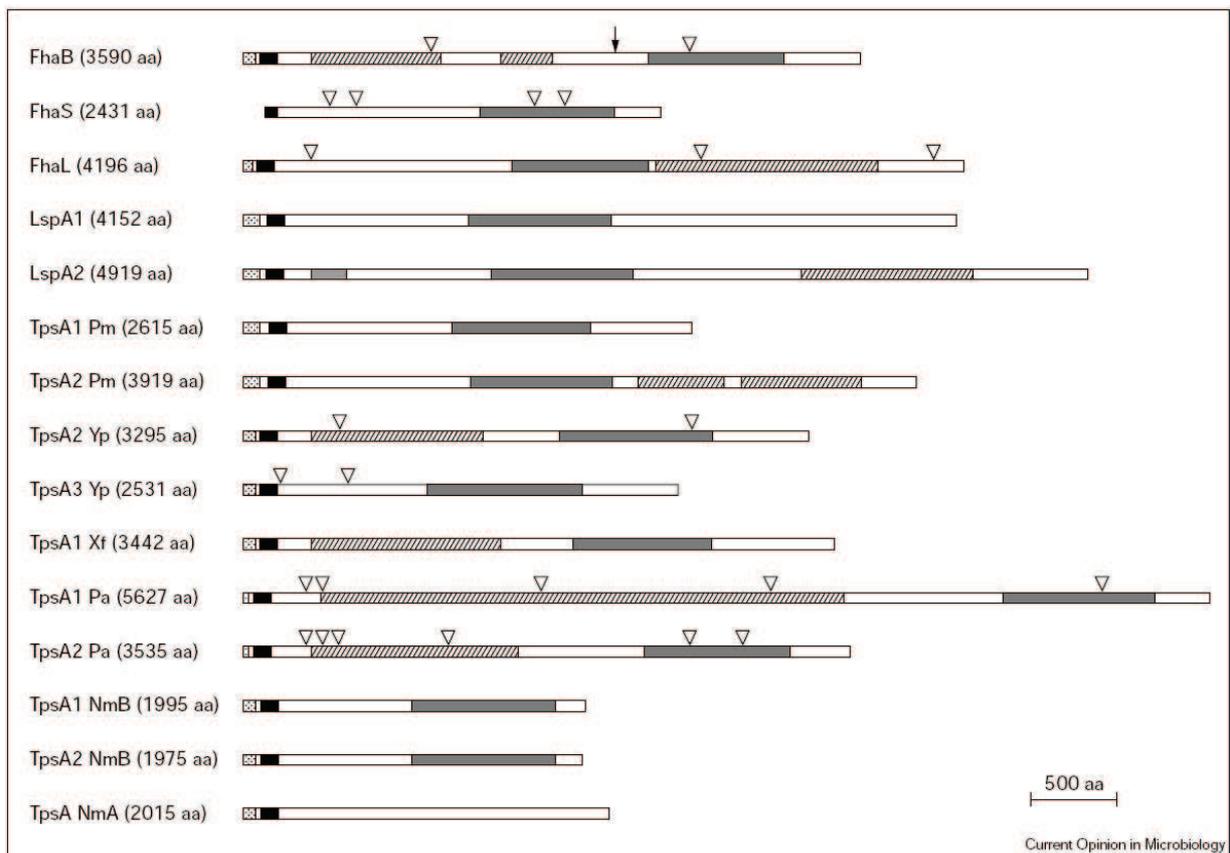
sites de fixation pour un type de ligand pourrait ainsi complexifier l'étape de dissociation entre ce ligand et l'adhésine.

### III.2.3. Les « Two-Partner Secretion » (TPS ou SST5b)

Le système TPS, ou SST5b, compte parmi les stratégies élaborées par l'évolution pour permettre aux bactéries à Gram négatif de sécréter des protéines vers le milieu extracellulaire. Pendant un certain temps, il a été considéré comme exclusif aux bactéries pathogènes, permettant notamment la sécrétion de facteurs de virulence. Il a depuis lors été observé dans la plupart des *phyla* des bactéries à Gram négatif, mais aussi chez des champignons, des plantes et des animaux (Yen *et al.*, 2002). Il permet généralement l'exposition à la surface ou la sécrétion de larges exoprotéines (souvent plus de 3000 résidus). Il fait intervenir deux protagonistes (Fig.35) : (i) l'exoprotéine en question, appelée de manière générique TpsA, qui est responsable d'une activité enzymatique ou adhésive ; (ii) un transporteur spécifique, le TpsB, qui permet au TpsA d'être adressé et transloqué à travers la ME. Ces deux protagonistes sont le plus souvent (mais pas nécessairement) codés par des gènes organisés en opéron.

Les TPS permettent une sécrétion en deux étapes, puisque le TpsA et le TpsB ont un peptide signal qui leur permet de franchir la MI par l'intermédiaire de la machinerie Sec. Une fois dans le périplasme, le TpsB a la faculté de former un tonneau  $\beta$  de 16 brins antiparallèles, qui va être inséré dans la ME. Le canal ainsi formé permet alors au TpsA de traverser la ME. La reconnaissance entre le TpsA et le TpsB intervient par l'interaction physique entre un domaine « TPS » du TpsA, et un domaine « POTRA » (polypeptide transport associated) du TpsB, tous deux situés en N-terminal de leur protéine respective. Cette interaction est très spécifique, puisqu'un TpsB d'un système ne permet la sécrétion que de son TpsA correspondant. *In fine*, le TpsA peut être relargué dans le milieu extracellulaire, ou rester associé à la ME de manière non covalente.

Les systèmes les mieux étudiés sont ceux de l'hémagglutinine filamenteuse de *B. pertussis* et *Bordetella bronchiseptica* (FHA et FhaC), l'adhésine HMW1A et son TpsB correspondant, HMW1B, de *H. influenzae*, et enfin, l'hémolysine de *Serratia marcescens* (Sh1A et Sh1B).



- Figure 48 -

### Représentation schématique de plusieurs TpsA

Les tailles sont données entre parenthèses. En pointillés: peptide signal; en noir: domaine TPS; en hachuré: région répétées, sans homologie entre ces protéines; en gris: région homologue à FhaB, le précurseur de FHA (TpsA du système FHA-FhaC de *B. pertussis*)

Pm: *Pastorella multocida*; Yp: *Y. pestis*; Xf: *Xylella fastidiosa*; Pa: *P. aeruginosa*; Nm: *Neisseria meningitidis*

(D'après Locht et al., 2001)

L'architecture des protéines TPS est décrite dans les paragraphes suivants. Le mécanisme de sécrétion sera traité conjointement à celui des ATs.

### III.2.3.1. Le TpsA

Les fonctions associées aux TpsA sont diverses et peuvent intervenir dans l'adhérence, la cytolysse, la captation de fer (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004). De fait, lorsque la fonction de deux TpsA diffère, la conservation de séquence entre ces protéines est relativement faible. Cependant, quelques caractéristiques communes se dégagent. Les TpsA sont généralement de très grandes protéines, puisque plusieurs d'entre eux ont plus de 3000 résidus, dont un chez *P. aeruginosa* qui est constitué de 5627 acides aminés, soit 573 kDa (Fig.48) (Locht *et al.*, 2001).

Tous les TpsA sont synthétisés avec un peptide signal, puisqu'ils sont dépendants de la machinerie Sec, et plusieurs d'entre eux ont un domaine peptidique additionnel qui va être clivé au cours du processus de sécrétion. La plupart des TpsA sont donc initialement synthétisés sous formes de pré-pro-protéines. De plus, une région des TpsA est assez bien conservée, c'est celle du domaine « TPS ».

#### III.2.3.1.1. Le domaine TPS

Ce domaine est localisé en N-terminal du TpsA. Il est généralement constitué d'environ 300 acides aminés. Il s'agit du seul domaine conservé au sein de ces protéines, si l'on exclut les similarités de séquence entre deux TpsA liées à une même activité. Il a été démontré comme nécessaire et suffisant à la sécrétion de FHA, HMW1A, et Sh1A (Grass & St Geme, 2000; Jacob-Dubuisson *et al.*, 1996; Schonherr *et al.*, 1993). Ce domaine est composé d'une alternance de deux régions de grande conservation (C1 et C2), et de faible conservation (LC1 et LC2), comme l'illustre l'alignement de plusieurs domaines TPS (Fig. 49A) (Clantin *et al.*, 2004; Mazar & Cotter, 2007).

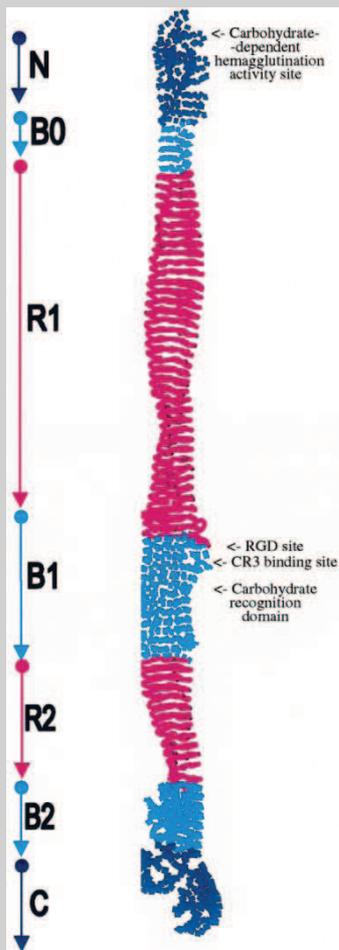
Une étude détaillée du domaine TPS de FhaB, le précurseur de FHA, rapporte que des mutations dans les régions LC n'ont aucune incidence sur le mécanisme de sécrétion, alors



que des mutations dans les régions C affectent la sécrétion et/ou l'interaction entre le domaine TPS de FhaB et FhaC (son TpsB) (Hodak *et al.*, 2006). La structure du domaine TPS de FhaB permet de comprendre un peu mieux comment ces régions sont agencées entre elles (Clantin *et al.*, 2004). Conformément aux prédictions réalisées préalablement (Kajava *et al.*, 2001), ce domaine forme une hélice  $\beta$  droite de 9 tours (Fig.49B). Cette hélice est constituée de 3 feuillets  $\beta$  parallèles, agencés en triangle, et 3 domaines additionnels sont présents : un feuillet de 4 brins à l'extérieur de l'hélice, un  $\beta$ -hairpin, et un couvercle au sommet de l'hélice, formé par l'extrémité N-terminale. On note que les régions LC comprennent deux des trois motifs additionnels : la région LC1 couvre l'hélice en son sommet, et la région LC2 comprend le feuillet additionnel de 4 brins (Fig.49C). Il a été proposé que les régions C soient bien conservées en raison de principes communs à la sécrétion par ce type de système, et que les régions LC soient plus divergentes car spécifiques au TpsA.

De plus, les résidus conservés dans ce domaine (dans les régions C) semblent jouer un rôle stabilisateur dans la structure globale. Par exemple, les acides aminés des motifs NPNL et NPNGI (motifs très bien conservés en C1) qui forment des tours  $\beta$  de type I, sont probablement importants pour la continuité de l'hélice  $\beta$ . Par ailleurs, la substitution de la première Asparagine du motif NPNGI en Isoleucine entraîne une perte partielle, voire totale, de la sécrétion de FHA et ShlA (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1997; Schonherr *et al.*, 1993). Ceci traduit son importance dans le mécanisme de sécrétion. Paradoxalement, la même mutation n'entraîne aucun effet pour HMW1A (St Geme & Grass, 1998). De même, la mutation du motif NPNGI en IAIGI ne réussit seulement qu'à abolir la maturation du TpsA sans pour autant altérer sa translocation à travers la ME, et ses capacités d'adhérence. On s'aperçoit donc que le rôle du motif NPNGI semble différent selon la situation. L'hypothèse qui conjecture que les régions C du domaine TPS sont spécifiques au mécanisme général de sécrétion doit visiblement être affinée.

La différence entre FhaB, ShlA et HMW1A est corrélée par l'alignement des domaines TPS de ces protéines et de leurs plus proches homologues respectifs. On remarque en effet des différences dans l'organisation de ce domaine, et il est plus difficile d'isoler des régions de haute et basse conservation communes (Fig.49A) (Mazar & Cotter, 2007). L'éloignement ici observé traduit sans doute la spécificité propre à chaque système. Il semble donc évident que derrière la simplicité supposée de ce mode de sécrétion, des règles subtiles régissent le bon fonctionnement de cette machinerie.



- Figure 50 -  
Modélisation du domaine transporté de FHA

R1 et R2: régions composées de motifs répétés très proches  
B0, B1 et B2: régions composées de motifs répétés plus dégénérés que R1 et R2 sans aucune indication de structure.

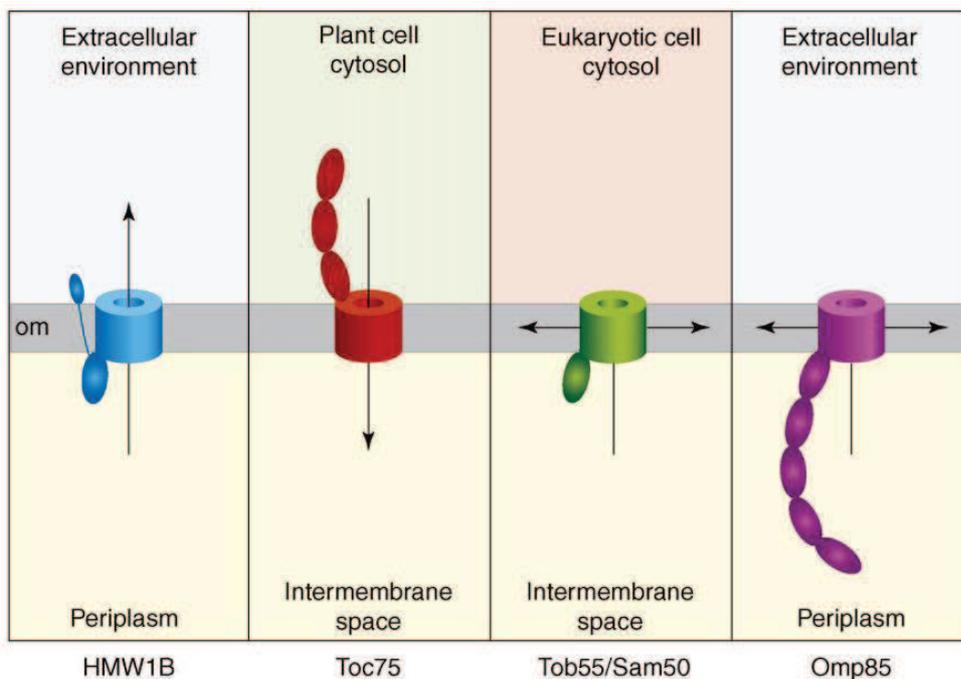
(D'après Kajava et al., 2001)

- Figure 51 -

Les protéines de la famille « Omp85-TpsB »

Les tonneaux  $\beta$  sont représentés par des cylindres, les domaines POTRA par des ovales. Les flèches indiquent la direction du transport de la protéine substrat. En bleu: HMW1B de *H. influenzae*; en rouge: Toc75 des chloroplastes; en vert: Sam50 des mitochondries; en violet: Omp85 de *N. meningitidis*.

(D'après Mazar & Cotter, 2007)



### III.2.3.1.2. Le domaine transporté

Ce domaine est responsable de l'activité du TpsA. La cytolysine ShlA forme des pores dans la membrane et entraîne la lyse de cellules épithéliales humaines. FHA est une adhésine qui permet par exemple l'agrégation bactérienne, tout comme la protéine HecA d'*Erwinia chrysantemi*. HMW1A est aussi une adhésine, elle permet l'attachement aux cellules épithéliales humaines, et elle est semblable à P95 de *Campylobacter jejuni*. HxuA de *H. Influenzae* est quant à elle impliquée dans la captation du fer (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004).

Aucune structure de domaine transporté/sécrété de TpsA n'a été obtenue, à l'exception du domaine TPS de FhaB (Clantin *et al.*, 2004). Cependant, il est admis que la structure la plus cohérente pour ces domaines en général, et pour celui de FHA en particulier, soit une hélice  $\beta$  : (i) la mesure par dichroïsme circulaire de la teneur en éléments structuraux de type  $\alpha$  ou  $\beta$  révèle une très grande quantité de structures  $\beta$  (Makhov *et al.*, 1994) ; (ii) les images obtenues par microscopie électronique suggèrent que FHA adopte une structure filiforme très allongée (50 nm) (Kajava *et al.*, 2001; Makhov *et al.*, 1994); (iii) l'analyse de la séquence de FHA montre la présence de motifs répétés de 19 résidus, principalement visualisables dans 2 régions nommées R1 et R2, mais aussi entre ces régions (Fig.50). Ces répétitions correspondraient à un tour d'hélice (ou « coil ») (Kajava *et al.*, 2001; Makhov *et al.*, 1994) ; (iv) le domaine TPS de FHA est structuré en hélice  $\beta$  (Fig.49B), il est en N-terminal du domaine transporté avant le clivage final (s'il a lieu), il est donc cohérent d'imaginer que la structure dans son ensemble soit similaire (Clantin *et al.*, 2004); (v) Les domaines passagers des ATs (qu'ils soient classiques ou trimériques) forment également pour la plupart une hélice  $\beta$  (Fig.37, Fig.38) (Emsley *et al.*, 1996; Otto *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2009). Il y a donc une homogénéité retrouvée au niveau structural entre des protéines utilisant un mode de sécrétion commun (ou extrêmement proche).

Toutes ces données permettent de supposer que le TpsA dans son ensemble forme une hélice  $\beta$ , et que ce type de repliement soit la norme non seulement aux TpsA dans leur majorité, mais au SST5 dans sa globalité (en acceptant malgré tout des exceptions, tel EstA par exemple).



### III.2.3.2. Le TpsB

Le TpsB est la protéine qui permet la translocation du TpsA qui lui est associé. Il appartient à la superfamille dite « Omp85-TpsB », ou famille des protéines à tonneau  $\beta$ , qui sont des protéines de ME. On retrouve dans cette famille les protéines BamA (Omp85/YaeT) et leurs homologues, qui permettent l'insertion dans la ME des OMPs (Voulhoux *et al.*, 2003), Tob55, Sam 50 et leurs homologues qui permettent l'insertion de polypeptides dans la ME mitochondriale (Gentle *et al.*, 2004; Kozjak *et al.*, 2003), et Toc 75 et ses homologues qui assurent le transport des protéines du cytosol des cellules de plantes vers l'espace inter membranaire du chloroplaste (Fig.51) (Reumann *et al.*, 2005).

La taille des TpsB est généralement comprise entre 500 et 800 résidus. Leur séquence n'est pas très bien conservée, particulièrement sur le domaine N-terminal. Ces protéines ont pour rôle de former un tonneau  $\beta$  qui va servir de canal pour le transit du TpsA. De fait, c'est sur le plan structural que leur homologie est flagrante. Ils sont composés de deux domaines, le N-terminal qui est constitué de un ou plusieurs domaines POTRA, localisé(s) dans le périplasme, et d'un domaine C-terminal qui est le domaine  $\beta$  à proprement parlé, inséré dans la ME. La résolution de la structure de FhaC par le Dr Clantin et ses collaborateurs a permis de mieux appréhender le rôle de ces deux domaines (voir plus loin) (Clantin *et al.*, 2007).

#### III.2.3.2.1. Le domaine POTRA

Le domaine POTRA est retrouvé sur la moitié N-terminale du TpsB. La séquence des domaines POTRA n'est pas particulièrement conservée (Fig.52A), contrairement à sa structure : il forme un petit module constitué d'un petit feuillet de 3 brins  $\beta$  antiparallèles, tapissé par deux hélices  $\alpha$  (Fig.52B et C) (Clantin *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007). Ces différents éléments de structure secondaire sont agencés selon un ordre  $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ , et ils forment une sorte de cavité hydrophobe. Les quelques résidus relativement conservés (tout du moins en terme de nature physico-chimique) sont des résidus hydrophobes orientés vers l'intérieur de cette cavité (Fig.52C) (Kim *et al.*, 2007). Les deux résidus les mieux conservés sont deux Glycines, localisés dans les boucles entre les hélices et les brins, avec notamment le motif GYF (Fig.52A), entre la deuxième hélice et le deuxième brin (Rem : en 2003, l'étude de Sanchez-Pulido et collaborateurs proposait que l'enchaînement de structures secondaires soit



$\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ , comme indiqué en noir sur la figure 52A. Il a depuis été observé que l'ordre réel est  $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$  comme noté en rouge sur cette même figure.

#### III.2.3.2.1.1. Chez les protéines de type BamA

Ce motif a été décrit pour la première fois par le Dr Sánchez-Pulido (Sanchez-Pulido *et al.*, 2003). Il est retrouvé au sein de protéines du règne eucaryote et procaryote, la plupart du temps sur des protéines formant un tonneau  $\beta$ . Ainsi, BamA, Toc75, Sam50, mais aussi FtsQ/DivIB, protéines bactériennes impliquées dans la septation bactérienne, possèdent de tels domaines (Sanchez-Pulido *et al.*, 2003). Des analyses *in silico* basées sur les modèles de Markov cachés (HMM), recherchant des homologues des domaines POTRA de chacune de ces protéines, indiquent que ces domaines sont connectés entre eux (Sanchez-Pulido *et al.*, 2003). En revanche, ces analyses n'ont pas identifié de nouvelles séquences non liées à ces domaines. Ils constituent donc bien un type indépendant de famille de domaine protéique.

La protéine Omp85 de *N. meningitidis* ou son homologue BamA d'*E. coli* (premièrement appelé YaeT) sont des protéines essentielles pour la viabilité de la bactérie qui contiennent cinq domaines POTRA successifs. Bien que ces protéines soient homologues, certaines différences, vraisemblablement liées à la différence entre les deux espèces, ont été relatées. Dans le cas de *N. meningitidis*, seul le domaine POTRA5 est absolument requis pour avoir un Omp85 fonctionnel (donc des bactéries viables), et il ne peut être remplacé par aucun des quatre autres (Bos *et al.*, 2007b). A l'inverse, chez *E. coli*, BamA nécessite les domaines 3, 4 et 5 pour assurer la viabilité de la bactérie, bien que des délétions isolées de ces domaines n'empêchent pas la bonne insertion du BamA recombinant dans la ME (Kim *et al.*, 2007)). De plus, la délétion du seul domaine POTRA de la protéine mitochondriale Sam50 entraîne une perte de l'import d'OMP à tonneau  $\beta$ , et une diminution de la croissance de la levure seulement (Habib *et al.*, 2007). Dans le cas de cette protéine, le domaine POTRA n'est donc pas requis pour la viabilité de l'organisme.

Afin de mieux comprendre ces différences constatées entre les rôles des domaines POTRA de protéines homologues, ou entre ceux d'une même protéine, Bos et collaborateurs ont aligné entre eux les domaines POTRA de 59 BamA d'espèces bactériennes différentes (Bos *et al.*, 2007b). Il en résulte que ces domaines sont groupés en fonction de leur position sur la protéine, suggérant des rôles différents pour chacun des POTRA d'une protéine



- Figure 53 -

### Distribution des domaines POTRA des protéines BamA et Sam50

Les séquences des domaines POTRA des protéines BamA de 59 espèces bactériennes différentes et de 22 homologues mitochondriaux de BamA ont servi à construire cet arbre phylogénétique (Bos *et al.*, 2007b). Encadré rouge: regroupement des POTRA1, POTRA5 et POTRA de Sam50.

(Fig.53). A ce titre, il est intéressant de noter que le seul domaine POTRA de Sam50, non essentiel pour la viabilité de la levure (Habib *et al.*, 2007), est retrouvé associé à deux clusters, celui qui regroupe les POTRA1, et celui qui regroupe les POTRA5. L'hypothèse est donc que le domaine de Sam50 ait évolué depuis un POTRA appartenant à l'un de ces deux clusters, et plus probablement du cluster des POTRA5, puisque ceux-ci sont essentiels.

Enfin, dans les protéines de ces familles, il a été rapporté que le POTRA5 était impliqué dans l'interaction avec des protéines, que ce soit avec des protéines substrats (des précurseurs de protéines à tonneau  $\beta$ ) ou accessoires (des lipoprotéines du complexe Bam, dont BamA est l'élément principal) (Kim *et al.*, 2007; Robert *et al.*, 2006).

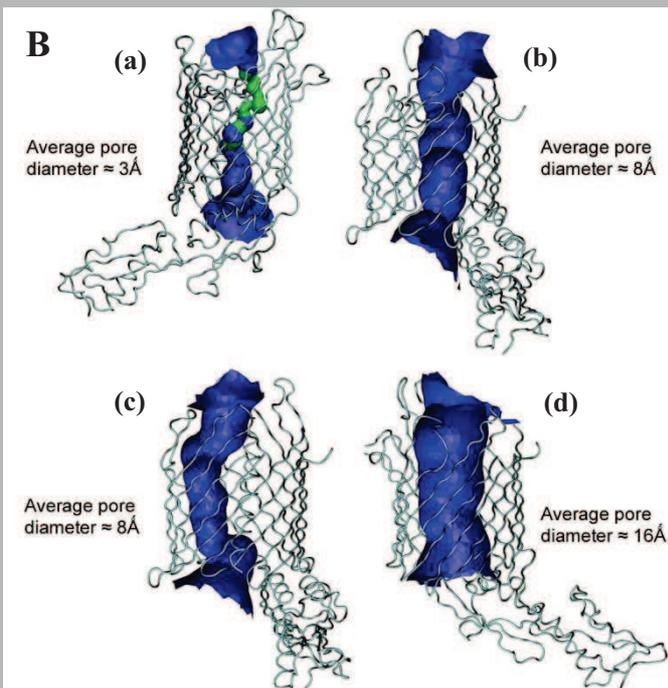
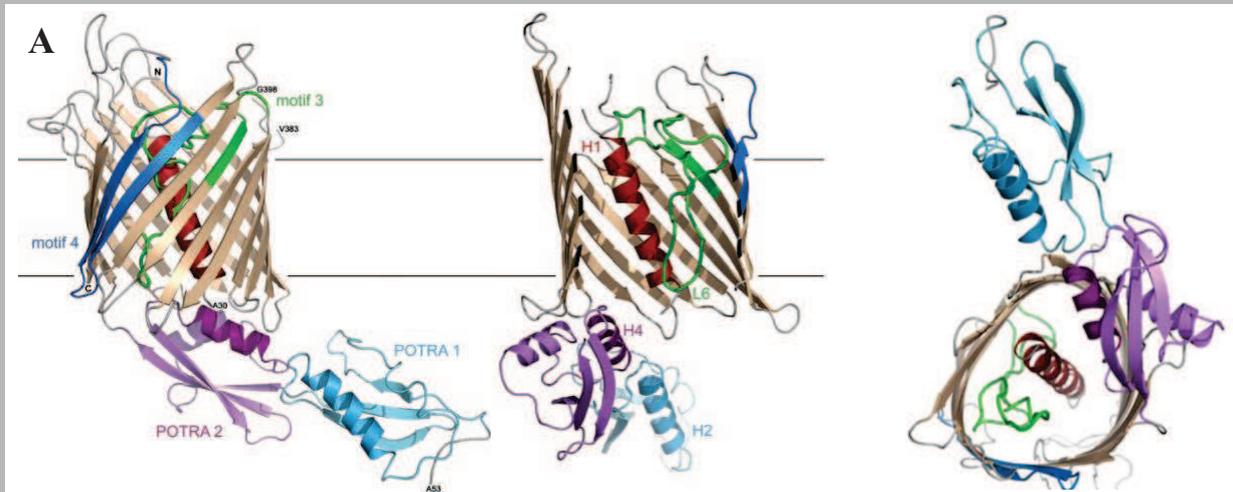
#### III.2.3.2.1.2. Chez les TpsB

Dans le cas précis de FhaC, le domaine POTRA est en double copie, situé après l'hélice H1 N-terminale qui est insérée dans le tonneau  $\beta$  (Fig.54A) (Clantin *et al.*, 2007) (voir plus loin pour l'hélice H1). La sécrétion de FHA requiert les deux POTRA, ainsi qu'une orientation correcte dans l'espace (Clantin *et al.*, 2007; Guedin *et al.*, 2000). A contrario, la délétion de l'un ou l'autre des POTRA de FhaC ne nuit pas à la formation du canal (Clantin *et al.*, 2007). Ceci s'explique par le fait que les domaines POTRA sont impliqués dans l'interaction protéine-protéine avec le domaine TPS de FHA, notamment au niveau d'une des hélices du POTRA1 comme rapporté dans l'étude du Dr. Clantin (Clantin *et al.*, 2007; Hodak *et al.*, 2006). De plus, FHA doit être dans une conformation dépliée pour pouvoir interagir avec FhaC (Hodak *et al.*, 2006).

Le domaine POTRA est donc responsable de la reconnaissance spécifique de la protéine avec son substrat, que ce soit dans le cas de BamA ou des TpsB.

#### III.2.3.2.2. Le domaine $\beta$ de FhaC

Il s'agit d'un tonneau  $\beta$  de 16 brins antiparallèles complètement inséré dans la ME (Fig.54A) (Clantin *et al.*, 2007). Il a été décrit qu'il forme un pore perméable aux ions dans des membranes artificielles (Meli *et al.*, 2006). Malgré un diamètre extérieur total d'environ



- Figure 54 -  
Structure de FhaC

(A) A gauche, au milieu: vue de côté; à droite, vu du dessous. Les domaines POTRA 1 et 2 sont en bleu clair et violet. En rouge: l'hélice H1 N-terminale; en vert: le motif 3, conservé (avec entre autres la boucle L6); en bleu: le motif 4 conservé.

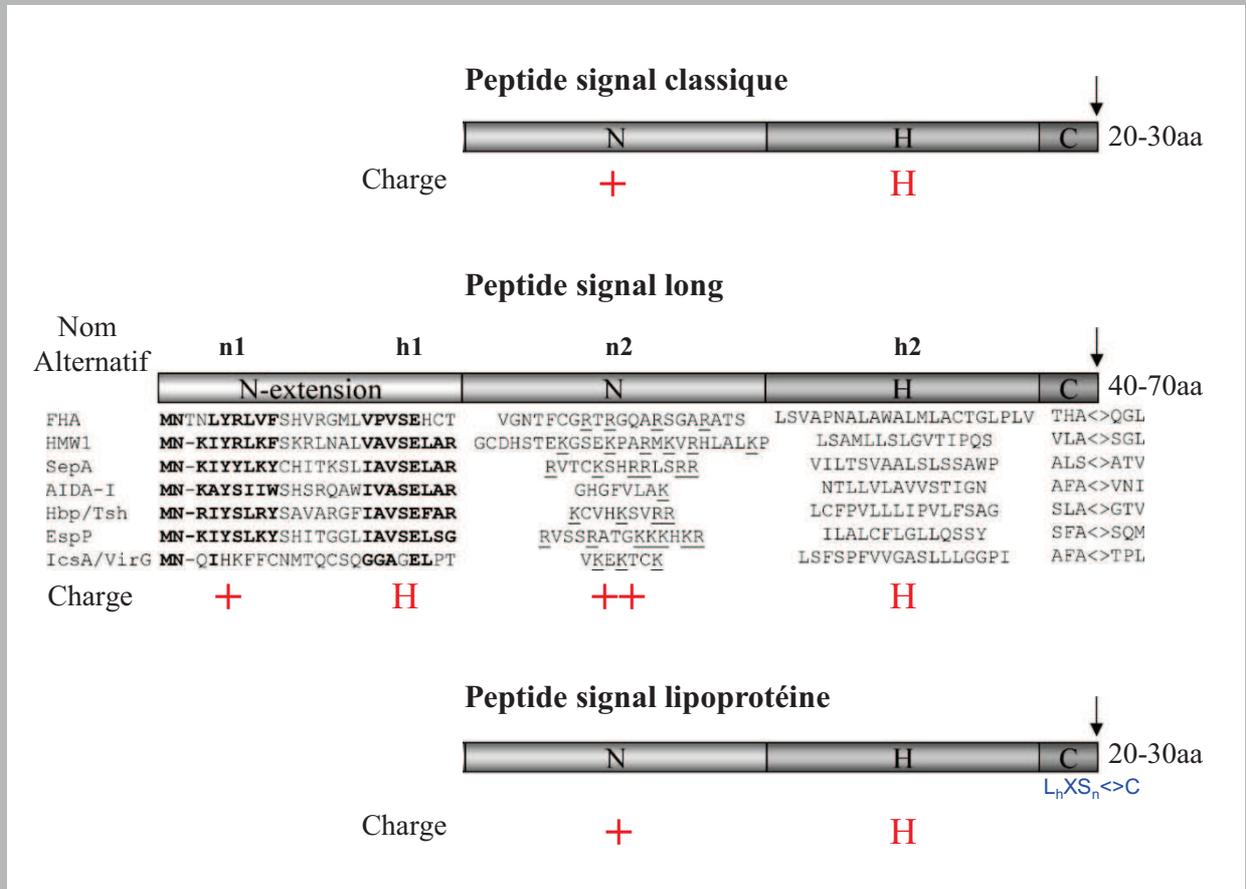
(B) Représentation de la taille du pore de FhaC pour la protéine sauvage (a), délétée de l'hélice H1 (b), de la boucle L6 (c), de l'hélice H1 et de la boucle L6 (d). Le canal est représenté en bleu, et le site de constriction pour la protéine sauvage est représenté en vert (a).

(D'après Clantin et al., 2007)

35 Å, le diamètre intérieur du pore ne mesure que 3 Å (Fig.54B(a)) (au lieu des 8,2 Å supposés par la valeur mesurée de la conductance), ceci en raison de la présence au centre du tonneau d'une hélice  $\alpha$  (hélice H1) et d'une grande boucle (boucle L6) qui obstruent la quasi-totalité du canal (Fig.54). La différence entre la taille prédite grâce à la conductance et celle mesurée sur la structure provient vraisemblablement de la mobilité de l'hélice et de la boucle (Fig.54B). Cette hélice H1 est le tout début de la protéine de FhaC. Son extrémité N-terminale est exposée du côté extracellulaire, et son extrémité C-terminale est orientée vers le périplasma (Fig.54A). Elle est ensuite reliée aux 2 domaines POTRA, eux-mêmes connectés au tonneau. La boucle L6 prend origine et se termine du côté extracellulaire, mais elle atteint le périplasma. Elle forme une boucle en épingle à cheveux flexible et établit plusieurs interactions avec les brins du tonneau. Sa délétion abolit la sécrétion de FHA, et change les propriétés de conductance intrinsèques du tonneau, suggérant une modification de la conformation de la protéine et de sa stabilité. La flexibilité de cette boucle et les valeurs de conductance mesurées laissent supposer qu'elle puisse être délogée du canal pour permettre le passage de FHA. Des études *in silico* ont montré qu'elle était conservée au sein des protéines de cette superfamille (Moslavac *et al.*, 2005). Elle constitue « le motif 3 », avec une séquence VRGY placée au milieu de la boucle, qui est en contact avec le compartiment périplasmique (Fig.54A). Un autre motif, le motif 4, est composé de résidus conservés de la face interne du tonneau  $\beta$ . Ces résidus sont positionnés tout au long de la boucle L6, ce qui souligne l'importance de cette boucle.

### **III.3. Mécanisme de Sécrétion**

Les protéines sécrétées par le SST5 empruntent trois voies de sécrétion qui sont vraisemblablement très similaires, puisque autant pour les ATs classiques ou trimériques, que pour les TPS, le même type d'architecture est retrouvé : un domaine sécrété ou exposé riche en hélices  $\beta$  dans la plupart des cas, un domaine transporteur en tonneau  $\beta$  qui s'insère dans la ME, et un peptide signal N-terminal qui permet le franchissement de la MI. Cependant, la mécanistique exacte de ce processus est remise en cause. Ce paragraphe vise à discuter du mécanisme de sécrétion tel qu'il a été décrit et admis depuis des années, et des nouvelles hypothèses apparues pour intégrer les données expérimentales qui contredisent le modèle traditionnel.



- Figure 55 -  
Peptides signaux

La taille des peptides signaux est indiquée à droite. Le site de clivage est représenté par une flèche et par un < > entre les 2 résidus clivés. Les charges de chaque région sont indiquées en rouge (+/++ pour chargé positivement/très positivement, H pour hydrophobe). La séquence particulière de clivage des peptides signaux de lipoprotéines est notée en bleu.  $L_n$  = résidu hydrophobe de grande taille (fréquemment une Leu),  $S_n$  = résidu neutre de petite taille.

(Adapté de Jacob-Dubuisson et al., 2004)

### III.3.1. La translocation à travers la membrane interne

Tous les substrats du SST5 étudiés à ce jour possèdent un peptide signal qui adresse la protéine à la machinerie Sec, ce qui permet l'export à travers la MI (Henderson *et al.*, 1998; Henderson *et al.*, 2004; Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004). Quelques cas ont été décrits expérimentalement, parmi lesquels les principaux modèles d'études de ces systèmes de sécrétion, comme par exemple les ATs IcsA de *Shigella flexneri* (Brandon *et al.*, 2003), et Hbp (Sijbrandi *et al.*, 2003), et les TpsA Sh1A (Braun *et al.*, 1992), et HMW1A (Grass & St Geme, 2000).

Certains ATs ou TpsA possèdent un peptide signal tout à fait classique, composé d'environ 20 à 30 résidus et de 3 régions : une région N-terminale positivement chargée (appelée région N), une région centrale à tendance hydrophobe (région H), et une région C-terminale qui comprend le site de clivage du peptide signal (Fig.55). La séquence même de ces peptides signaux n'est pas très bien conservée, à l'inverse de la nature physico-chimique de chacune de ces 3 régions (Driessen & Nouwen, 2008). C'est ainsi le cas pour la protéase gonococcique IgA. Il existe cependant une particularité propre aux protéines sécrétées par le SST5 : pour certaines d'entre elles, le peptide signal est inhabituellement long (Henderson *et al.*, 1998). On retrouve souvent ce peptide particulier chez les protéases de la famille SPATE par exemple, mais aussi chez d'autres ATs, et chez quelques TpsA, comme FHA, HMW1A et HMW2A (Henderson *et al.*, 1998; Henderson *et al.*, 2000).

#### III.3.1.1. Les longs peptides signaux

Ils sont composés de 40 à 70 résidus. Ils possèdent une extension bien conservée d'environ 25 résidus, localisée en N-terminal du peptide signal (Fig.55). Cette extension débute avec un motif consensus MN(R/K) et peut être divisée en 2 régions, une N-terminale à tendance plutôt chargée, et une C-terminale hydrophobe, composée du motif consensus LIAVSELAR. Dans ce cas, ces régions sont nommées n1 et h1, et les régions « classiquement retrouvées » dans les peptides signaux sont nommées n2 et h2 (en lieu et place de N et H respectivement) (Fig.55). La présence de cette extension entraîne également un léger changement dans la région n2, puisqu'elle possède plus de charges positives que dans les peptides signaux classiques (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004).



Il a été initialement supposé que ces longs peptides pouvaient avoir un rôle dans le type de translocation de la protéine. En effet, dans le cas de la protéine Hbp, il a été montré par des expériences de « cross-linking » *in vitro* et de « pulse-chase » *in vivo* que Hbp interagissait avec SRP (signal recognition particle), et que le mécanisme SRP devait être fonctionnel pour permettre une translocation optimale (Sijbrandi *et al.*, 2003). Ceci suppose une translocation co-translationnelle, au lieu du traditionnel processus post-translationnel, bien qu'il ne faille pas oublier que la délétion de SRP affecte l'insertion dans la MI de SecY, une protéine du translocon Sec, ce qui pourrait aussi expliquer le défaut de translocation en absence de SRP (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004).

Cependant, des études plus récentes montrent des résultats opposés. Le long peptide signal de l'AT Pet (protéase à Sérine) d'*E. coli* est responsable d'une translocation post-translationnelle de la protéine (Desvaux *et al.*, 2007). De plus, le remplacement du peptide signal de la thiorédoxine, protéine classiquement transloquée de manière co-translationnelle, par celui de Pet conduit à une translocation de la thiorédoxine de manière post-translationnelle. Il a également été montré que ce peptide assure un ralentissement de la translocation du peptide à travers le translocon Sec (Desvaux *et al.*, 2007; Peterson *et al.*, 2006). Autre exemple : l'AT EspP d'*E. coli* possède aussi un peptide signal long. Il assure une translocation post-translationnelle de la protéine par le système Sec, et de manière indépendante de SRP, et ici aussi, il ralentit la translocation à travers la MI (Peterson *et al.*, 2006; Szabady *et al.*, 2005). De manière similaire chez le TpsA FHA, le peptide signal long assure la translocation par la machinerie Sec, mais indépendamment de SRP, et de manière post-translationnelle (Chevalier *et al.*, 2004).

Ces expériences indiquent que le rôle de ces peptides signaux inhabituellement longs est vraisemblablement important, permettant de retarder la translocation et de choisir le mode d'adressage au système Sec. Ces données, couplées aux prédictions *in silico* supposant que la plupart des peptides signaux conventionnels ne sont pas reconnus par SRP, suggèrent que les ATs ou TpsA sont des protéines qui sont transloquées post-translationnellement dans un état non replié, et ce, malgré leur grande taille. Le rôle de la chaperonne DnaK fait ici vraisemblablement la différence puisqu'il a été montré qu'elle permet de maintenir les OMPs dans un état compétant pour la translocation, à l'inverse des protéines périplasmiques qui sont rapidement mal repliées et dégradées si elles restent trop longtemps dans le cytoplasme (Qi *et al.*, 2002).



### III.3.1.2. Les peptides signaux des lipoprotéines

Certains ATs sont des lipoprotéines, *i.e.* des protéines ancrées à la membrane par une ancre lipidique ajoutée sur une Cystéine. Ces protéines sont transloquées par le système Sec et elles ont un peptide signal qui possède la séquence  $L_hXS_nC$ ,  $L_h$  étant un résidu hydrophobe de grande taille (souvent une Leucine),  $S_n$  un résidu neutre de petite taille, et la Cystéine le premier résidu du polypeptide, celui sur lequel sont ajoutées les ancras lipidiques (Fig.55) (Bos *et al.*, 2007a). La localisation dans l'une ou l'autre des membranes de l'enveloppe de la lipoprotéine est dépendante de la nature du résidu juste après la Cystéine lipidée. Chez *E. coli*, un résidu Aspartate en +2 provoque la rétention de la lipoprotéine dans la MI, alors que n'importe quel autre résidu entraîne un adressage à la ME.

Il existe quelques cas d'ATs appartenant à cette catégorie de protéines, comme NalP (AspA) de *N. meningitidis* (Turner *et al.*, 2002), AlpA de *H. pylori* (Odenbreit *et al.*, 1999), SphB1 de *B. pertussis* (Coutte *et al.*, 2003).

### III.3.2. Un intermédiaire périplasmique ?

L'existence d'un intermédiaire périplasmique est l'une des nombreuses questions qui fait débat concernant le processus exact de sécrétion des substrats du SST5. L'existence ou non de cet intermédiaire génère deux autres questions : (i) les translocations à travers les deux membranes sont-elles des événements couplés ou dissociés ? (ii) si cet intermédiaire existe, quel est son état de repliement dans le périplasma ?

En définitive, beaucoup de données contradictoires ont été publiées, rendant difficile la mise en place d'un modèle universel qui concilie l'ensemble de ces données.

#### III.3.2.1. Couplage des translocations ?

Certains éléments laissent penser que ce couplage existe bel et bien. Chez les ATs par exemple, le cas d'EspP a révélé un rôle additionnel du long peptide signal. Déjà impliqué dans le ralentissement de la translocation d'EspP à travers la MI, celui-ci est aussi nécessaire pour une translocation efficace à travers la ME : avec un peptide signal classique, le tonneau  $\beta$  n'est pas correctement replié, et le domaine passager est inaccessible à la protéinase K,

Protéine	SST5?	Couplage	Eléments	Ref
EspP	AT	+	Peptide signal long nécessaire à la translocation de la ME	Szabady, 2005
FHA	TPS	+	Dégradation de FHA en l'absence de FhaC/ Impossibilité d'isoler un état périplasmique de FHA	Guédin 1998
IcsA	AT	-	Isolation d'un état périplasmique partiellement replié	Brandon 2001
HMW1A	TPS	-	Isolation d'un état périplasmique (en présence de HMW1B)	St-Geme 1998
HMW2A	TPS	-	Isolation d'un état périplasmique (en présence de HMW2B)	St-Geme 1998
OtpA	TPS	-	- Sécrétion d'OtpA malgré une production décalée d'OtpB/ - C-ter d'OtpA dans le périplasme avant que le N-ter ne traverse le ME	Choi 2010

*- Figure 56 -*  
Couplage des translocations?

Récapitulatif de différentes données expérimentales qui apportent des éléments de réponse à cette question. « + » et « - » signifient respectivement que pour cette protéine, le couplage est probable ou peu probable.

contrairement à la situation avec le peptide signal long (Szabady *et al.*, 2005). Pour le cas de FHA, la production de la protéine en l'absence momentanée de son transporteur FhaC suggère que FHA ne demeure pas dans le périplasma dans un état compétent pour la translocation, et qu'elle y est probablement dégradée (Guedin *et al.*, 1998). Cette même étude n'a d'ailleurs pas réussi à isoler la protéine depuis le compartiment périplasmique. Ces données vont dans le sens d'un couplage des translocations à travers les deux membranes, indiquant qu'aucun intermédiaire périplasmique ne puisse être isolé.

Cependant, des résultats contradictoires ont également été rapportés. Un intermédiaire périplasmique de l'AT IcsA a été observé par des expériences de « pulse-chase », celui-ci étant même partiellement replié (Brandon & Goldberg, 2001). La protéine OtpA, un TpsA d'*E. coli*, associé au TpsB OtpB, peut être sécrétée même si l'expression du gène *otpB* est décalée dans le temps, signifiant qu'OtpA peut perdurer dans un état compétent pour la sécrétion dans le périplasma (Choi & Bernstein, 2010). Il a de plus été mis en évidence que l'extrémité C-terminale d'OtpA pénètre dans le périplasma avant que son extrémité N-terminale ne traverse la ME, et ce même lorsque le gène *otpB* est induit conjointement à celui d'*otpA* (Choi & Bernstein, 2010). Les TpsA HMW1A et HMW2A sont observables dans le périplasma, signe d'un intermédiaire périplasmique, mais seulement lorsque leur transporteur est également présent, dans le cas contraire, ils sont rapidement dégradés (St Geme & Grass, 1998).

Il y a donc des données qui montrent l'absence, l'existence transitoire ou l'existence stable d'un intermédiaire périplasmique (Fig.56). On peut donc émettre l'hypothèse que le couplage des translocations des deux membranes ne soit pas généralisable à tous les substrats du SST5 et puisse dépendre de la protéine considérée.

### III.3.2.2. Repliement pré-, co- ou post-sécrétionnel ?

L'état d'oxydo-réduction des Cystéines est un rapporteur souvent utilisé pour répondre à la problématique du repliement lors de la sécrétion, puisque ces modifications n'ont lieu que dans le compartiment périplasmique. Les deux Cystéines naturelles d'EspP (espacées par une dizaine de résidus) forment un pont disulfure (Fig.57) (Skillman *et al.*, 2005). Le domaine sécrété de l'intimine, dont la sécrétion est réalisée vraisemblablement par un mécanisme similaire au SST5, possède aussi un pont disulfure (Bodelon *et al.*, 2009). Ces ponts

Protéine	SST5	Ingénierie	Eléments	Repliement	Sécrétion	Timing	Ref
EspP	AT	-	Pont S-S	Partiel	Oui	Pré	Skillman 2005
Intimine	Like	-	Pont S-S	Partiel	Oui	Pré	Bodelon 2009
IcsA	AT	-	Domaine stable de 62 kDa	Partiel	Oui	Pré	Brandon 2001
OtpA	TPS	+ Cys	Pont S-S	Partiel	Oui	Pré	Choi 2010
Pertactine	AT	+ Cys (Ox)	Pont S-S	Partiel	Non	Post	Junker 2009
		/	/	/	/		
		+ Cys (red)	Ø pont	Non	Oui		
Hbp	AT	+ Cys proches	Pont S-S	Partiel	Oui	Pré-Co-Post	Jong 2007
		/	/	/	/		
		+ Cys éloignées	Pont S-S	Partiel	Non		
EspP	AT	Dom $\alpha$ → CtxB	Pont S-S	Oui	Oui	Pré	Skillman 2005
FHA44	TPS	+ CtxB wt	Pont S-S	Oui	Non	Post	Guédin 1998
		/	/	/	/		
		+CtxB-Cys→Sér	Ø pont	Non	Oui		
Hbp	AT	+ Calmoduline	-	Oui	Non	Post	Jong 2007
		/	/	/	/		
		+ Calmo dépliée	-	Non	Oui		
AIDA-I	AT	Dom $\alpha$ → MBP	-	Oui / Ralenti	oui / OUI	Pré-Co	Rutherford 2006
IgA	AT	Dom $\alpha$ → Dom Ig	Pont S-S / Ø pont	Oui / Non	Oui / Oui	Pré	Veiga 2004
HMW1A	TPS	-	Ø HMW1B	Non natif - dégradé	Non	Co-Post	St-Geme 1998
FHA	TPS	-	Interaction TPS-POTRA	Dom TPS replié / Dom TPS non replié	Non / Oui	Post	Hodak 2006
ShIA	TPS	- / Mutant d'activation de ShlaA	ShIB wt / ShIB mutant	Oui / Non	Oui / Oui		Schönherr 1993

- Figure 57 -

### Repliement pré- co- ou post-sécrétionnel?

Récapitulatif de différentes données expérimentales qui apportent des éléments de réponse à cette question. « + » = addition; → = substitution; Ø = absence de; la colonne timing correspond à la conclusion que l'on peut tirer de cette expérience

indiquent un repliement partiel réalisé dans le périplasme. De même, un domaine soluble replié stable de 62 kDa de l'AT IcsA de *S. flexneri*, insensible à la protéinase K, a été observé dans le périplasme (Brandon & Goldberg, 2001).

L'insertion de paires de cystéines dans le domaine passager ou le TpsA est également une technique qui a été couramment utilisée. Des Cystéines insérées dans le TpsA OtpA sont oxydées de manière dépendante de DsbA et ne gênent pas l'export à travers la ME (Choi & Bernstein, 2010). Chez les ATs, des paires de Cystéines insérées dans le domaine passager de la pertactine sont responsables de la formation d'un état « bloqué » de la protéine, ne permettant pas la sécrétion (Junker *et al.*, 2009). En présence d'un agent réducteur (qui réduit les ponts disulfures), la sécrétion est restaurée. Deux différentes insertions d'une paire de Cystéines ont été testées sur l'AT Hbp (Jong *et al.*, 2007). Lorsque les Cystéines sont insérées proches l'une de l'autre au niveau de la séquence primaire, le variant de Hbp est aussi bien sécrété que la protéine sauvage. En revanche lorsque les Cystéines sont insérées loin l'une de l'autre au niveau de la séquence primaire (230 résidus d'écart), mais proches dans l'espace, la sécrétion est très faible, en raison d'un probable blocage de la protéine dans un état incompetent pour la sécrétion.

Plusieurs expériences basées sur des fusions traductionnelles entre différents domaines rapporteurs se repliant dans le périplasme, et des domaines passagers (ou TpsA), et/ou transporteurs ont été menées. La sous-unité B de la toxine cholérique (CtxB) fusionnée au domaine transporteur d'EspP peut être exposée à la surface malgré l'oxydation de ses 2 Cystéines en pont disulfure (Skillman *et al.*, 2005). A l'inverse, lorsque CtxB est fusionnée à un grand morceau N-terminal de FHA, la chimère ne peut être pas être sécrétée, sauf si ses Cystéines sont substituées en Sérine (Guedin *et al.*, 1998). Il y a donc ici deux résultats opposés avec l'utilisation du même rapporteur. Dans le premier cas, le domaine rapporteur est fusionné à un tonneau  $\beta$  d'AT, il est donc « seul » pour traverser le pore. Dans le deuxième cas, le domaine rapporteur est fusionné à un TpsA, il est donc associé à un domaine protéique en plus. Peut-être que cette différence d'encombrement spatial explique cette différence de comportement ?

La fusion de Hbp avec la calmoduline n'est transloquée à travers la ME que si le repliement de cette dernière est aboli (par l'ajout d'EGTA, qui chélate les ions  $\text{Ca}^{2+}$  qui stabilisent la calmoduline) (Jong *et al.*, 2007). La maltose-binding-protein (MBP) fusionnée



au domaine translocateur de l'AT AIDA-I est transloquée, mais l'efficacité de translocation augmente lorsque le repliement de MBP est ralenti (Rutherford *et al.*, 2006). Des chimères composées de différentes associations entre une ou plusieurs chaînes d'immunoglobulines (avec ou sans pont disulfure) et le domaine transporteur de la protéase IgA ont été testées (Veiga *et al.*, 2004). Que le domaine fusionné fasse ou non un pont disulfure, qu'il soit composé d'une ou plusieurs chaînes, ces chimères sont sécrétées. Par ailleurs, dans tous les cas, le domaine exposé *in fine* est correctement replié, comme en témoigne sa capacité à se lier à son ligand. Il est important de noter que dans ce cas, la taille de ce domaine (de l'ordre de 2 nm) est inférieure à celle de la MBP, utilisée dans les expériences précédentes.

En l'absence de son transporteur HMW1B, le TpsA HMW1A, qui ne peut donc pas être sécrété dans ces conditions, est dégradé, traduisant un état conformationnel déplié dans le périplasma (St Geme & Grass, 1998). Le domaine TPS de FHA n'interagit avec le domaine POTRA de FhaC que s'il n'est pas replié (Hodak *et al.*, 2006). L'acquisition de la structure native du domaine TPS semble donc n'intervenir qu'après le contact avec FhaC, probablement à la surface. Ce qui rejoint encore une fois les données dimensionnelles du pore du canal (1 à 2 nm de diamètre contre 4 nm d'envergure pour le domaine TPS replié de FHA).

ShlA est sécrétée et activée par son transporteur ShlB (Hertle *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 2004). Ces deux événements peuvent être découplés dans le cas de certains mutants de ShlB (Schonherr *et al.*, 1993). ShlA est alors sécrétée dans un état inactif et mal replié, ce qui indique que l'état de repliement natif ou non n'est pas une donnée drastique pour la sécrétion.

Ici aussi, des données à priori contradictoires sont publiées. Il y a des données montrant sans équivoque des protéines adoptant un repliement plus ou moins partiel dans le compartiment périplasmique, et d'autres indiquant que ce repliement abolit toute sécrétion (voir tableau récapitulatif, Fig.57). Il semble en définitive que les paramètres primordiaux dans ce processus soient la cinétique de repliement, et la taille du domaine dans cet état replié ou semi-replié. Que ce soit lié à une cinétique ralentie ou à un repliement peu encombrant, le domaine transloqué à travers la ME doit garder un état compétent, *i.e.* une dimension tridimensionnelle suffisamment restreinte, pour pouvoir transiter par le canal formé par le tonneau  $\beta$  du transporteur.



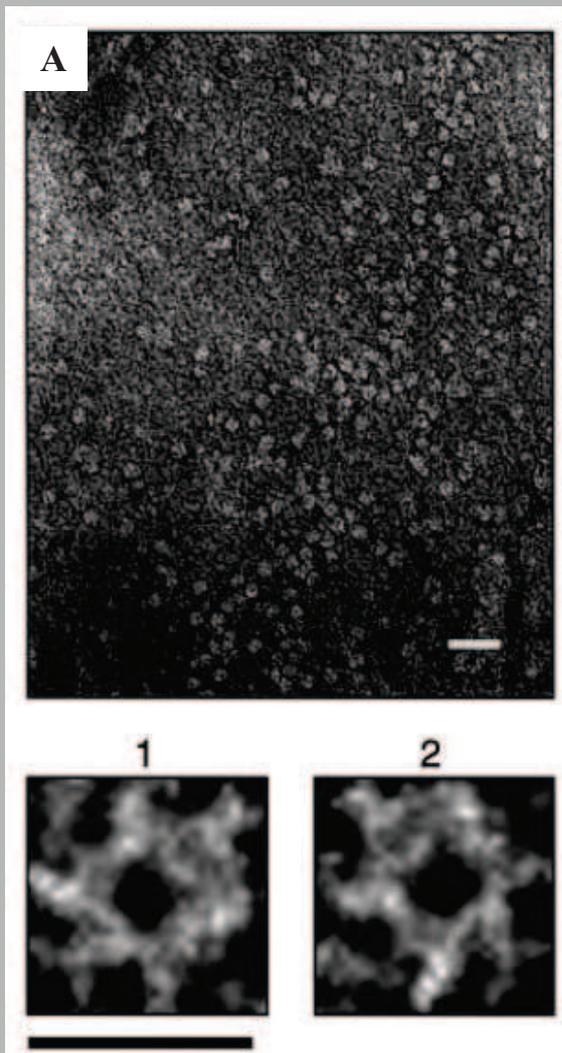
### III.3.3. La Translocation à travers la membrane externe

Le transport à travers la ME constitue l'étape de « sécrétion » dans le mécanisme. Bien que le premier AT décrit remonte à près de 25 ans maintenant, le processus précis par lequel le domaine passager traverse la ME n'est pas encore élucidé. Bien au contraire, il fait largement débat, et trois modèles sont essentiellement proposés afin de concilier les données expérimentales contradictoires collectées. Les études rapportant ces données sont essentiellement conduites sur des ATs, mais globalement, le même type d'interrogation existe pour les TPS. Les modèles qui sont proposés sont très proches de ceux des ATs.

#### III.3.3.1. Le modèle classique

C'est le modèle « canonique », tel qu'il a été initialement proposé par l'équipe du Dr Pohlner (Pohlner *et al.*, 1987). Il a largement été admis et décrit par la suite dans des revues dédiées au SST5 en général, et aux ATs en particulier (Henderson *et al.*, 1998; Henderson *et al.*, 2000; Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004). Il consiste en la vision la plus simple du mécanisme : la protéine est capable d'autosécrétion (Fig.35). Elle porte en elle tous les signaux lui permettant de franchir de manière autonome les deux membranes. Son peptide signal lui permet de franchir la MI, en étant adressée au translocon Sec. Une fois dans le périplasme, le domaine C-terminal va former un tonneau  $\beta$  qui s'insère dans la ME. Ainsi, il constitue un pore au travers duquel le domaine passager de l'AT transite, et se retrouve exposé à la surface de la paroi bactérienne. Il restera alors ainsi exposé à la surface, ou pourra être clivé et libéré dans le milieu extracellulaire. De même, pour les TPS, les deux protéines TpsA et TpsB sont exportées dans le périplasme par la machinerie Sec. Le transporteur TpsB va former un tonneau  $\beta$  qui va permettre, après insertion dans la ME, le passage du TpsA par ce canal (Fig.35) (Henderson *et al.*, 2000; Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004).

Ces deux modèles ne sont pas complètement erronés, mais globalement, ils sont incomplets et sans doute simplistes. Malgré que le SST5 soit vraisemblablement le plus simple des systèmes de sécrétion rencontrés chez les bactéries à Gram négatif, il est probablement beaucoup plus complexe qu'il ne l'a été initialement supposé : (i) il fait intervenir quelques acteurs supplémentaires (chaperonnes, protéines d'insertion dans la ME, protéases auxiliaires) ; (ii) l'enchaînement séquentiel des événements, vraisemblablement

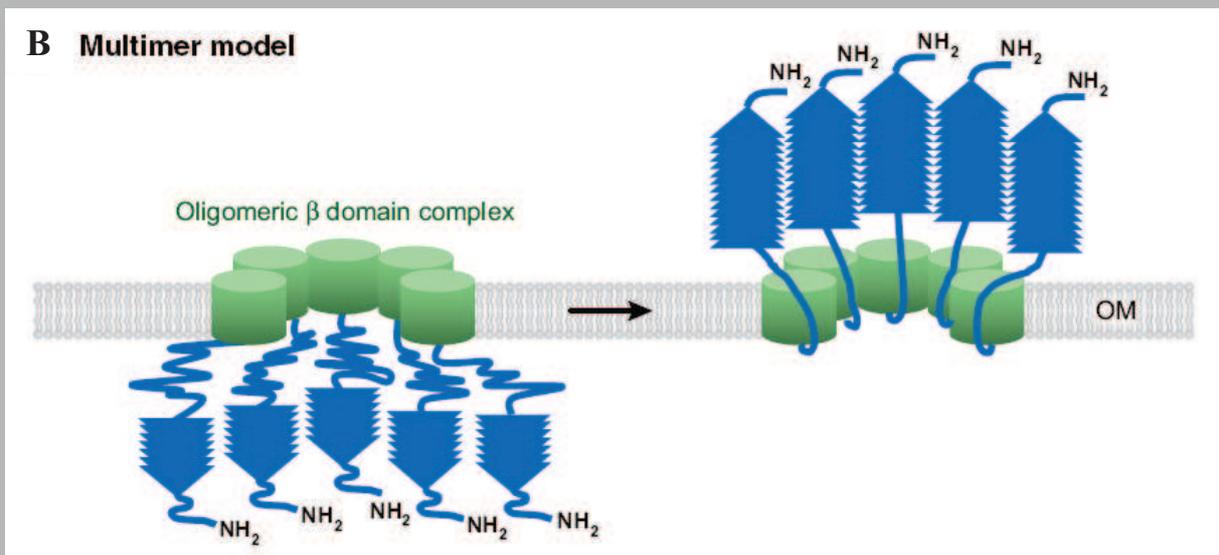


- Figure 58 -  
Modèle oligomérique

(A) Microscopie électronique sur des complexes purifiés composés du domaine C-terminal de la protéase IgA sous forme oligomérique (Veiga *et al.*, 2002). (1) et (2): agrandissement.

Barre blanche: 35nm; barre noire: 10nm

(B) Modèle oligomérique de la translocation de la ME (Dautin & Bernstein, 2007)



primordial, est absent des ces modèles initiaux (quand le repliement intervient-il par rapport à la translocation à travers la ME ? par rapport à l'insertion du domaine  $\beta$  dans la ME ?) ; (iii) l'orientation du transit du domaine passager n'est pas précisée (dans le sens N $\rightarrow$ C-terminal ou inversement ?) ; (iv) l'origine de l'énergie permettant la sécrétion est inconnue (puisque ni ATP, absent du périplasma, ni force proton motrice n'interviennent dans ce processus) ; (v) les dimensions du pore formé par le tonneau  $\beta$  ne permettent pas le passage de domaines repliés, or des protéines avec un repliement au moins partiel ont été observées sécrétées.

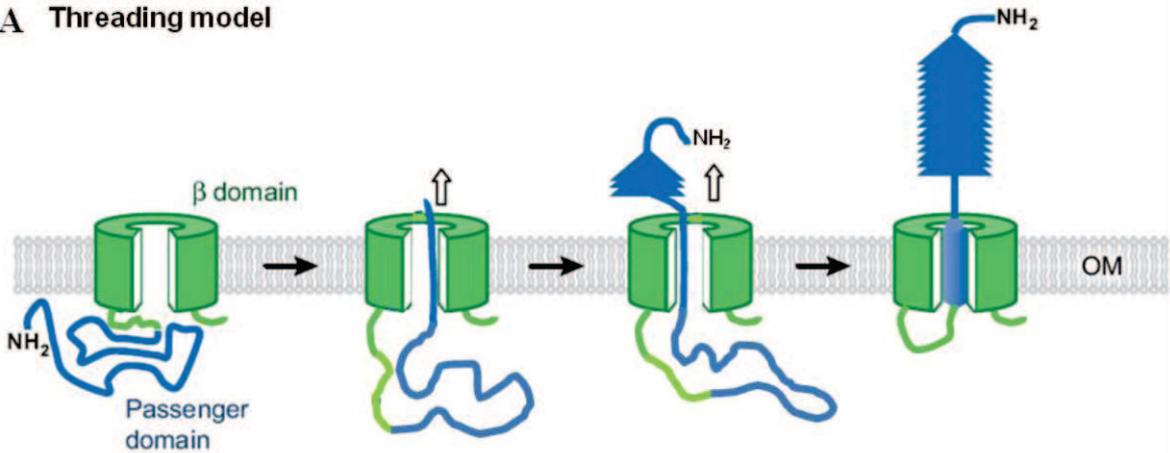
Ce sont tout autant de questions qui n'apparaissent pas ou n'ont pas de réponses sur ce modèle initial. Plusieurs pistes permettant d'y répondre ont déjà été apportées dans les paragraphes précédents, et les modèles suivants ont été proposés pour les intégrer, et essayer d'améliorer ce modèle initial. Malheureusement, puisque des données expérimentales contradictoires sont rapportées, aucun modèle « parfait », répondant à toutes les contraintes observées, n'a à ce jour été proposé. Les modèles suivants sont donc en accord avec certaines observations, et sont infirmés par d'autres.

### III.3.3.2. Le modèle oligomérique

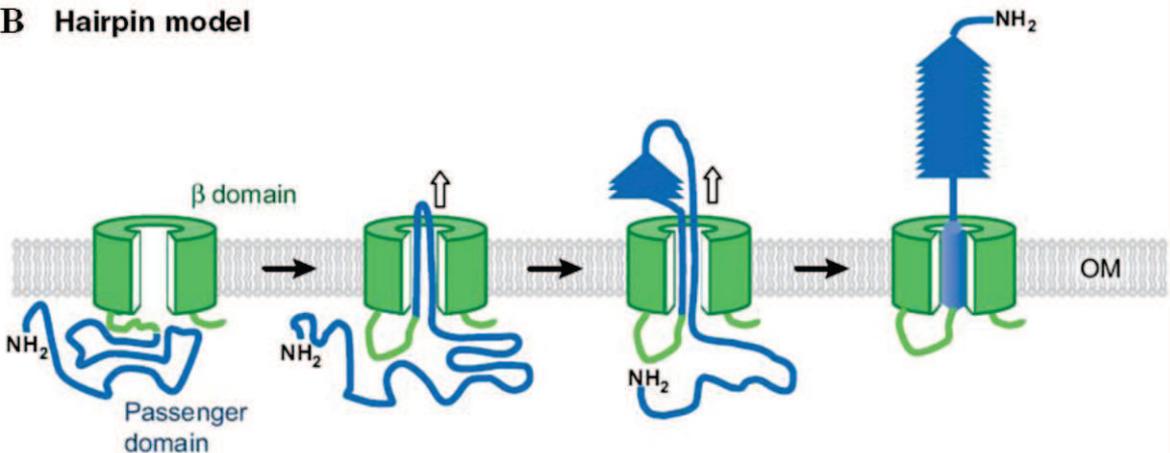
Un modèle alternatif a été proposé, en se basant sur l'observation de la protéase IgA (Veiga *et al.*, 2002). Le domaine C-terminal de cet AT a été purifié sous forme oligomérique, formant une structure en anneau, au centre de laquelle se situe une cavité. Des photos prises en microscopie électronique montrent la formation de ces structures (Fig.58A). Il a donc été proposé que la sécrétion du domaine passager soit réalisée par cette cavité centrale qui mesure environ 2 nm (Fig.58B).

Cependant, plusieurs données suggèrent que ce modèle est vraisemblablement improbable, au moins pour la plupart des protéines, si ce n'est la totalité (y compris pour la protéase IgA). En effet, le domaine  $\beta$  de la protéase IgA est un tonneau  $\beta$  conventionnel de 12 brins, identique à ceux des autres ATs (domaine PFAM03797). Il est donc déjà surprenant de voir une multimérisation de ces domaines pour cette protéine et pas pour les autres ATs. Mais surtout, les études biochimiques montrent que ce domaine sous forme monomérique, se replie en un tonneau  $\beta$  classique. De ce fait, sa surface externe est hydrophobe. Ceci conduit vraisemblablement à la multimérisation par interactions hydrophobes, mais surtout, cela

### A Threading model



### B Hairpin model



- Figure 59 -  
Modèle Hairpin

(A) Dans le modèle « Threading » le domaine passager traverse le tonneau en y insérant son extrémité N-terminale.

(B) Dans le modèle « Hairpin », le domaine passager transite à travers le tonneau en insérant son extrémité C-terminale en premier lieu, qui sera donc exposée à la surface avant l'extrémité N-terminale.

(Adapté de Dautin & Bernstein, 2007)

implique que la cavité centrale soit également de nature hydrophobe. Dans un tel contexte, il paraît difficile de concevoir le transport de protéines solubles.

Enfin, la structure récemment résolue de l'AT EstA de *P. aeruginosa* constitue un exemple sans équivoque pour lequel la sécrétion du domaine passager ne peut se passer selon le modèle oligomérique (Fig.37B) (van den Berg, 2010). En effet, EstA est un AT qui ne subit pas de clivage en fin de processus, le domaine passager reste donc attaché au domaine transporteur. La cristallisation de la protéine dans son entièreté montre que le domaine passager exposé est relié au transporteur par une hélice  $\alpha$  qui est insérée à l'intérieur du tonneau  $\beta$ . Si la sécrétion se passait selon le modèle oligomérique, le domaine exposé serait relié à son transporteur par l'extérieur de celui-ci. Il est donc clair qu'au moins pour EstA, ce modèle ne peut convenir.

Dans la mesure où l'ensemble des données biochimiques et structurales indiquent que la plupart des domaines  $\beta$  des ATs forme des monomères, ce modèle a une faible probabilité d'être fidèle à la réalité (Barnard *et al.*, 2007; Oomen *et al.*, 2004).

### III.3.3.3. Les modèles « threading » et « hairpin »

Le transit linéaire du polypeptide à travers le tonneau est l'hypothèse la plus simple. Seulement, il peut être orienté de deux façons opposées. Soit le domaine passager traverse le pore dans le sens N→C-terminal, on parle alors de modèle « threading » (Fig. 59A), soit dans le sens C→N-terminal, dans ce cas, il s'agit du modèle « hairpin » (Fig. 59B).

Le passage du domaine N-terminal en premier semble peu probable. Des domaines passagers tronqués de leur extrémité N-terminale, ou fusionnés à d'autres domaines protéiques, peuvent être sécrétés. Ceci implique que cette extrémité N-terminale ne contienne pas les signaux permettant l'adressage au pore (Klauser *et al.*, 1990; Maurer *et al.*, 1999; Skillman *et al.*, 2005; Szabady *et al.*, 2005).

Il est beaucoup plus probable que l'orientation soit du domaine C→N-terminal. Pour cela, il faudrait alors que la région qui lie le domaine transporteur et le passager forme une épingle à cheveux (« hairpin ») qui permettrait alors la translocation du domaine passager par son côté C-terminal. Cette hypothèse est supportée par plusieurs données expérimentales. Un domaine passager chimérique CtxB-IgA, bloqué dans sa translocation à travers la ME dans un état intermédiaire, ne se retrouve exposé à la surface qu'au niveau de son extrémité C-



terminale (Klauser *et al.*, 1992). En jouant sur différentes insertions de paires de Cystéines dans le domaine passager de la pertactine, et à l'aide d'analyse par spectrométrie de masse, il a été observé que l'extrémité C-terminale de ce domaine est exportée à la surface avant l'extrémité N-terminale (Junker *et al.*, 2009). Ces résultats sont confortés par l'observation qu'EspP interagit avec des protéines chaperonnes périplasmiques comme SurA et Skp (Ieva & Bernstein, 2009; Sauri *et al.*, 2009). Ces chaperonnes permettent la protection de l'extrémité N-terminale du domaine passager contre l'action de la protéinase K. Il a de plus été montré que le C-terminus de ce domaine est inséré dans le tonneau  $\beta$  avant que la translocation ne soit terminée, ce qui indique encore la même direction C $\rightarrow$ N-terminal.

Le principal argument contre ce modèle vient de sa présumée incapacité à transloquer des domaines plus ou moins repliés. Les dimensions du pore de NalP (10 x 12,5 Å) ne permettent le passage que de deux chaînes polypeptidiques complètement dépliées (Oomen *et al.*, 2004). Une étude basée sur des simulations dynamiques indique que NalP n'est pas assez large pour laisser passer un segment protéique contenant un élément de structure tertiaire (Khalid & Sansom, 2006). Il faut aussi garder à l'esprit que les tonneaux  $\beta$  sont des structures rigides, solidement stabilisées par de nombreuses liaisons hydrogènes entre les brins du tonneau. Leur flexibilité est donc très limitée. Il est alors difficile d'imaginer dans ces conditions la sécrétion des protéines pour lesquelles il a été montré qu'elles étaient plus ou moins repliées dans le périplasma, comme IcsA par exemple (Brandon & Goldberg, 2001). Une hypothèse pourrait néanmoins s'accommoder de ce problème. Elle fait intervenir un protagoniste supplémentaire : la protéine BamA.

#### III.3.3.4. Le modèle BamA

La découverte de l'interaction entre ATs et protéines annexes (nécessaires à une bonne sécrétion) a conduit à se poser la question d'un recours à l'une de ces protéines accessoires pour assurer la translocation du domaine passager (Oomen *et al.*, 2004; Skillman *et al.*, 2005). Il paraît légitime de penser à la protéine BamA pour assurer un tel rôle. Plusieurs éléments tendent à créditer cette hypothèse. Plusieurs études indiquent que BamA est nécessaire à la sécrétion des ATs (Bernstein, 2007; Bodelon *et al.*, 2009; Bos *et al.*, 2007a; Jain & Goldberg, 2007; Sauri *et al.*, 2009). Des tests réalisés sur des liposomes suggèrent que la taille du canal



de BamA est de 2,5 nm, ce qui permettrait de laisser passer des domaines au moins partiellement repliés (Robert *et al.*, 2006).

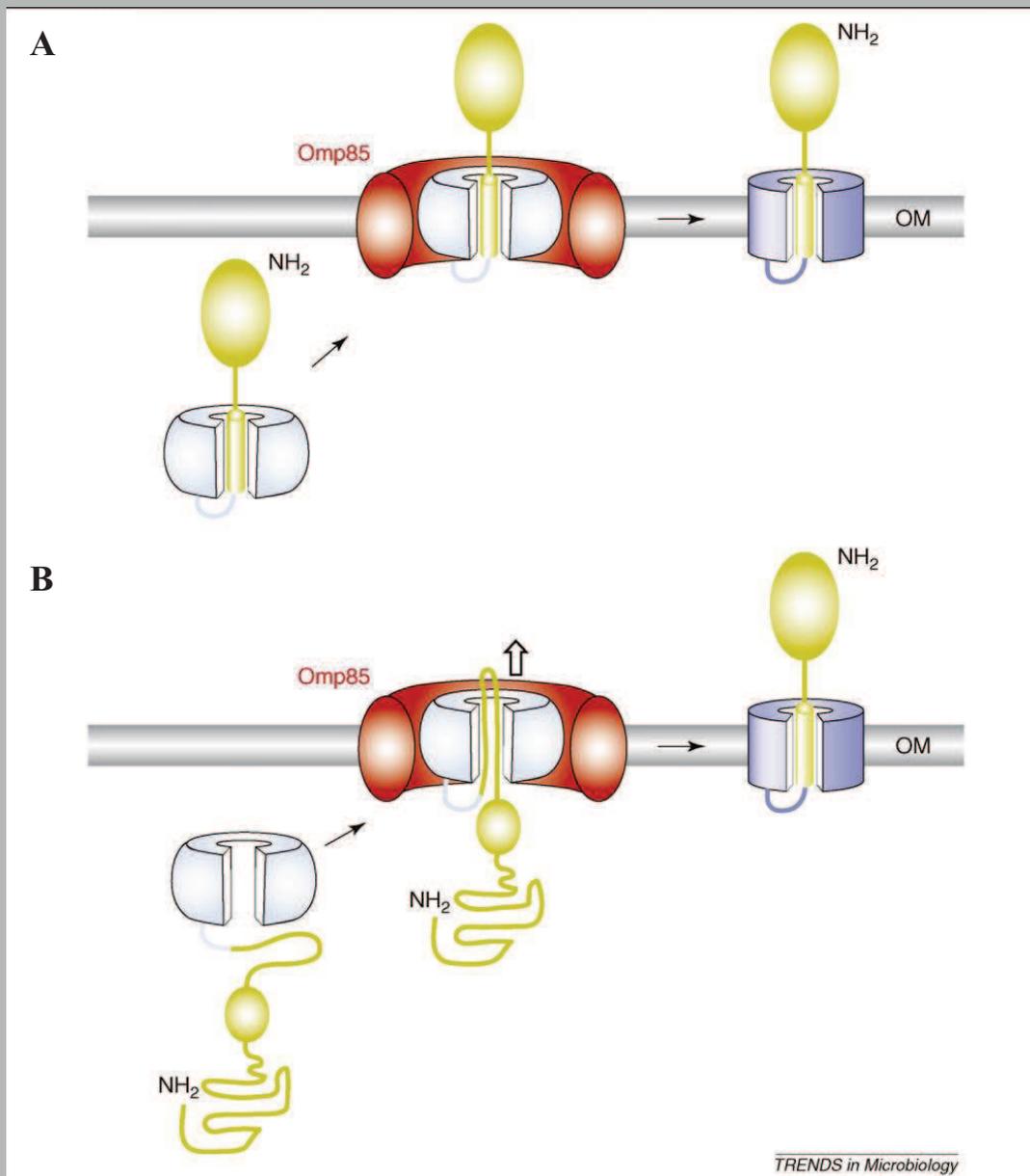
Un autre élément fort qui soutient cette hypothèse est bien évidemment l'homologie entre BamA et les TpsB (Yen *et al.*, 2002). Ces deux catégories de protéines sont des tonneaux  $\beta$  de 16 brins, insérés dans la ME, possédant une (voire plusieurs) extension(s) périplasmique(s), le domaine POTRA. Puisque les TpsB sont supposés transloquer à travers la ME leur TpsA correspondant, il apparaît cohérent d'envisager un rôle similaire pour BamA à l'égard des domaines passagers.

La découverte récente que BamA est capable d'interagir avec les domaines  $\beta$  et passagers d'EspP (Ieva & Bernstein, 2009) ou avec Hbp (Sauri *et al.*, 2009) est une indication qui laisse envisager qu'elle joue un rôle supplémentaire au seul rôle d'insertion. Il est intéressant de noter que l'interaction avec le domaine passager n'est observée que lorsqu'il est toujours lié à son domaine  $\beta$ . Elle est de plus très transitoire : seul un état bloqué dans le processus de translocation permet son observation, et elle n'intervient que dans les temps précoces du mécanisme. Ces données suggèrent que la translocation soit un évènement très rapide, et que la protéine BamA joue un rôle direct dans la translocation du domaine passager.

Il a également été montré que lorsque la pro-protéine Hbp est bloquée pendant la translocation de son domaine passager, son domaine  $\beta$  est mal inséré et mal replié (Sauri *et al.*, 2009). Lorsque la translocation est bloquée, il y a donc un blocage également dans l'insertion. Si l'on considère que la translocation est assurée par BamA, on a alors un couplage entre l'activité insertase et l'activité translocase. Un tel couplage ne serait pas un mécanisme inédit, si l'on regarde l'activité du translocon Sec (Mitra *et al.*, 2006).

Il existe alors trois scénarii faisant intervenir la protéine BamA :

(i) le domaine passager transite par le pore formé par BamA et non par le pore formé par son propre AT (Hodak *et al.*, 2006; Oomen *et al.*, 2004; Skillman *et al.*, 2005). Cette idée suggère que le tonneau  $\beta$  ne servirait finalement pas de canal translocateur pour le domaine passager. Il ne serait qu'un simple signal d'adressage au complexe Bam (dont BamA est le principal protagoniste). Cependant, il est difficile d'expliquer comment le domaine passager serait relargué de ce canal. La raison pour laquelle EstA ne peut être sécrétée selon le modèle oligomérique exclut également la possibilité que son domaine passager soit transloqué par un transporteur annexe : étant reliée à son propre domaine  $\beta$  par une hélice  $\alpha$  logée dans le centre



- Figure 60 -  
Modèle BamA

(A) Dans ce modèle, le domaine C-terminal de l'AT forme dans le périplasma un proto-barrel, structure de type tonneau mais pas complètement replié, et le domaine passager commence sa translocation à travers ce proto-barrel. BamA prend ensuite en charge l'AT et l'insère dans la ME, et la translocation se termine, permettant ainsi à des domaines partiellement repliés d'être sécrétés. (B) Ici, la différence vient du fait que BamA prend en charge l'insertion du tonneau  $\beta$  dans la ME, et le maintiendrait dans une conformation ouverte qui permet alors la translocation du domaine passager partiellement replié.

(Bernstein, 2007)

du tonneau, elle ne peut être transloquée par aucun autre canal, qu'il soit le fruit de l'oligomérisation de plusieurs tonneaux, ou qu'il s'agisse du conduit formé par BamA (van den Berg, 2010). Cette hélice  $\alpha$  est par ailleurs retrouvée dans les structures résolues de NalP, EspP, et les TAAs Hia et YadA, ce qui tend à montrer que ces protéines aussi pourraient assurer la translocation de leur propre passager, bien qu'on puisse aussi émettre l'hypothèse que ces hélices ne prennent cette place qu'après le clivage (Barnard *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2006; Oomen *et al.*, 2004; Wollmann *et al.*, 2006). Certains modèles suggèrent aussi que BamA s'ouvre latéralement pour libérer le domaine passager (Stegmeier & Andersen, 2006), or cela serait extrêmement coûteux sur le plan énergétique, ce qui rend cette hypothèse peu plausible.

(ii-a) un fragment du domaine passager serait inséré dans une structure précoce de type tonneau  $\beta$ , partiellement replié, un « proto-barrel ». BamA reconnaîtrait ce proto-barrel et l'insérerait dans la ME, où la translocation du passager s'achèverait (Fig.60A) (Bernstein, 2007).

(ii-b) le tonneau  $\beta$  est reconnu et inséré dans la ME par BamA, qui ensuite, maintiendrait le tonneau de l'AT dans une conformation ouverte, ce qui permettrait alors la translocation de domaines partiellement repliés (Fig.60B) (Meng *et al.*, 2006).

La différence entre ces deux dernières hypothèses dépend donc de l'étape à laquelle le domaine passager commence à être transloqué. Dans l'hypothèse (ii-a), c'est dans le périplasma, alors que dans le modèle (ii-b), c'est dans la ME. En revanche, ces deux variantes ont plusieurs points communs et s'accommodent de quelques points expérimentaux. Dans les deux cas, le tonneau  $\beta$  servirait à la fois de signal d'adressage au complexe Bam, mais aussi de canal de translocation. De plus, ces deux modèles très proches permettent de rendre compte de la présence d'une hélice  $\alpha$  dans les tonneaux  $\beta$  de NalP, EspP, et Hia, puisque le pore translocateur est bel et bien le tonneau de l'AT. Surtout, ces deux modèles permettent d'expliquer comment un domaine passager partiellement replié peut traverser un pore trop étroit. Par ailleurs, ces deux hypothèses sont compatibles avec le modèle « hairpin », puisqu'il est possible que l'extrémité C-terminale des domaines passagers transite en premier dans le tonneau de l'AT, ce qui concilierait les données expérimentales exposées dans le paragraphe précédent.

La discrimination entre ces deux modèles fait débat, mais elles représentent à mon sens le modèle de translocation à travers la ME le plus élégant et le plus probable.



### III.3.3.5. Chez les TPS

Le modèle est moins controversé pour cette classe de SST5. Il est admis que le TpsB soit le canal par lequel le TpsA est sécrété (Buscher *et al.*, 2006). ShlB, FhaC et HMW1B sont capables de former des canaux perméables aux sucres ou aux ions (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1999; Konninger *et al.*, 1999; Surana *et al.*, 2006). Il a été montré que le domaine POTRA de FhaC permettait le recrutement de FHA, par le biais de son domaine TPS, lorsque celui-ci n'est pas replié (Hodak *et al.*, 2006).

Ici aussi, le modèle « threading » et le modèle « hairpin » ont été proposés. Dans ce dernier, la région juste adjacente au domaine TPS forme la boucle et est exportée à la surface bactérienne, et initie son repliement. Pour le modèle « threading », le domaine TPS est transporté à la surface en premier, est replié, et le reste de la protéine est transloquée. Peu de données sont disponibles sur ce point, permettant de faire un choix entre ces deux hypothèses.

La théorie du « hairpin » pourrait bien correspondre au cas de la protéine FHA. Il a été montré par des expériences d'insertion de différentes étiquettes sur les domaines N- et C-terminaux de FHA que le domaine C-terminal est exposé (Mazar & Cotter, 2006). Après interaction entre le domaine TPS et le domaine POTRA, la région juste adjacente au domaine TPS forme une boucle, et est exposée à la surface, extirpant le reste de la protéine vers l'extérieur, afin de terminer son repliement (voir plus bas) (Mazar & Cotter, 2007). Cependant, il est difficile à concilier avec la sécrétion de domaines tronqués très courts de ShlA et FHA (Clantin *et al.*, 2004; Schonherr *et al.*, 1993).

A contrario, le modèle « threading » permettrait d'expliquer cette situation. Le domaine C-terminal du domaine TPS semble ancré au TpsB dans le périplasme (Hodak *et al.*, 2006), cela laisserait la possibilité à un petit peptide de ce domaine de passer dans le canal et de se replier une fois à la surface. De plus, le domaine TPS est clivé au cours de la sécrétion du TpsA HMW1A (Grass & St Geme, 2000). Enfin, l'ajout d'étiquettes hémagglutinine sur le domaine N- ou C-terminal de HMW1A indique clairement que seul le domaine N-terminal est exposé à la surface bactérienne (Buscher *et al.*, 2006).

Il semble donc que le « choix » threading vs hairpin soit dirigé par l'extrémité exposée à la surface : threading pour une exposition de l'extrémité N-terminale, hairpin pour l'extrémité C-terminale exposée. Dans les deux cas, les données indiquent que la polarité de translocation des TPS est vraisemblablement opposée à celle des ATs, allant de l'extrémité N→C-terminale.



### III.3.3.6. Sécrétion vectorielle

Une autre grande question dans ces modèles est celle posée par l'origine de l'énergie permettant la sécrétion. Le périplasma est dépourvu d'ATP. La force proton-motrice (ou autre gradient électro-chimique) semble difficile à maintenir à travers la ME, notamment à cause de la présence de plusieurs porines qui permettent la diffusion libre de petites molécules. L'hypothèse la plus probable est donc celle d'une sécrétion vectorielle. La plupart des substrats du SST5 sont majoritairement composés de structure de type hélice  $\beta$ . Cette donnée commune joue certainement un rôle dans le processus de sécrétion, et en particulier dans l'approvisionnement en énergie de ce processus (Junker *et al.*, 2006). La taille d'une hélice  $\beta$  étant trop grande pour être transloquée totalement repliée à travers les tonneaux  $\beta$ , il est admis qu'elle doit adopter sa conformation définitive en surface. Le repliement d'un petit domaine en hélice  $\beta$  à la surface fournirait l'énergie nécessaire pour aspirer vers le compartiment extracellulaire le reste de la chaîne polypeptidique dépliée. Cette hypothèse est supportée par l'observation, lors d'expériences de dénaturation, d'un domaine stable d'environ 20 kDa, retrouvé proche de l'extrémité C-terminale du domaine passager de la pertactine (Junker *et al.*, 2006). Selon le modèle « hairpin », ce domaine serait exposé en premier à la surface. Il y subirait un repliement qui servirait alors de modèle pour le reste de la protéine.

Une donnée intéressante est apportée par la structure d'EstA (van den Berg, 2010). Malgré l'absence de structure de type hélice  $\beta$ , cette protéine supporte malgré tout l'hypothèse d'une sécrétion vectorielle. En effet, la carte des contacts de la protéine et l'inspection visuelle du domaine passager démontrent que ce domaine établit de nombreuses interactions, ce qui pourrait permettre un repliement selon cette théorie.

Mais ici aussi, certaines données semblent contredire cette hypothèse. Les protéines qui acquièrent une partie de leur repliement dans le périplasma sont difficilement intégrables dans ce modèle. Des trimères de Hia ou YadA, composés de seulement un ou deux domaines passagers (à la suite de coproduction de forme sauvages et tronquées de la protéine) permettent la sécrétion de ce ou ces domaines passagers, malgré qu'ils ne soient pas repliés (Cotter *et al.*, 2006). La délétion d'une région de 90 résidus dans la protéine BrkA de *B. pertussis*, à la jonction entre les domaines  $\alpha$  et  $\beta$ , homologue à celle comprenant le domaine stable de 20 kDa de la pertactine, empêche le repliement de BrkA, sans pour autant altérer sa sécrétion (Oliver *et al.*, 2003).

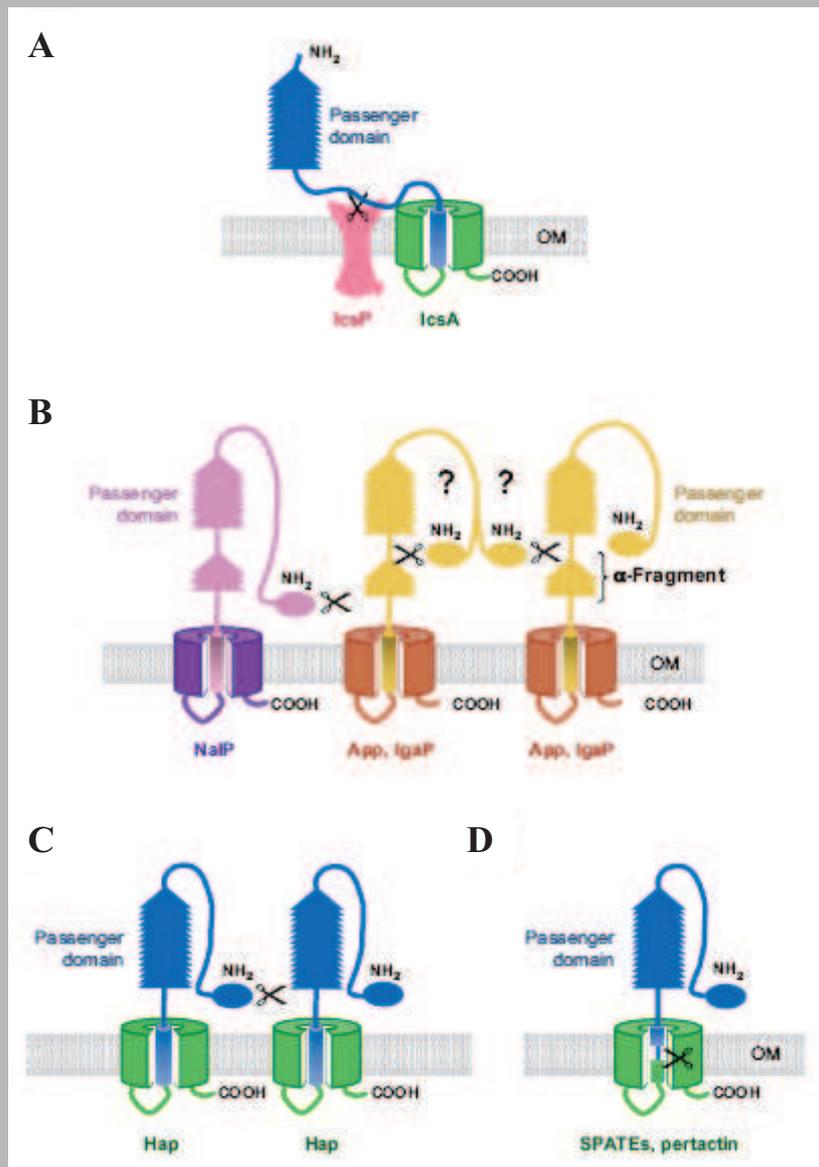


### III.3.3.7. Conclusions

Quel que soit le processus employé par les ATs pour assurer la sécrétion de leur domaine passager, il semble au moins évident que certaines visions du modèle classique sont erronées. La plus importante d'entre elle est le découplage initialement supposé entre le repliement du tonneau  $\beta$ , précédant son insertion dans la ME, précédant le transit du passager sous forme totalement dépliée. Il semble clair que certains ATs peuvent se replier partiellement dans le périplasma, avant la translocation. Le transit du passager à travers le transporteur est un événement qui intervient vraisemblablement selon une orientation précise, de l'extrémité C→N-terminale, et probablement, avant que le repliement du tonneau soit total et que son insertion dans la ME soit achevée. Ceci est supporté par la sécrétion de certains domaines portant des ponts disulfures, ou par le fait que si la translocation est bloquée, l'insertion est elle aussi bloquée (Sauri *et al.*, 2009). Cependant, la structure du passager ne doit vraisemblablement pas être trop volumineuse pour permettre une bonne sécrétion. De même, certains ponts disulfures non physiologiques, artificiellement rajoutés, bloquent sans doute la protéine dans un état trop rigide ou encombrant pour le passage à travers le pore du transporteur.

L'autre vision erronée importante associée au modèle initial est l'autosécrétion. Il est aujourd'hui clair que des chaperonnes périplasmiques (SurA, Skp), et des protéines accessoires du complexe Bam (BamA, BamB) sont nécessaires à la sécrétion (Ieva & Bernstein, 2009; Sauri *et al.*, 2009).

Enfin, la discrimination entre le modèle « hairpin » et le modèle BamA est à l'heure actuelle difficile à réaliser. Une situation hybride serait peut-être un modèle intéressant. Les domaines passagers traversent leur propre transporteur selon le modèle « hairpin », avec une orientation C→N-terminal. Lorsque les domaines subissent un repliement partiel, ils pourraient néanmoins être transloqués grâce à la protéine BamA qui maintiendrait brièvement le tonneau  $\beta$  de l'AT dans un état stable et ouvert, tout en l'insérant dans la ME.



- Figure 61 -  
Maturation des ATs

(A) La maturation d'IcsA fait intervenir une protéase de ME, IcsP (en rose).

(B) Certains ATs sont clivés par des protéases qui sont elles-mêmes des ATs. Ainsi NalP agit sur App, AusI, MspA ou la protéase Iga. Ces protéines sont ensuite reclinées par un mécanisme d'autoprotéolyse.

(C) Hap assure la maturation des autres protéines Hap, de manière intermoléculaire.

(D) Les protéases de la famille des SPATE subissent une maturation qui intervient à l'intérieur du tonneau, indépendante de l'activité protéase intrinsèque de la protéine.

(D'après Dautin & Bernstein, 2007)

### III.3.4. Maturation

#### III.3.4.1. Clivage du domaine passager des ATs

Bien que certains domaines passagers restent ancrés à leur domaine  $\beta$  (comme EstA par exemple ou les TAAs), il existe plusieurs cas pour lesquels un clivage protéolytique intervient pour libérer le domaine exporté à la surface de la bactérie. Plusieurs processus ont été décrits, faisant intervenir des clivages autoprotéolytiques ou des protéases annexes. Voici quelques exemples des divers modes de relargage.

Le clivage peut tout simplement faire intervenir une protéase de ME auxiliaire. C'est le cas par exemple pour IcsA de *S. flexneri*, qui est clivée par IcsP, une protéase dédiée à cette activité (Fig.61A) (Egile *et al.*, 1997; Shere *et al.*, 1997). Le recours à des protéases annexes peut aussi avoir l'originalité de faire appel à une protéase qui est elle-même un AT. La maturation de plusieurs ATs de *N. meningitidis*, dont App, AusI, MspA, ou la protéase IgA, fait appel à l'AT NalP (Fig.61B) (Turner *et al.*, 2006; van Ulsen *et al.*, 2003; van Ulsen *et al.*, 2006). NalP est par ailleurs clivé soit du fait de sa propre activité, soit par une protéase inconnue (van Ulsen *et al.*, 2003). Cette situation n'est pas sans rappeler celle de App ou de la protéase IgA, qui en plus de subir une protéolyse dépendante de NalP, sont également clivées de manière autoprotéolytique, après l'intervention de NalP, libérant ainsi un petit fragment  $\alpha$  C-terminal (Fig.61B). Il est cependant difficile de savoir si le clivage se fait de manière inter- ou intramoléculaire. La situation est plus claire en revanche pour la protéine Hap de *H. influenzae*, qui subit un clivage intermoléculaire, permis grâce à son activité de protéase à Sérine (Fig.61C) (Coutte *et al.*, 2003; Fink *et al.*, 2001; Hendrixson *et al.*, 1997). Dans toutes ces situations, la maturation intervient sur le domaine exposé à la surface.

Mais il existe des cas différents. Les SPATE sont relarguées dans le milieu extracellulaire selon un processus original. Elles subissent bien un clivage autoprotéolytique, cependant, il n'est pas le fruit de l'activité endogène de la protéine, puisque des exemples de sécrétion de SPATE dont l'activité a été abolie ont été rapportés (Brunder *et al.*, 1997; Szabady *et al.*, 2005). Il a été démontré pour EspP que la protéolyse intervient en fait à l'intérieur du tonneau (Fig.61D et Fig.40A), et fait intervenir une attaque nucléophile d'une Asparagine conservée sur la chaîne polypeptidique en transit (Dautin *et al.*, 2007). Ce



mécanisme semble également être celui employé par la pertactine et BrkA de *B. pertussis* (Dautin & Bernstein, 2007).

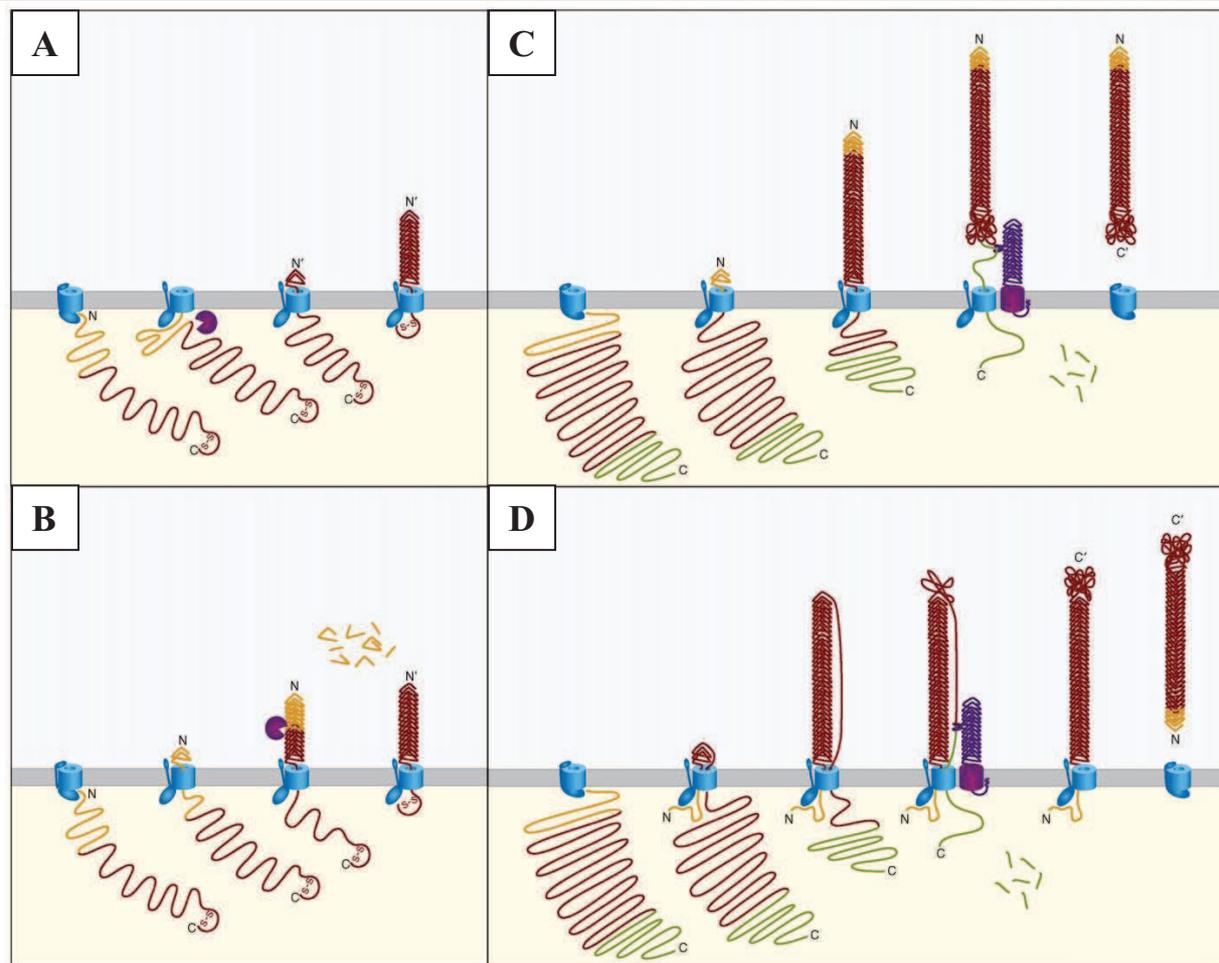
De manière intéressante, l'hypothèse d'une maturation autocatalytique a été proposée pour une protéine qui ne possède pas de motifs protéases apparents, l'adhésine AIDA-I (Suhr *et al.*, 1996). Cette proposition se base sur le fait que cette protéine est correctement clivée même si elle est produite dans un hôte hétérologue.

Cette maturation a un sens pour les domaines passagers dont la cible est intracellulaire. Dans de tels cas, la protéine doit atteindre la cellule hôte pour avoir sa fonction. C'est le cas de VacA par exemple, ou des protéases de type SPATE. Mais certaines protéolyses semblent plutôt curieuses. Certaines adhésines sont clivées, c'est le cas de Hap ou App par exemple. Quel peut être le rôle d'une adhésine si celle-ci n'est pas liée à la bactérie ? On peut imaginer que ces protéines titrent les anticorps avoisinants, dans le but de diminuer la réponse immunitaire de l'hôte. Ou bien que ce soit dans le but de diminuer l'interaction avec la cellule-hôte lors d'une période de dissémination, plutôt que d'adhérence. Toutefois, chez *Listeria monocytogenes* une des deux internalines (InlB) est sécrétée, et est impliquée dans l'adhérence préalable à l'internalisation de *L. monocytogenes* (Seveau *et al.*, 2007).

Autre curiosité : les adhésines clivées, mais qui restent associées à la surface de la bactérie de manière non covalente, comme la pertactine, ou AIDA-I (Benz & Schmidt, 1992; Charles *et al.*, 1994).

#### III.3.4.2. Clivage du TpsA

Les TpsA subissent pour la plupart deux clivages. Le premier fait intervenir la « leader peptidase » classique, qui enlève le peptide signal de la pré-pro-protéine. Le second permet de maturer la pro-protéine en protéine mature, en excisant le pro-domaine. Ce pro-domaine chez HMW1A est situé en N-terminal (résidus 69 à 441). La protéase impliquée dans son excision n'est pas connue. Bien que certaines données indiquent que le clivage pourrait intervenir dans le périplasme (Fig.62A) (Grass & St Geme, 2000), d'autres laissent supposer le contraire. Si l'on considère la difficulté pour le néo HMW1A mature de reconnaître HMW1B sans son domaine TPS (éliminé lors de l'excision du pro-domaine), et le fait que le pro-HMW1A n'est pas clivé lorsqu'il s'accumule dans le périplasme en l'absence de



TRENDS in Microbiology

- Figure 62 -

### Modèles de la maturation chez les TPS

(A) et (B) Maturation de HMW1A. Le prodomaine est en N-terminal (en orange, avec le peptide signal). (A) Le clivage intervient dans le périplasm. (B) Le clivage a lieu à la surface de la bactérie. (C) et (D) Maturation de FhaB. Le prodomaine est en C-terminal (en vert), le peptide signal est en orange. (C) Le transit interviendrait selon le modèle threading, et la clivage serait effectué par SphB1, lorsque le site de clivage serait exposé à la surface, l'extrémité N-terminale étant alors exposée vers l'extérieur. (D) Le passage de FhaB se ferait selon le modèle hairpin, et le clivage interviendrait lorsque le site de clivage serait exposé à la surface. Dans ce cas, c'est l'extrémité C-terminale qui serait exposée à la surface. Ce modèle répond à certaines observations relatant cette orientation.

(D'après Mazar & Cotter, 2007)

HMW1B (Buscher *et al.*, 2006), un clivage intervenant à la surface est une hypothèse plus probable (Fig.62B).

Dans le cas de FhaB, le pro-domaine est localisé en C-terminal. La pro-protéine FhaB est maturée par la lipoprotéine SphB1 (Coutte *et al.*, 2001). Il a cependant été montré que cette protéase n'est pas la seule protéase responsable de la maturation de FhaB puisque son rôle semble être mineur dans certaines souches ou certains contextes génétiques (Mazar & Cotter, 2007). Une maturation qui aurait lieu dans un modèle de sécrétion threading conduirait à la situation représentée en Figure 62C. Cependant, des expériences d'immunodétection d'épitopes introduits en N- ou C-terminal ayant révélé que le modèle hairpin est le plus probable pour la sécrétion de FhaB, la maturation interviendrait selon la processus représenté en Figure 62D : FhaB serait sécrétée (dans le sens N→C-terminal) jusqu'à démasquer le site de clivage du pro-domaine, qui serait alors clivé par SphB1 ou une autre protéase.

### **III.4. Chez *Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* est l'organisme sur lequel j'ai effectué mes recherches de thèse. Etudier cette bactérie sur le plan de la pathogénie et de la sécrétion est extrêmement intéressant, car elle possède la quasi-totalité des systèmes de sécrétion connus à ce jour chez les bactéries à Gram négatif. Seul le SST4 semble absent de l'arsenal sécrétoire de *P. aeruginosa*. De plus, il faut souligner que ces systèmes sont pour la plupart du temps présents en plusieurs copies, ce qui permet de sécréter de nombreuses exoprotéines, toxines, adhésines, et autres enzymes dégradatives dans différentes conditions environnementales (voir Résultats, chap III). Il est en revanche assez inattendu de rencontrer si peu de substrats qui transitent par un SST5 dans un tel organisme ! A l'heure actuelle, quatre d'entre eux ont été caractérisés, dont deux présentent un bel intérêt dans l'étude de ce système, puisqu'ils constituent des exemples remarquables et originaux, par rapport à l'ensemble des autres substrats de SST5 préalablement décrits. L'un est un AT, la protéine EstA, les trois autres sont des TPS, dont un est un système hybride de TPS, le couple CupB3-CupB5.



### III.4.1. Les ATs

Les analyses *in silico* menées à la suite du séquençage du génome de la souche PAO1 ont identifié trois ATs putatifs, PA0328, PA3535, PA5112 (Filloux *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2003). Parmi ces trois, seul PA5112 a été décrite expérimentalement.

#### III.4.1.1. PA0328

Très peu de choses sont connues sur cette protéine hypothétique. Son domaine N-terminal possède des similarités avec les aminopeptidases (PFAM04389), et son domaine C-terminal (PFAM03797) est lui proche de celui d'EstA. Elle a la particularité d'être particulièrement courte pour un AT, puisqu'elle n'est composée que de 647 résidus acides aminés (Filloux *et al.*, 2004).

#### III.4.1.2. PA3535

Son domaine passager possédant des similarités avec les protéases à Sérine de la famille de la subtilisine (PFAM00082), cet AT a été nommé SprS (Hardie *et al.*, 2009). Cependant son activité n'a pas encore été démontrée. Cette protéine est présente dans l'ensemble des souches de *Pseudomonas* séquencées à ce jour. Cette protéine pourrait avoir un rôle dans la pathogénicité, puisque un mutant de *sprS* possède un secrétome modifié par rapport à la souche sauvage (Hardie *et al.*, 2009).

#### III.4.1.3. EstA

PA5112 est le seul AT expérimentalement décrit. Sa fonction d'estérase (PFAM00657) lui a attribué son nom d'EstA. Cette protéine est une hydrolase de la famille GDSL, et elle est un exemple d'AT qui ne subit pas de clivage protéolytique, et de fait, reste ancrée à la ME (Becker *et al.*, 2005; Wilhelm *et al.*, 1999). Elle possède vraisemblablement un rôle dans la virulence de *P. aeruginosa* puisqu'elle a été identifiée par un crible mené avec plusieurs mutants lors d'infection respiratoire chez le rat (Potvin *et al.*, 2003). Elle est



impliquée dans plusieurs processus biologiques : la production des rhamnolipides, la mobilité, et le biofilm, ce qui ne permet pas de savoir lequel de ces processus est celui principalement impliqué la pathogénicité dont elle est responsable (Wilhelm *et al.*, 2007). L'implication d'EstA dans une voie de signalisation pourrait expliquer son implication dans ces différents processus (Wilhelm *et al.*, 2007).

Au niveau de sa sécrétion, et de l'appréhension du mécanisme du SST5, EstA est intéressante car elle n'est pas clivée. Mais elle possède une autre originalité qui la rend digne d'attention : puisque c'est une estérase, son domaine passager ne possède vraisemblablement pas de repliement de type hélice  $\beta$ , comme c'est le cas pour la plupart des ATs. La résolution de la structure de la protéine dans sa totalité (domaine passager + domaine transporteur) est venue confirmer cette hypothèse (Fig.37B) (van den Berg, 2010). On peut y voir le domaine passager possédant un repliement globulaire exposé à la surface, et relié au domaine  $\beta$  par une hélice  $\alpha$  logée dans le canal qu'il forme. C'est la première structure résolue d'un AT en entier.

Cela apporte des informations importantes sur le processus de sécrétion, comme détaillé préalablement dans les paragraphes précédents. Il est clair que la sécrétion d'EstA se fait nécessairement par le pore de son domaine transporteur, ce qui exclut le modèle de sécrétion oligomérique, et le modèle dans lequel le passager est sécrété par le pore formé par BamA. De manière surprenante, son repliement globulaire ne contredit pas le modèle de sécrétion vectorielle. Ce modèle, principalement bâti en raison de la très large distribution de structures de type hélice  $\beta$  chez les ATs, suppose que l'énergie nécessaire à la translocation de la ME est fournie par le repliement en hélice  $\beta$  de la chaîne polypeptidique. L'énergie ainsi libérée permettrait d'extirper le reste de la protéine afin de l'exporter à la surface. La carte des contacts d'EstA suppose un grand nombre d'interactions qui permettrait d'assurer ce repliement vectoriel.

Il n'y a donc qu'un seul AT décrit chez *P. aeruginosa*, mais il représente un exemple assez original parmi cette famille de protéines sécrétées.

#### III.4.2. Les TPS

Sept systèmes TPS putatifs ont été identifiés sur le génome séquencé de la souche PAO1 *P. aeruginosa* (pour faciliter la lecture, les couples seront toujours présentés selon le format TpsA/TpsB) (Filloux *et al.*, 2004; Hardie *et al.*, 2009).



Les TpsA des couples PA0041/PA0040 et PA2462/PA2463 présentent des similarités avec l'hémagglutinine filamenteuse FHA de *B. pertussis*. Le TpsA du couple PA2542/PA2543 présente quant à lui une homologie avec l'hémagglutinine filamenteuse des *Xanthomonas* (Hardie *et al.*, 2009).

Les TpsA des trois autres couples (PA0690/PA0692, PA4541/PA4540 et PA4625/PA4624) sont similaires à HMW1 de *H. influenzae*.

Enfin, il existe un TpsA orphelin PA4082, qui ne possède pas de TpsB dans son voisinage génétique.

Très peu de données expérimentales sont disponibles sur ces protéines, à part quelques données de transcriptomes. Seuls les couples PA4541/PA4540, PA4625/PA4624 et le TpsA orphelin PA4082 ont été décrits expérimentalement.

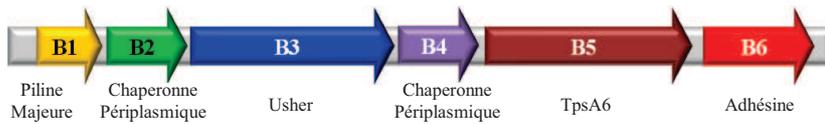
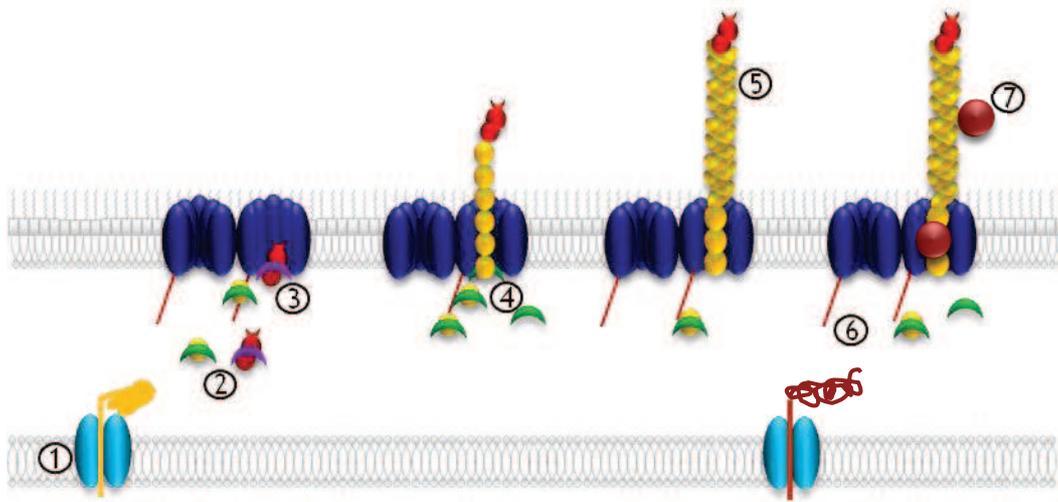
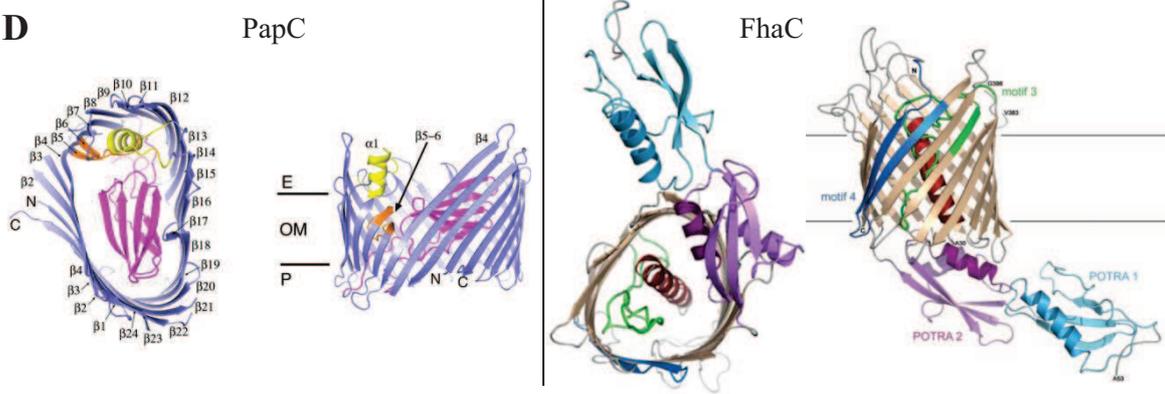
#### III.4.2.1. LepA/LepB

LepA (PA4541) est sécrétée grâce à son transporteur LepB (PA4540). C'est une protéase responsable de l'activation du facteur de transcription eucaryote NF- $\kappa$ B, qui joue un rôle critique dans les réponses immunitaires et inflammatoires de l'hôte (Kida *et al.*, 2008).

#### III.4.2.2. CdrA/CdrB

Les premiers travaux sur ce TPS ont été très récemment publiés (Borlee *et al.*, 2010). Il correspond au couple PA4625/PA4624. Les prédictions réalisées sur CdrA suggèrent une structure très riche en brins  $\beta$ , et formant une très grande hélice  $\beta$ . Au sein de cette hélice se trouveraient des poches capables de lier des sucres. La pro-forme de CdrA possède une masse de 220 kDa, et sa forme mature 150 kDa. Elle a l'originalité d'être à priori clivée en N- et C-terminal : son premier acide aminé est le résidu 438, or, dans cette configuration, cela équivaldrait à une masse de 175 kDa. Il est donc fort probable qu'elle subisse une maturation également en C-terminal. La structure prédite de CdrB est tout à fait conforme à celle de FhaC, un tonneau de 16 brins, et deux domaines POTRA.

CdrA est une adhésine impliquée dans la formation du biofilm. Elle se lie aux polysaccharides Psl, et est capable d'induire un phénotype d'agrégation bactérienne, en milieu liquide, solide ou en biofilm. Par ailleurs, elle est produite en condition de biofilm, et le di-

**A****B****C****D**

- Figure 63 -

### La voie « Chaperonne Usher » (Cu)

(A) Cluster de gènes *cupB*. (B) *Fimbriae* CupB en microscopie électronique (Ruer *et al.*, 2007). (C) Assemblage du *fimbriae* CupB. La piline majeure B1 (en orangé) et l'adhésine B6 (en rouge) transitent par le translocon Sec (en cyan) (1), elles sont prises en charges par leur chaperonnes B2 (en vert) et B4 (en violet) respectives (2). L'adhésine traverse d'abord le Usher (en bleu) (3), puis les sous-unité pilines (4), qui vont ensuite adopter leur structure hélicoïdale. Le TpsA CupB5 (en marron) est exporté à la surface en utilisant le Usher CupB3 (6), et reste associé au *fimbriae* (7). (D) Structure de la protéine Usher PapC du systèmes des *pili* de type I d'*E.coli*, homologue à la voie Chaperonne Usher. Il s'agit d'un tonneau  $\beta$  de 24 brins, au centre duquel se trouve un bouchon. En comparaison, la structure du TpsB FhaC (Clantin *et al.*, 2007).

(D'après Ruer *et al.*, 2008; Sauer *et al.*, 2002; Remaut *et al.*, 2008)

GMP cyclique induit l'expression de son gène (molécule connue pour induire les gènes impliqués dans la formation du biofilm).

CdrA est un exemple d'adhésine sécrétée dans le milieu extracellulaire. Malgré tout, elle semble jouer un rôle très important pour l'adhérence de la bactérie.

### III.4.2.3. Cas particulier : le P-Usher

Chez *P. aeruginosa*, le cluster de gènes *cupB* (Fig.63A) code une machinerie permettant l'assemblage et l'exposition à la surface d'un *fimbriae* CupB (Fig.63B), composé majoritairement par la piline CupB1. Les sous-unités pilines traversent la ME grâce à la protéine de ME CupB3, protéine dite « Usher » (Fig.63C) (Ruer *et al.*, 2007). Elle est un homologue de la protéine PapC d'*E. coli*, qui forme un tonneau  $\beta$  de 24 brins, obstrué par un « bouchon » (Fig.63D). La protéine agit en dimère, et elle assure le passage des pilines formant le *fimbriae* (Remaut *et al.*, 2008) selon le mécanisme appelé « chaperon-usher » (Fig.63C). Ce système possède donc un transporteur de type tonneau  $\beta$ , localisé dans la ME, mais différent des TpsB classiques.

Ce cluster a la particularité de posséder le gène *PA4082*, codant pour le TpsA orphelin de *P. aeruginosa*. Il a été nommé CupB5 (Fig.63A) en raison de son environnement génétique. Bien qu'il ait été proposé qu'il soit sécrété par le TpsB LepB, il est exporté à la surface de la bactérie grâce au Usher CupB3 (Fig.63C) (Filloux *et al.*, 2004; Ruer *et al.*, 2008). Malgré la différence de structure entre le tonneau  $\beta$  d'un TpsB traditionnel et celui d'une protéine Usher (Fig.63D), CupB3 joue le rôle de transporteur pour CupB5. Cela lui est permis par sa fonction de transporteur de protéine au travers de la ME, et par la présence d'un domaine POTRA situé à l'extrémité N-terminale, localisé dans le périplasme (Ruer *et al.*, 2008). De manière intéressante, l'homologue de ce cluster chez *P. fluorescens* code : (i) le TpsA CupB5, (ii) son TpsB correspondant, (iii) une version de CupB3 qui ne possède pas de domaine POTRA. Par ailleurs, le TpsB de *P. fluorescens* rétablit la sécrétion de CupB5 dans une souche de *P. aeruginosa* mutante pour le gène *cupB3* (Ruer *et al.*, 2008). Aux vues de ces données génétiques, structurales, et fonctionnelles, il apparaît donc, selon toute vraisemblance, que la protéine CupB3 de *P. aeruginosa* soit le résultat de la fusion de deux protéines, une protéine Usher traditionnelle et un TpsB classique. Visiblement cette fusion a



consisté à greffer un domaine POTRA sur la protéine Usher, ce qui lui a valu d'être baptisée le P-Usher (pour POTRA-Usher)

Cet exemple constitue donc un cas unique pour le système des TPS à l'heure actuelle.

### III.4.3. Conclusion

*P. aeruginosa* ne possède que très peu de substrats sécrétés par le SST5 en comparaison avec des bactéries comme *E. coli*, ou *B. pertussis*. Sur seulement quatre protéines caractérisées, deux constituent de vraies originalités dignes d'être soulignées. Malgré cette sous représentation en protéines sécrétées par le SST5, et de manière identique pour de nombreux mécanismes, elle constitue un hôte de choix qui offre un contexte génétique particulier et des exemples originaux à étudier.

Et ce ne sont pas les résultats que nous avons obtenus au cours de ma thèse qui vont entacher la réputation du « Pyo », bien au contraire ;)



*RESULTS*

*&*

*DISCUSSION*



# Avant-Propos

---

Le laboratoire dans lequel j'ai effectué mes travaux de thèse a toujours étudié la pathogénicité de la bactérie pathogène opportuniste *P. aeruginosa*. Les grands axes de recherches développés dans ce laboratoire ont donc été, ou sont toujours pour certains, la régulation de la virulence, la formation du biofilm, les complexes macromoléculaires de type systèmes de sécrétion et appendices extracellulaires, et les protéines sécrétées, particulièrement celles impliquées dans la virulence.

C'est en se focalisant sur ces exoprotéines que le sujet de recherche qui m'a été confié a vu le jour. L'idée directrice était de chercher de nouvelles protéines transloquées dans le cytosol de l'hôte en se basant sur le postulat suivant : une protéine active chez l'hôte possède souvent des motifs eucaryotes. Notre démarche a donc consisté à analyser le génome de la souche modèle d'étude PAO1 de *P. aeruginosa*, afin d'identifier des gènes codants des protéines portant des domaines de type eucaryote (Ser-Thr kinase, LRR-Leucine Rich Repeat, motif Ankyrine notamment). C'est alors que la protéine ExoU, la première PLP bactérienne identifiée a retenu notre attention. Cette protéine possède un domaine eucaryote patatine, et elle est absente de la souche PAO1. En revanche, nous avons identifié quatre homologues d'ExoU au moyen d'analyses bioinformatiques. Mon projet visait donc à déterminer si ces quatre protéines, PlpA (Patatin-like protein A), PlpB, PlpC et PlpD, étaient produites, sécrétées (éventuellement par quel système de sécrétion), actives, impliquées dans la virulence. J'ai donc attaqué l'étude des fameuses « Patatin-like protein », dont le nom m'a valu bien des sourires, pour finalement m'intéresser plus particulièrement au mécanisme de sécrétion de PlpD.

Les résultats présentés ici aborderont (i) en premier lieu la découverte d'un système de sécrétion inédit, le Système de Sécrétion de Type Vd, au travers des résultats obtenus sur la protéine PlpD; (ii) le second chapitre des Résultats sera consacré à l'étude de PlpA, sa sécrétion et son rôle dans la pathogénicité, et des résultats préliminaires sur PlpB et PlpC; (iii) le troisième chapitre des Résultats abordera les différentes voies de sécrétion présentes chez *P. aeruginosa*, le sujet d'une revue que nous avons publiée.

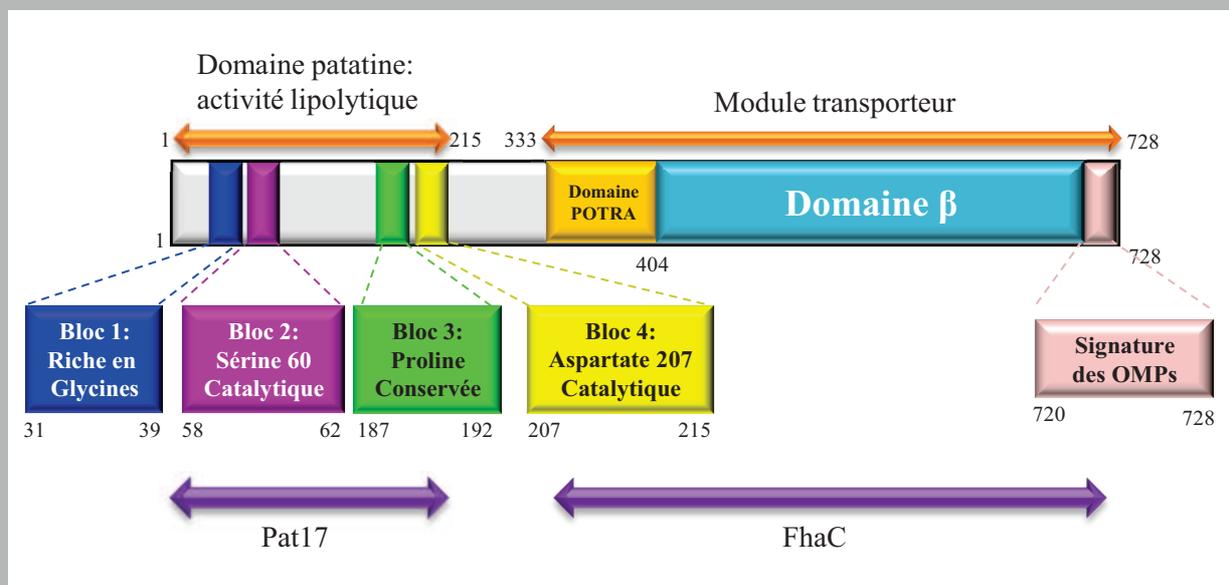
Bloc 1				Bloc 2			
ExoU	106	LVLSGGGAKGAAYPGAMLAL	125	ExoU	137	MSGSSAGGITAALL	150
VipD	31	LVLSGGGAKGISYLQMIKAL	50	VipD	62	VSGASAGAMTASIL	75
MXAN_3852	52	LVLSGGGAKGAFQVGAERVL	71	MXAN_3852	82	IFGVSVGALNAALL	95
PlpD	26	LVLSGGAARGLAHIQVLKAL	45	PlpD	55	IAGTSMGAVVGGLY	68

Bloc 3				Bloc 4			
ExoU	312	AHISGSFPGVFQKVS	326	ExoU	341	FOGGVMINVPPEMID	357
VipD	258	VQWSGAHPVLFVPGR	272	VipD	279	IAQGGILDNMPEIEGLD	295
MXAN_3852	185	VWQSSTLPLIWEVPG	199	MXAN_3852	203	LVGGRLRNATPLGDALE	219
PlpD	184	IRASMSIPAVFAPVE	198	PlpD	204	LVGGMVDNIPVDVARD	220

- Figure 64 -  
Les blocs PLP

L'alignement des protéines ExoU et PlpD de *P. aeruginosa*, VipD de *L. pneumophila*, et MXAN\_3852 de *M. xanthus*, met en évidence 4 zones de forte conservation: les 4 blocs caractéristiques des patatines. Les résidus sur fond gris sont les résidus conservés, les deux résidus catalytiques (Ser et Asp) sont sur fond noir. Les numéros indiqués représentent les résidus encadrant les blocs.



- Figure 65 -  
Organisation de PlpD

PlpD est organisée en 2 modules (représentés par les flèches oranges), le N-terminal qui est porteur de l'activité catalytique (où l'on retrouve les blocs PLP), et le C-terminal, composé d'un domaine POTRA et d'un tonneau  $\beta$  de 16 brins. Les flèches violettes représentent les régions de PlpD qui ont pu être modélisées selon la structure de la protéine indiquée. Les numéros notés indiquent les 1ers et derniers résidus de la région/bloc/protéine concernée.

# I. Etude et Caractérisation de PlpD : Découverte d'une Nouvelle Branche du Système de Sécrétion de Type V

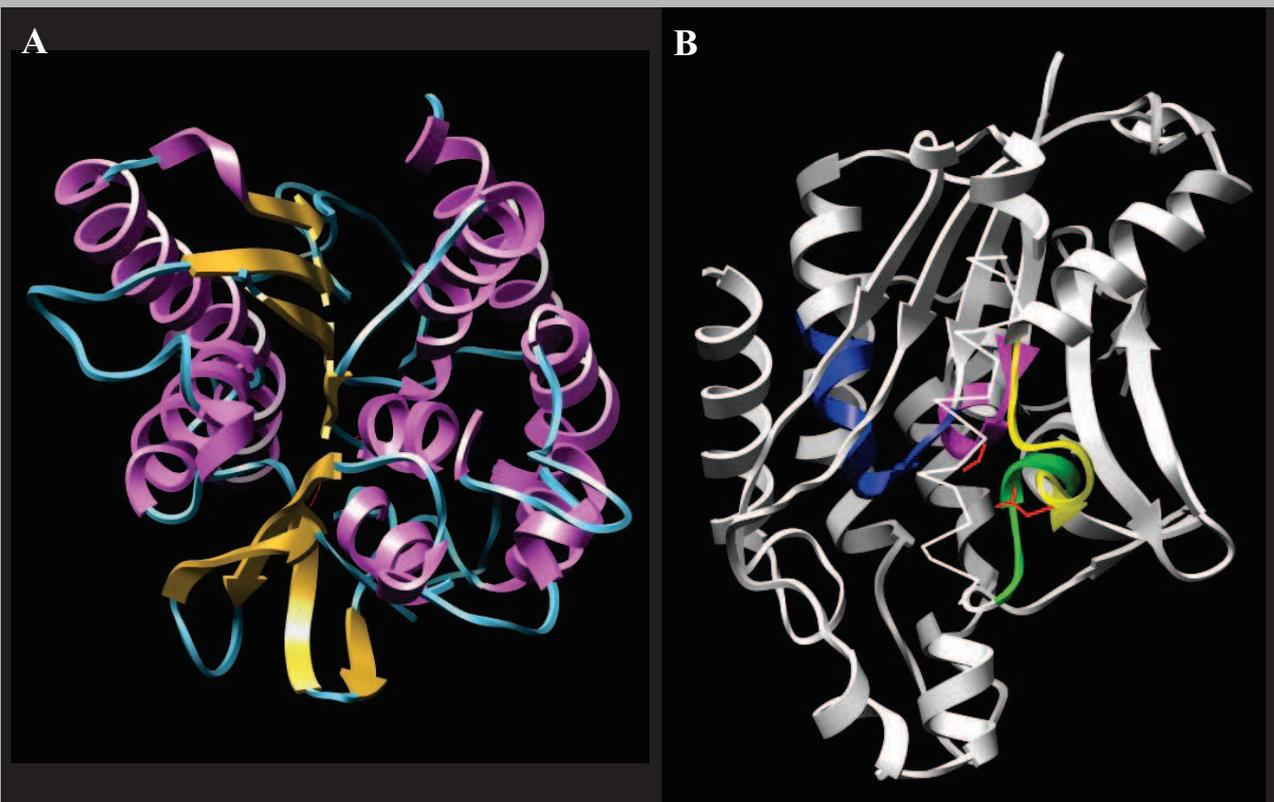
---

## I.1. Introduction

Lorsque ce projet a été initié, courant 2005, l'injection de protéines directement dans le cytosol eucaryote n'était connue chez *P. aeruginosa* qu'au travers du SST3, puisque le SST6 n'était pas encore décrit. Seules quatre protéines injectées étaient donc connues, les effecteurs du SST3 ExoS, T, U et Y.

La souche modèle d'étude PAO1 de *P. aeruginosa* possède les gènes *exoS*, *exoT*, et *exoY*, mais ne possède pas le gène *exoU*. Or des analyses *in silico* menées sur le génome de cette souche ont permis de mettre en évidence quatre gènes présentant des similarités avec le gène *exoU*. L'absence du gène *exoU* du génome de cette souche, combinée à la présence de quatre homologues putatifs, nous a conduits à nous poser la question suivante : est-ce que l'un de ces quatre gènes code une protéine qui jouerait le rôle d'ExoU dans la souche PAO1 ?

En partant de cette question, nous avons étudié plusieurs aspects de ces homologues putatifs : motifs communs, modélisation de structure, activité, sécrétion, phylogénie... C'est ainsi que nous avons découvert que PlpD, une protéine codée par l'un de ces quatre gènes (*PA3339*), était sécrétée par un mécanisme original et non identifié jusque-là : présentant de nombreux points communs avec le SST5, mais ne correspondant à aucune des trois branches de ce système, nous avons donc proposé de nommer cette nouvelle voie « Système de Sécrétion de Type Vd ».

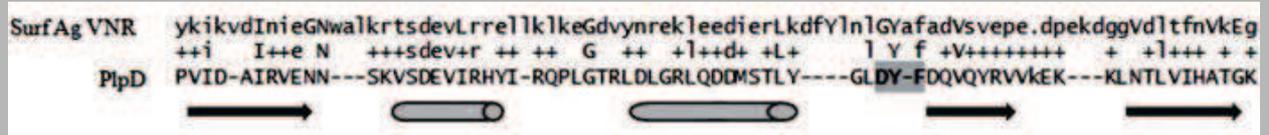


- Figure 66 -

### Modélisation du domaine N-terminal de PlpD

(A) Le domaine N-terminal de PlpD serait organisé en 3 couches  $\alpha/\beta/\alpha$ , à l'identique de l'organisation de Pat17 (Rydel *et al.*, 2003). En mauve: les hélices  $\alpha$ ; en orange: les brins  $\beta$ ; en cyan, les régions non structurées. Vue du dessus.

(B) Les 4 blocs PLP de PlpD seraient localisés les uns à cotés des autres, à la manière d'une poche catalytique. Pour une meilleure compréhension, l'hélice  $\alpha$  au 1<sup>er</sup> plan a été représentée en fil de fer. En bleu: bloc 1; en mauve: bloc 2, en vert: bloc 3, en jaune: bloc 4; en rouge: les résidus de la dyade catalytique putative (Ser60 et Asp207).



- Figure 67 -

### Domaine POTRA de PlpD

Les brins  $\beta$  sont représentés par une flèche, et les hélices  $\alpha$  par un cylindre. Le motif DYF surligné chez PlpD correspond au motif GYF trouvé dans les domaines POTRA, en notant cependant la substitution de la Glycine. SurfAg VNR: domaine POTRA.

## **I.2. Résumé des principaux résultats**

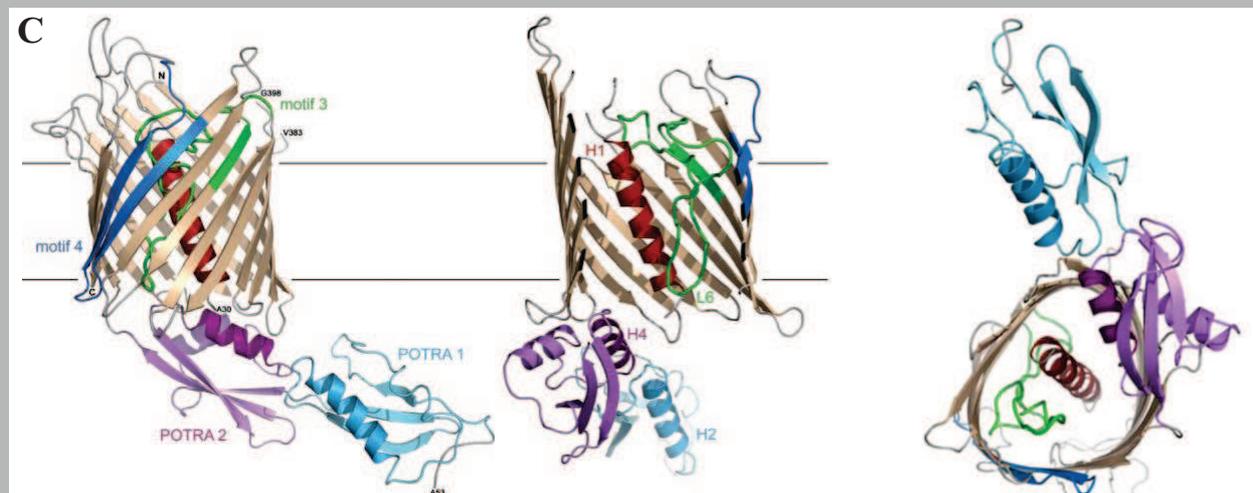
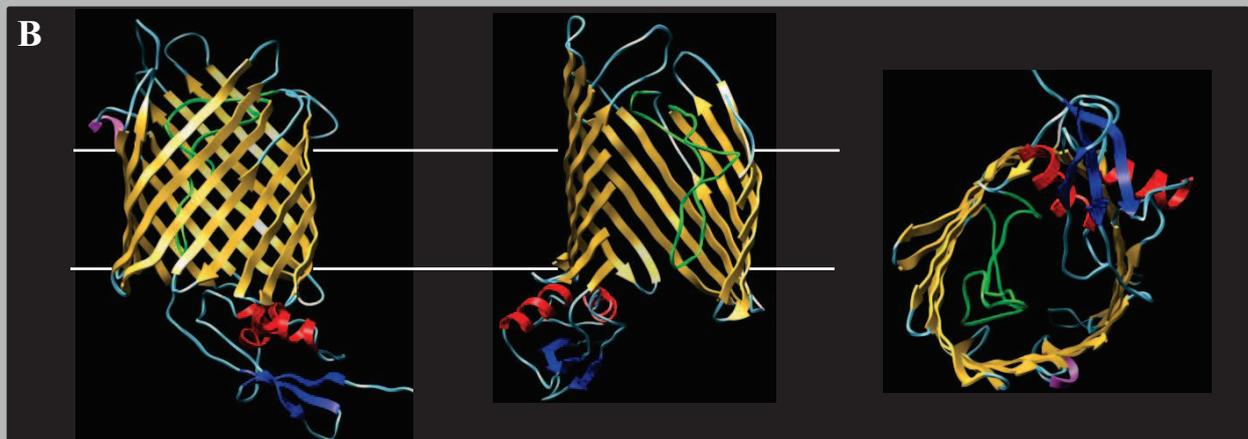
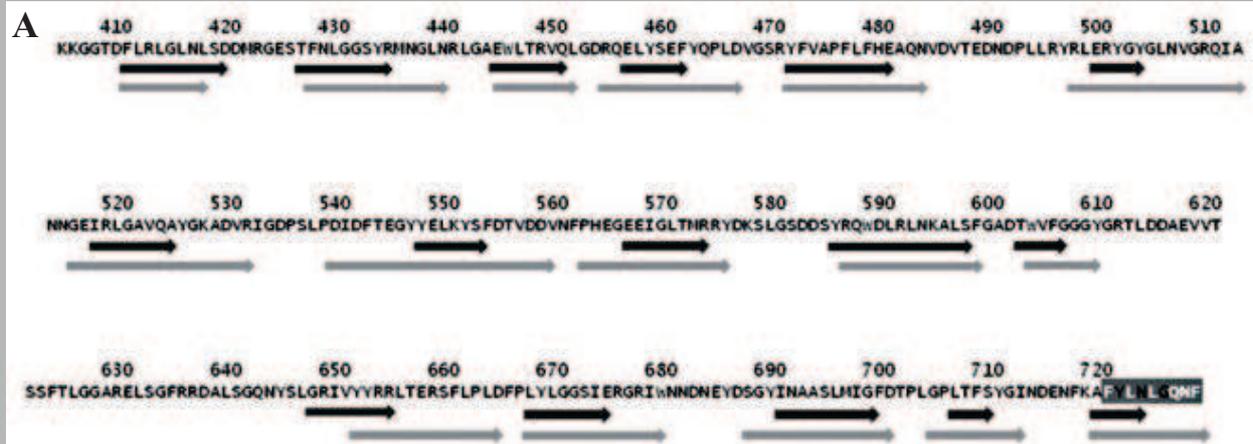
### **I.2.1. PlpD est une patatin-like protein...**

PlpD a été identifiée à la suite d'une recherche d'homologues d'ExoU à l'aide de l'algorithme BLAST. Nous avons voulu dans un premier temps confirmer le résultat apporté par cette approche. L'alignement de la séquence protéique de PlpD avec celles des autres PLPs décrites, ExoU de *P. aeruginosa*, VipD de *L. pneumophila* et MXAN\_3852 de *M. xanthus*, montre que l'identité de séquence entre ces protéines est très faible, hormis sur quatre régions situées à l'extrémité N-terminale de PlpD (Fig.64 et 65). Ces régions, correspondant aux quatre blocs caractéristiques des PLPs bactériennes décrits par Banerji et Flieger (Banerji & Flieger, 2004), mettent en évidence les deux résidus de la dyade catalytique putative de cette protéine, la Ser60 et l'Asp207.

Pour confirmer que PlpD puisse appartenir à la famille des PLPs, nous avons modélisé la structure tridimensionnelle de son domaine N-terminal à l'aide du serveur Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>). Ce programme permet de prédire des structures tertiaires en alignant la séquence de la protéine sur la structure du meilleur modèle possible, choisi dans la banque de données de structures résolues (PDB). Ainsi, Phyre a établi que le meilleur modèle possible pour structurer le domaine N-terminal de PlpD était la structure de la patatine végétale Pat17, la seule structure résolue de patatine connue à l'heure actuelle (Fig.65).

On peut voir sur cette prédiction un repliement de type globulaire, composé en trois couches  $\alpha/\beta/\alpha$  (Fig.66A), similaire au repliement de la cPLA<sub>2</sub> humaine (Dessen *et al.*, 1999), et différent des lipases traditionnelles pour lesquelles le repliement est de type  $\alpha/\beta$ . De plus, les quatre blocs PLP sont localisés à proximité les uns des autres, formant une cavité tout à fait comparable à une poche catalytique (Fig.66B). Les résidus Ser60 et Asp207 seraient orientés vers le centre de cette cavité, ce qui les rendrait disponibles pour réaliser la réaction enzymatique sur le substrat.

La présence des quatre blocs PLP, et la prédiction de structure (basée sur la structure résolue d'une patatine) indiquent que PlpD appartient bien à la famille de PLPs.



- Figure 68 -  
 Domaine C-terminal de PlpD

(A) Les brins  $\beta$  prédits par les analyses de structures secondaires ou tertiaires sont respectivement représentés par une flèche noire ou grise. (B) Modélisation du domaine C-terminal de PlpD (basé sur FhaC) par le programme Phyre. En orange: brins du tonneau; en mauve: hélice du tonneau; en cyan: régions non structurées; en bleu: brins du POTRA; en rouge: hélice du POTRA; en vert: boucle insérée dans le tonneau. (C) Rappel de la structure de FhaC (Fig.53A)

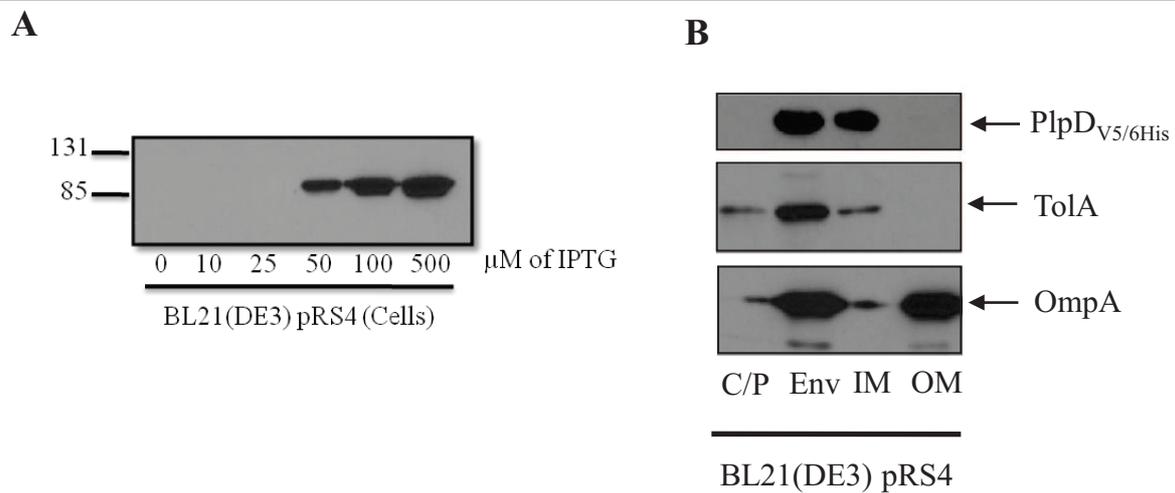
### I.2.2. ... qui possède une organisation modulaire originale

PlpD est donc une PLP, mais le domaine patatine ne recouvre pas la totalité de la protéine. En effet, il est situé sur le domaine N-terminal, domaine à l'extrémité duquel on trouve aussi un peptide signal (Fig.65). Ceci indique que contrairement à ExoU, qui est sécrétée par le SST3, PlpD est au minimum exportée vers le périplasma. L'étude de la région C-terminale révèle la présence de deux domaines conservés:

(i) un domaine « Surface Ag VNR » (PF07244), de la famille des domaines POTRA, des résidus 333 à 404. Les domaines POTRA sont des domaines conservés chez les protéines transporteurs de type BamA, et TpsB, et présents en plusieurs copies. Ils sont impliqués dans l'interaction physique entre la protéine qui doit être transportée, et celle qui assure le transport. Contrairement à leur séquence, leur structure est bien conservée. Elle est composée d'un enchaînement d'éléments de structure secondaire  $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ , et elle forme un poche hydrophobe (Fig.67 et Fig.52);

(ii) un domaine « Bacterial Surface Ag » (PF01103) est retrouvé à la suite du domaine POTRA, du résidu 404 au résidu terminal, la Phe728 (Fig.65). Nos prédictions de structure secondaire suggèrent que ce domaine soit composé d'un grand nombre de brins  $\beta$  (Fig.68A), ce qui est tout à fait en accord avec la structure tertiaire connue de ce genre de domaine. En effet, les transporteurs des protéines de la famille des TPS et de BamA, qui forment un tonneau  $\beta$ , sont des domaines « Bacterial Surface Ag ». Par ailleurs, des programmes de prédictions de structures en tonneau  $\beta$  indiquent que PlpD peut former ce genre de structure. Enfin, les derniers résidus de cette protéine correspondent au motif caractéristique des protéines à tonneau  $\beta$  qui leur permet d'être prises en charge par BamA pour être insérées dans la ME (Fig.68A). Cette signature est composée d'une Phénylalanine ou d'un Tryptophane au niveau du dernier résidu, précédé par un résidu polaire ou chargé, précédé par une alternance de résidus hydrophobes et quelconques.

De la même manière que pour le domaine N-terminal, nous avons modélisé le domaine C-terminal de PlpD à l'aide de Phyre (Fig.68B). Cette fois-ci, le meilleur modèle retenu a été le TpsB FhaC, le transporteur de l'hémagglutinine filamenteuse FHA, de *B. pertussis*. Cette modélisation supporte la présence d'un domaine POTRA du côté N-terminal, relié à un tonneau  $\beta$  de 16 brins. De manière intéressante, contrairement à FhaC (Fig.68C), aucune hélice centrale n'obstruerait le pore central, mais on retrouve bien une large boucle



- Figure 69 -

PlpD<sub>V5/6His</sub> est produite sous forme entière chez *E. coli*

(A) Immunodétection de PlpD<sub>V5/6His</sub> avec un anticorps  $\alpha$ -V5 sur des lysats de bactéries *E. coli* transformées avec le pRS4 (pET-DEST42-*plpD*<sub>V5/6His</sub>). Au cours de la phase exponentielle de croissance, l'expression du gène a été induite par ajout de différentes concentrations d'IPTG, pendant 2h. Les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE, puis transférés sur une membrane pour révélation. Les tailles à gauche sont en kDa.

(B) PlpD<sub>V5/6His</sub> est adressée à la membrane interne chez *E. coli*. Après lyse par sonication, les compartiments solubles et l'enveloppe cellulaires ont été séparés par ultra-centrifugation. Les 2 membranes ont été séparées par solubilisation de la MI au détergeant (SLS 2%) et ultra-centrifugation. OmpA est un contrôle de ME, et TolA de MI. La révélation de cette immunodétection après séparation des protéines par SDS-PAGE s'est faite au moyen d'un anticorps  $\alpha$ -V5.

localisée dans le passage de canal, qui pourrait tout à fait correspondre à la boucle L6 conservée chez les TpsB (Fig.68B vs Fig.68C).

L'ensemble de ces prédictions nous apprend que PlpD est une protéine multi-domaines, qui possède un domaine C-terminal similaire à un transporteur de protéine de type TpsB, et qu'elle est au minimum exportée vers le périplasma. Cette organisation et ces motifs suggèrent que PlpD soit sécrétée par un processus similaire à celui du SST5 : l'organisation rappelle celle d'un AT (un domaine sécrété relié à un tonneau  $\beta$ ), mais la nature même de ce tonneau, et la présence d'un domaine POTRA évoquent un TpsB. La sécrétion, si elle a lieu, serait alors le fruit d'un mécanisme proche, mais différent, de celui des ATs et de celui des TPS.

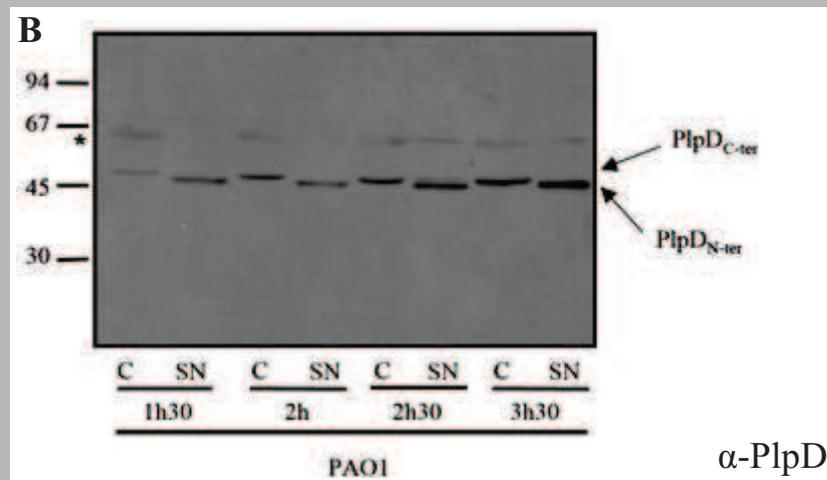
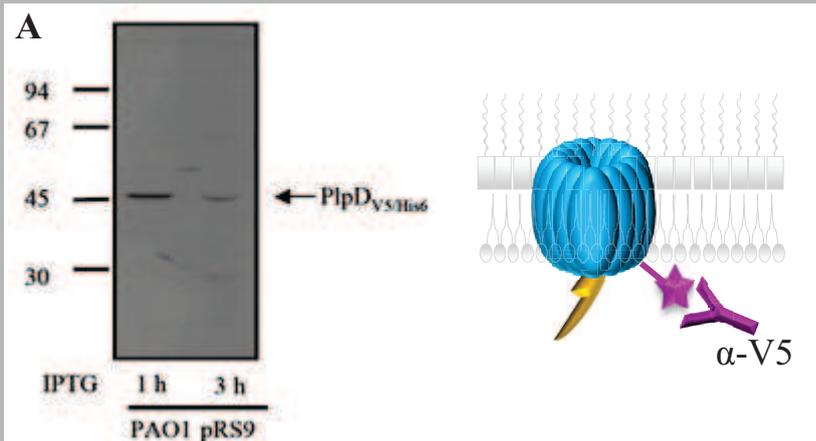
### I.2.3. PlpD est produite sous forme entière chez *E. coli*

Afin d'observer la production de PlpD, nous avons cloné son gène sous le contrôle d'un promoteur *T7*, en lui ajoutant une étiquette V5/6His à l'extrémité C-terminale (pRS4). Ce vecteur a été introduit dans la souche d'*E. coli* BL21(DE3), portant le gène codant la T7 polymérase, inductible par l'ajout d'IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside). Les bactéries sont cultivées jusqu'en milieu de phase exponentielle de croissance, et différentes concentrations d'IPTG sont alors ajoutées pour induire l'expression du gène de la T7 polymérase, qui permettra à son tour l'expression du gène *plpD*<sub>V5/6His</sub>. Les cellules sont récupérées après 2h d'induction, centrifugées, lysées, et les échantillons sont alors analysés en conditions dénaturantes par SDS-PAGE, suivies d'une immunodétection avec un anticorps dirigé contre l'étiquette V5. Sur la figure 69A, on peut observer l'apparition après induction d'une bande correspondant à PlpD<sub>V5/6His</sub> au dessus du marqueur de poids moléculaire 85 kDa, soit aux alentours de 90 kDa. La taille théorique de PlpD<sub>V5/6His</sub> étant de 84 kDa (80 kDa pour PlpD, 4 kDa pour l'étiquette) cette protéine présente donc une migration a priori aberrante.

Nous avons réalisé un fractionnement cellulaire de ces bactéries, cultivées dans les mêmes conditions, en solubilisant la membrane interne avec du SLS (sodium N lauroylsarcosinate) 2%. Les échantillons sont analysés par western-blot avec l'anticorps anti-V5. Produite chez *E. coli*, PlpD<sub>V5/6His</sub> est associée aux membranes, plus précisément à la membrane interne (Fig.69B). Des anticorps dirigés contre la protéine de membrane interne

- Figure 70 -

**PlpD<sub>V5/6His</sub> est clivée  
chez *P. aeruginosa***



(A) Immunodétection de PlpD<sub>V5/His6</sub> avec un anticorps  $\alpha$ -V5 sur des lysats bactériens de *P. aeruginosa* conjugué avec le pRS9 (pMMB67/*plpD*<sub>V5/His6</sub>). Au cours de la phase exponentielle de croissance, l'expression du gène a été induite par ajout d'1mM d'IPTG, pendant 1 et 3h. Les cellules ont été lysées par sonication, et les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE, puis transférés sur une membrane pour révélation. A droite, le schéma représente le domaine C-terminal étiqueté V5 (étoile) reconnu par l'anticorps  $\alpha$ -V5.

(B) La même expérience renouvelée, mais avec la souche sauvage sans plasmide, et l'anticorps utilisé est un  $\alpha$ -PlpD polyclonal. C pour cellules; SN pour surnageants de cultures. L'astérisque indique une bande aspécifique reconnue par l'  $\alpha$ -PlpD. Les tailles sont en kDa. L'équivalent de 0,1 et 1 UDO<sub>600</sub> a été déposé pour les cellules et les surnageants de culture respectivement.

TolA, et contre la protéine de membrane externe OmpA, sont utilisés en contrôle de fractionnement.

Ces résultats indiquent que PlpD est produite sous sa forme entière chez *E. coli*.

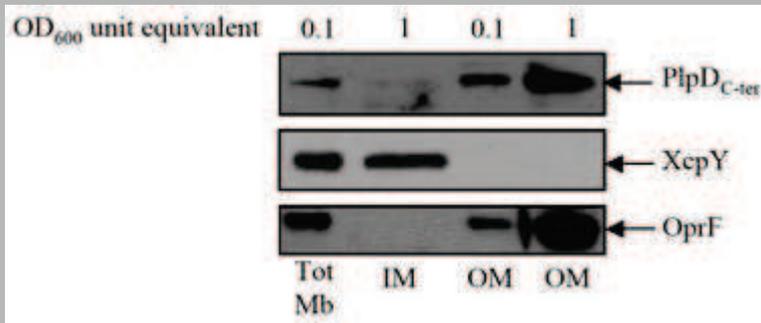
#### I.2.4. PlpD est sécrétée par le SST5d chez *P. aeruginosa*

Nous avons voulu par la suite observer la production de PlpD<sub>V5/6His</sub> chez *P. aeruginosa*. Pour ce faire, le gène a été cloné dans un vecteur navette, sous le contrôle d'un promoteur *tac* inductible à l'IPTG (pRS9). Après introduction de ce plasmide dans la souche PAO1 de *P. aeruginosa*, nous avons induit l'expression du gène *plpD* et traité les cellules comme précédemment, et nous avons également préparé les protéines présentes dans les surnageants de culture en les précipitant à l'acide trichloroacétique (TCA). La détection de PlpD<sub>V5/6His</sub> au moyen de l'anticorps anti-V5 révèle dans ce cas la présence d'une bande au voisinage des 45 kDa, observable uniquement dans les cellules (Fig.70A). L'étiquette étant ajoutée à l'extrémité C-terminale, la bande ici détectée correspond nécessairement au domaine C-terminal de PlpD<sub>V5/6His</sub>, qui a été clivé du reste de la protéine (Fig.70A, schéma). Cette taille pourrait correspondre à une partie de la protéine comprenant le domaine POTRA et le tonneau  $\beta$  en entier. Ce résultat est en accord avec l'hypothèse d'une sécrétion du domaine patatine N-terminal de PlpD selon un mécanisme similaire à celui des ATs, au cours duquel le domaine sécrété est clivé de son domaine transporteur pour être relargué dans le milieu extracellulaire.

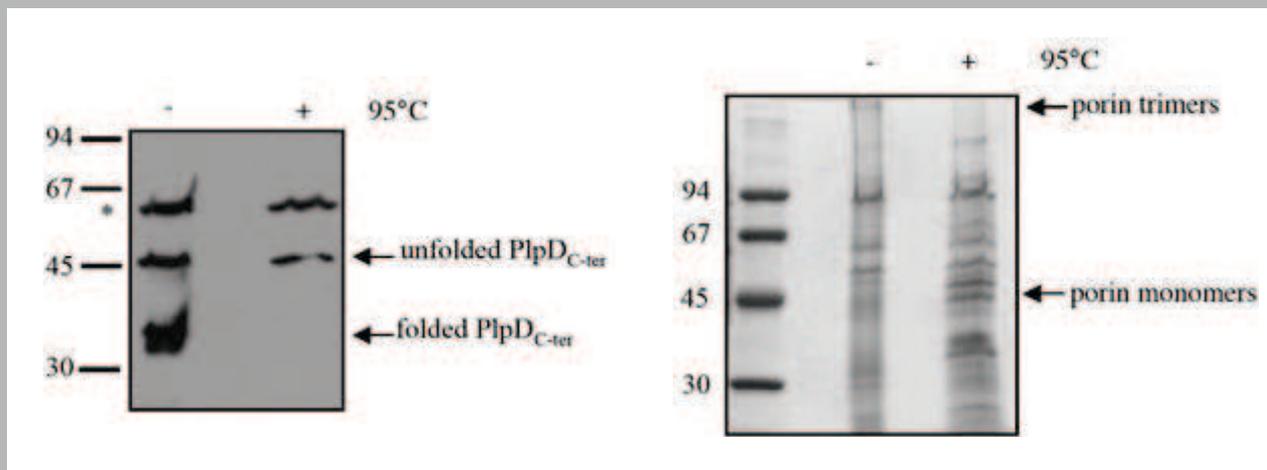
Afin de confirmer ce résultat, nous avons généré des anticorps polyclonaux dirigés contre PlpD<sub>V5/6His</sub>, à partir de la protéine produite et purifiée chez *E. coli*. A l'aide de ces anticorps, nous avons essayé de détecter le domaine N-terminal, que nous supposons localisé dans le milieu extracellulaire de la souche sauvage PAO1, après avoir été clivé et relargué. Nous avons fait un suivi de croissance en récoltant des échantillons cellulaires et extracellulaires à chaque point, qui ont été analysés par SDS-PAGE et soumis à une immunodétection avec l'anticorps anti-PlpD. Dans ces conditions, nous avons pu confirmer la détection d'une bande dans les cellules, d'une taille de 47 kDa, correspondant au domaine C-terminal (Fig.70B). De plus, à l'aide de cet anticorps, une bande de 45 kDa est visible dans les surnageants de cultures. La taille observée est bien supérieure à celle prévue théoriquement

- Figure 71 -

PlpD est adressée à la ME chez *P. aeruginosa*



Expérience identique à celle de la Fig.68B. Ici, l'anticorps utilisé est l' $\alpha$ -PlpD polyclonal, la souche est la souche PAO1 sans plasmide. Les cellules ont été collectées en milieu de phase stationnaires. XcpY et OprF sont des contrôles de MI et ME respectivement.



- Figure 72 -

Le domaine C-terminal de PlpD forme un tonneau  $\beta$

A gauche: des échantillons de *P. aeruginosa* PAO1 en phase stationnaire de croissance ont été analysés sur gel d'acrylamide 10% en conditions natives, après avoir été chauffés (+) ou non (-) à 95°C. La différence de mobilité électrophorétique est observée grâce à l'anticorps polyclonal  $\alpha$ -PlpD. \* = bande aspécifique reconnue par cet anticorps. A droite: la différence de mobilité des porines (indiquées par les flèches) est montrée en contrôle après coloration au bleu de Coomassie. Les tailles sont en kDa. L'équivalent de 0,1 UDO<sub>600</sub> a été déposé.

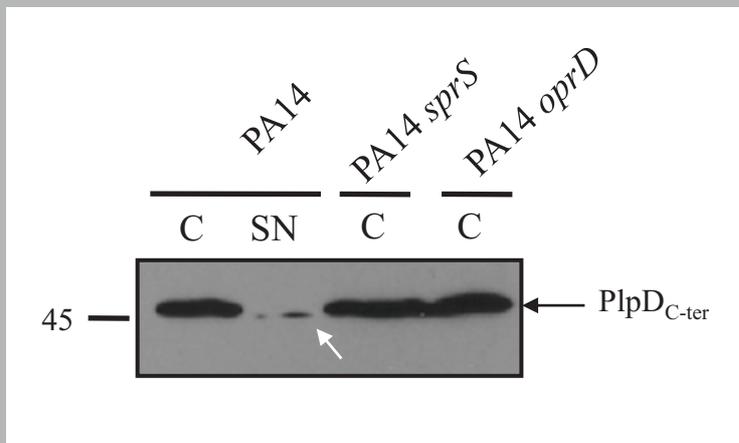
pour le domaine patatine (33 kDa). Cependant, la somme des tailles de ces deux bandes observées chez *P. aeruginosa* correspond à la taille observée pour la protéine non clivée chez *E. coli* (Fig.69A). Cette bande retrouvée dans les surnageants de culture correspond donc bien au domaine patatine. La différence de taille peut s'expliquer soit par une migration aberrante, soit par une modification post-traductionnelle (glycosylation par exemple, envisageable puisque les patatines végétales sont des glycoprotéines).

Dans le but de s'assurer que le domaine C-terminal soit bien un tonneau  $\beta$ , localisé et correctement inséré dans la membrane externe, nous avons réalisé une expérience de fractionnement cellulaire de la souche PAO1. Contrairement à ce qui a été observé chez *E. coli*, le domaine C-terminal de PlpD est localisé dans la membrane externe (Fig.71). Des anticorps anti-XcpY et anti-OprF sont utilisés comme contrôle de membrane interne et externe respectivement.

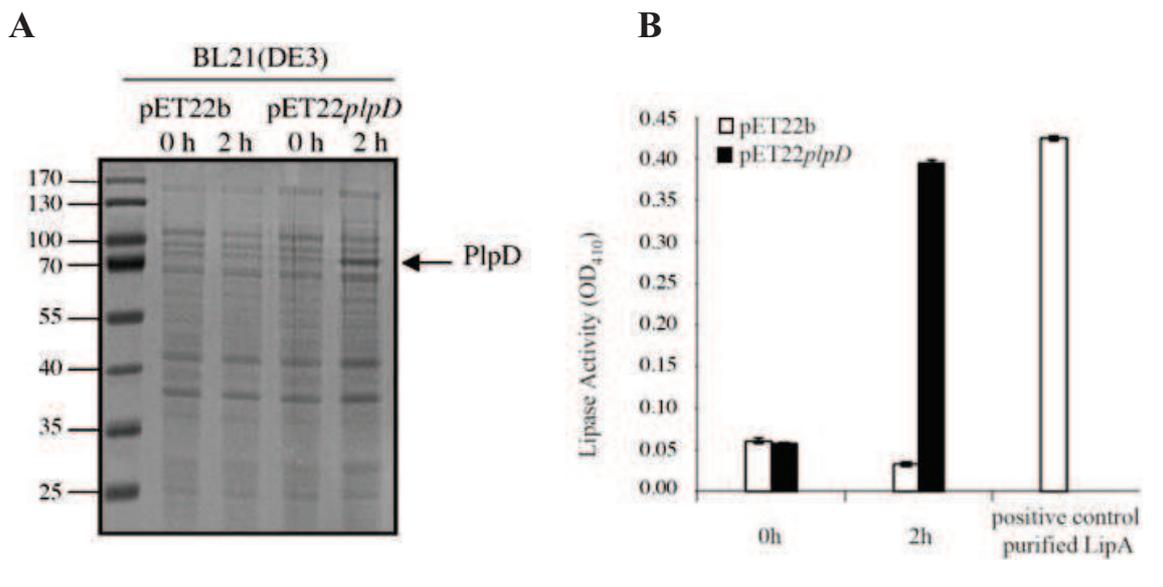
Les tonneaux  $\beta$  sont connus pour subir un changement de mobilité électrophorétique selon qu'ils soient analysés sur gel d'acrylamide en conditions natives ou dénaturantes (Dekker *et al.*, 1995). Le traitement de PlpD dans ces deux conditions montre effectivement une différence de migration: en conditions natives, PlpD migre plus rapidement qu'en conditions dénaturantes, ce qui suggère qu'elle soit repliée en tonneau  $\beta$  (Fig.72). Ce résultat montre donc que le domaine C-terminal de PlpD forme un tonneau  $\beta$  qui est correctement inséré et replié dans la membrane externe.

L'ensemble de ces résultats indiquent que PlpD est une protéine qui sécrète son domaine patatine dans le milieu extracellulaire, et que son domaine C-terminal est un tonneau  $\beta$  inséré dans la membrane externe. Cela rappelle fortement le mode de sécrétion du SST5, en particulier celui des ATs puisque l'on a affaire à une protéine sécrétée fusionnée à son transporteur. Néanmoins, la nature même de ce transporteur, identique à un TpsB, suggère que la sécrétion soit le fruit d'un mécanisme similaire, mais différent de celui des ATs. PlpD est vraisemblablement sécrété par un mécanisme original, que nous proposons d'appeler « Système de Sécrétion de Type Vd ».

- Figure 73 -  
Maturation de PlpD



Les souches indiquées ont été cultivées jusqu'en entrée de phase stationnaire de croissance, et les cellules ont été analysées par SDS-PAGE et immunodétection de PlpD avec l'anticorps  $\alpha$ -PlpD. L'équivalent de 0,5 et 5 UDO<sub>600</sub> a été chargé pour les cellules et les surnageants respectivement. C pour cellules; SN pour surnageants de culture. Les tailles sont en kDa.



- Figure 74 -  
PlpD est une lipase

(A) PlpD<sub>His6</sub> produit chez *E. coli* à partir du vecteur pET22b, après induction de l'expression du gène par ajout de 0,4mM d'IPTG. Des échantillons sont préparés à 0 et 2h d'expression, analysés sur SDS-PAGE 10%, et révélés au bleu de Coomassie. Les tailles sont indiquées en kDa.

(B) Mesure de l'activité phospholipase de PlpD, par mesure du relargage du *pNP* dans le milieu après ajout de lysat de bactéries *E. coli* transformées avec le vecteur pET22b-*plpD*. Le *pNP* relargué est dosé à 410 nm. LipA est utilisé comme contrôle positif.

### I.2.5. Son clivage fait intervenir une protéase inconnue

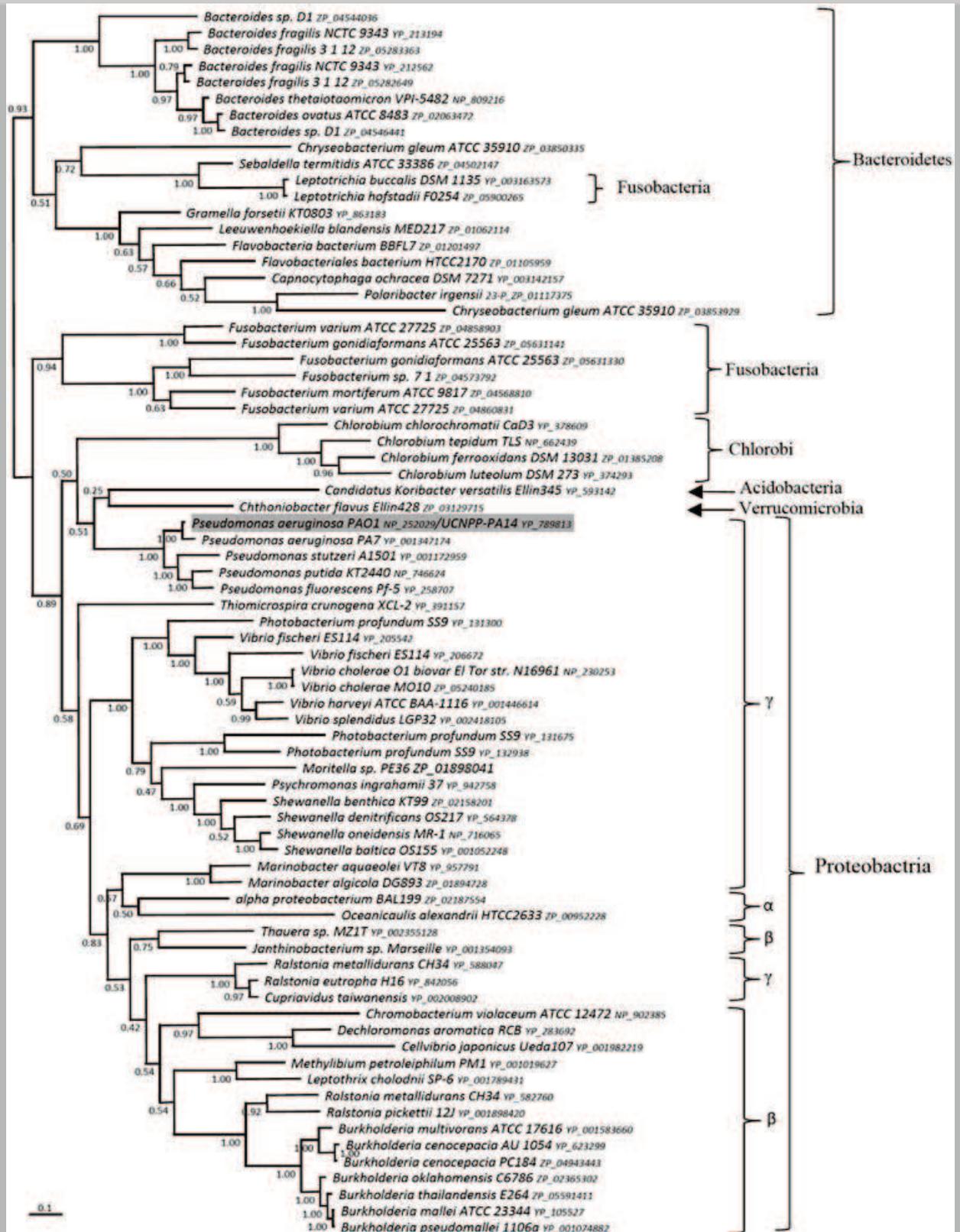
Nous avons alors voulu déterminer quelle était la protéase responsable du clivage de PlpD. Deux candidats ont retenu notre attention. Le premier est la protéine OprD, une protéase de membrane externe (Yoshihara *et al.*, 1996), le second est SprS (PA3535 chez PAO1), qui est un AT prédit de la souche PAO1, qui posséderait une activité protéase (Hardie *et al.*, 2009). Nous avons utilisé des mutants d'insertion des gènes codant ces protéines dans la souche PA14 de *P. aeruginosa* (Liberati *et al.*, 2006), qui sécrète aussi PlpD. L'interruption des cadres ouverts de lecture relatifs à ces deux protéases n'a aucun effet sur le clivage opéré sur PlpD, indiquant qu'aucune de ces deux protéases n'est vraisemblablement responsable de la maturation de PlpD (Fig.73).

### I.2.6. PlpD est une lipase

Les PLPs, ExoU comprise, sont des protéines possédant une activité lipolytique, et en particulier de type phospholipase. Pour tester d'éventuelles propriétés enzymatiques de PlpD, des lysats d'*E. coli* surproduisant PlpD ont été ajoutés sur du *p*-nitrophényl palmitate (*p*NPP), un substrat synthétique des protéines à activité lipolytique. Cette expérience a été menée chez *E. coli* pour ne pas avoir un bruit de fond trop important chez *P. aeruginosa*, qui sécrète d'autres enzymes lipolytiques. Le clivage du *p*NPP entraîne le relargage d'un acide palmitique, et du *p*NP, qui peut être dosé par colorimétrie. Au temps 2h d'induction d'expression du gène *plpD*, on observe une activité lipase, non détectée avec le vecteur vide contrôle, ou en absence d'induction d'expression (temps 0h) (Fig.74). Ceci montre clairement que PlpD possède tout comme ExoU une activité lipase. En revanche il est intéressant de noter que cette activité ne requiert aucun cofacteur eucaryote comme c'est le cas pour ExoU, illustrant ici une autre différence entre ces deux protéines.

### I.2.7. Le SST5d : un système dédié ?

PlpD représente donc le premier exemple d'une nouvelle voie de sécrétion. Nous avons voulu savoir si elle était unique, ou s'il existait d'autres protéines possédant la même architecture : peptide signal – domaine sécrété – transporteur de type TpsB (POTRA +



- Figure 75 -

### Distribution Bayésienne des transporteurs de type P1pD

Distribution bayésienne de 75 transporteurs de type P1pD (analysés sur 209 positions). Les nombres sont des probabilités postérieures bayésiennes. L'échelle représente le nombre de changement estimé par position pour une unité de longueur de branches.

tonneau de 16 brins). Nous avons donc cherché des homologues de PlpD sur le site du NCBI, en ne retenant que les protéines ayant cette organisation. Nous avons identifié plus de 130 protéines possédant exactement cette architecture, et plus de 100 protéines ayant la même organisation, à l'exception du domaine POTRA. Mais l'absence de prédiction de ce domaine sur ces protéines ne signifie pas qu'il ne soit pas présent dans la mesure où la séquence des domaines POTRA est extrêmement dégénérée, elle est donc difficile à identifier par des annotations automatiques.

On retrouve ainsi près de 240 protéines qui pourraient être sécrétées par ce nouveau système de sécrétion, chez des espèces ayant une relation avec un hôte (pathogènes, symbiotes, commensales) mais aussi chez des bactéries environnementales. Elles sont réparties principalement dans quatre *phyla* (protéobactéries, bactéroïdètes, fusobactéries, chlorobi) (Fig.75), au sein desquels elles ne sont trouvées que dans peu de lignées (par exemple, dans 43 génomes de protéobactéries, sur 239 génomes séquencés). Ceci laisse penser que l'acquisition de ces gènes est probablement un évènement de transfert horizontal. Cette hypothèse est supportée par le faible nombre de niches dans lesquelles on retrouve des bactéries qui possèdent un de ces homologues de PlpD. En effet, ces bactéries sont principalement des organismes vivant chez un animal (tractus respiratoire ou intestinal), dans des milieux marins, ou des milieux aqueux pollués.

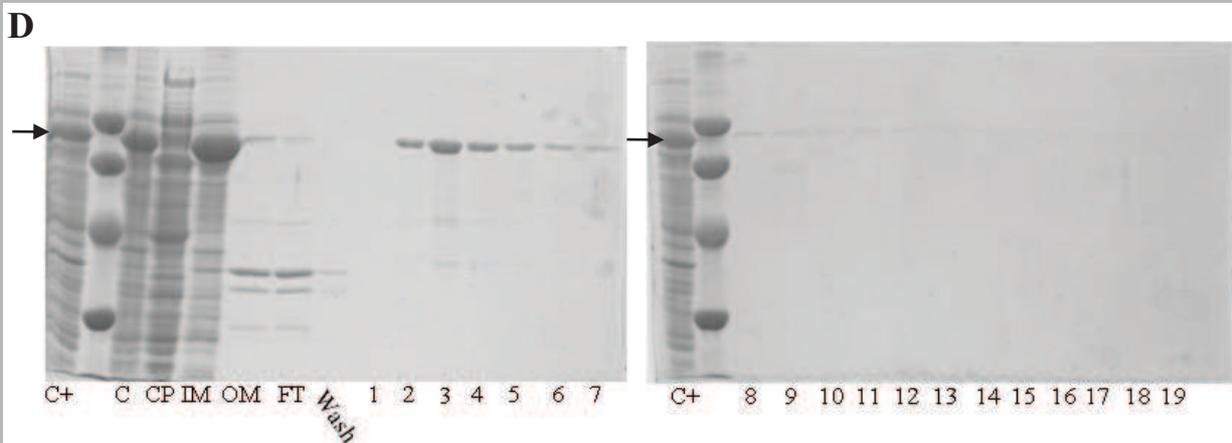
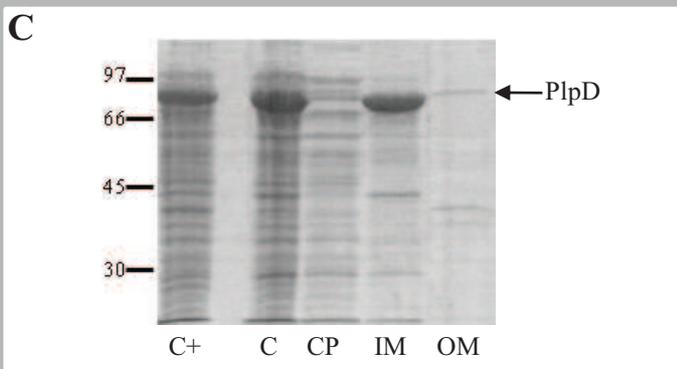
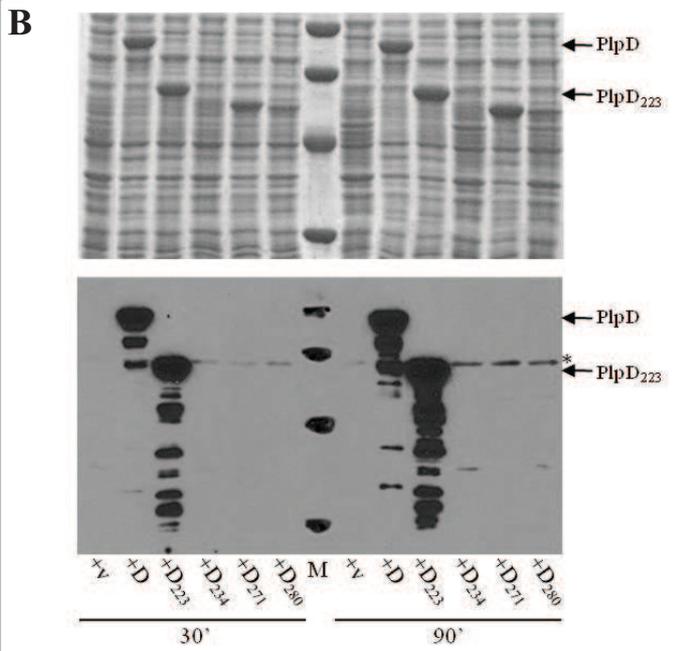
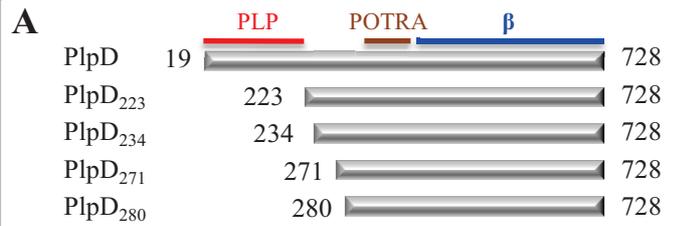
Il est aussi très intéressant de noter que dans notre recherche de protéines possédant un TpsB fusionné à un autre domaine, nous n'avons retrouvé que des protéines dont le domaine sécrété putatif est un domaine patatine. A priori, on pourrait s'attendre à rencontrer des protéines avec des domaines porteurs d'activités différentes fusionnés avec un TpsB. Ceci rappelle le cas des TAAs, qui ne sont que des adhésines. Ce mode de sécrétion constitue peut-être une mode de sécrétion dédié, comme c'est le cas pour les TAAs.

### **I.3. Caractérisation du domaine transporteur de PlpD**

#### **I.3.1. Structure**

PlpD constitue un exemple unique de transporteur où un TpsB est fusionné au domaine dont il assure la sécrétion. Cette protéine est intéressante au niveau structural car elle

- Figure 76 -  
Purification de PlpD



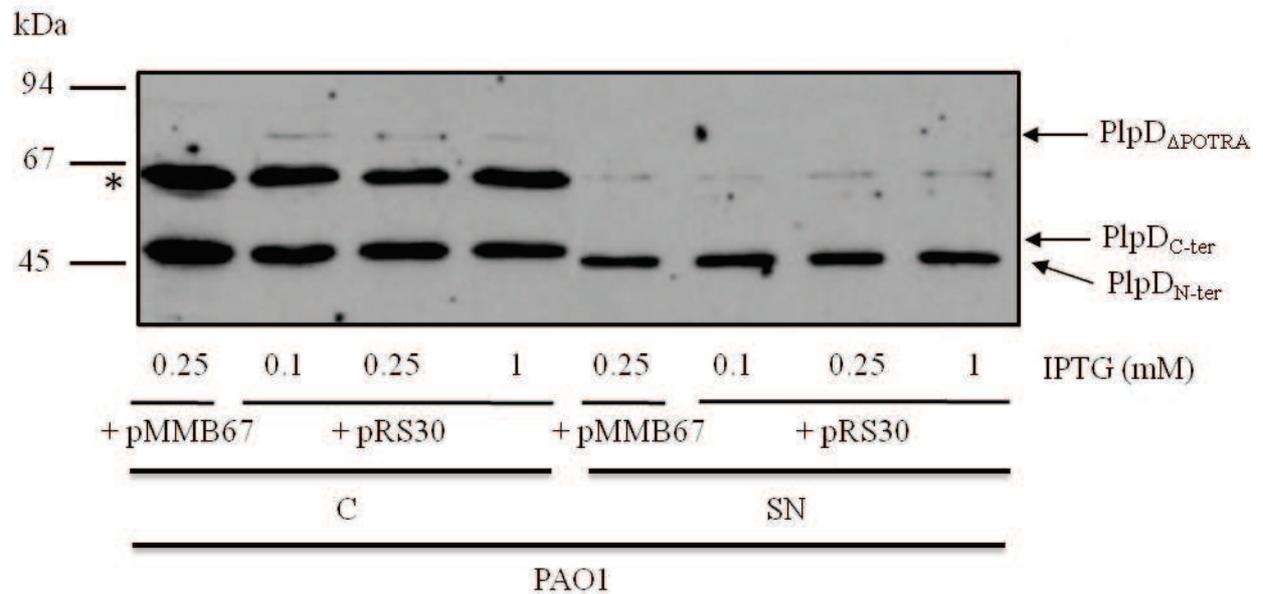
(A) Constructions utilisées pour les essais de purification de PlpD chez *E. coli*. (B) Production des différentes formes de PlpD chez *E. coli* C43, après induction de l'expression par ajout de 2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  d'AHT pendant 30 et 90 minutes. Les cellules sont lysées par presse de French et les lysats cellulaires sont analysés sur SDS-PAGE 10% et révélés au bleu de Coomassie (en haut), ou au moyen d'un anticorps  $\alpha$ -PlpD polyclonal (en bas). +v pour le vecteur vide (pASK); l'astérisque indique une bande aspécifique reconnue par l'anticorps; M représente la gamme de poids moléculaire (97, 66, 45, et 30 kDa). Seules PlpD et PlpD<sub>223</sub> sont produites. (C) L'enveloppe et les compartiments solubles des cellules d'*E. coli* surproduisant PlpD pendant 120 minutes, sont séparés par ultracentrifugation après lyse par presse de French, du SLS 2% est utilisé pour solubiliser et récupérer par ultracentrifugation les protéines de MI, et du DDM 1% pour les protéines de ME. Les échantillons sont analysés par SDS-PAGE 10% et colorés au bleu de Coomassie. C+ pour contrôle positif de taille; C pour cellule totale; CP pour cytoplasme/périplasm; IM pour membrane interne; OM pour membrane externe; (D) Purification de PlpD sur colonne d'affinité pour la streptavidine. Les cellules sont préparées comme précédemment, et au final, la fraction ME est utilisée pour réaliser la purification. C+, C, CP, IM, OM: identique au (C); FT pour flow through; 1-19 pour les fractions n°1 à 19; wash pour lavage; la flèche indique PlpD.

pourrait notamment révéler si le repliement adopté par le domaine C-terminal de PlpD est identique à celui observé chez les TpsB conventionnels. D'autre part, concernant le repliement particulier des domaines sécrétés par le SST5, s'il s'avère que la structure du domaine passager est globulaire (comme nous l'avons modélisée), cela constituerait le deuxième exemple de domaine sécrété par un SST5 qui ne soit pas de type hélice  $\beta$  (après EstA (van den Berg, 2010)). Enfin, la structure du domaine patatine de PlpD constituerait la deuxième structure cristallisée de patatine (en général), et surtout, elle serait la première d'une PLP bactérienne. Ceci nous a conduits à initier une collaboration avec le Dr Han Remaut de l'Université Libre de Bruxelles (VIB/VUB) pour déterminer la structure de PlpD par cristallographie.

Dans la mesure où le site précis de clivage n'est pas connu, différentes constructions dans lesquelles le domaine C-terminal est plus ou moins long ont été générées par PCR (Fig.76A) et introduites dans un vecteur pASK (IBA GO) sous le contrôle d'un promoteur *tet* inductible à l'anhydrotétracycline (AHT). Un épitope streptavidine a été rajouté à l'extrémité N-terminale, ainsi qu'un site de clivage à la thrombine. De plus, le peptide signal naturel de PlpD a été retiré et remplacé par celui de la protéine DsbA. Nous avons réalisé les tests de production et de localisation de ces constructions. Seules la protéine entière et la construction PlpD<sub>223</sub> (des résidus 223 à 728) sont produites et reconnues par l'anticorps anti-PlpD chez *E. coli* (Fig.76B). Elles sont toutes les deux très majoritairement localisées dans la membrane interne, comme nous l'avons déjà observé précédemment. Mais à partir de ce vecteur, qui permet d'augmenter considérablement la production, il est possible d'observer une petite fraction de PlpD localisée dans la membrane externe, non clivée (Fig.76C).

Pour obtenir une structure qui soit le plus proche possible des conditions physiologiques de PlpD produite chez *P. aeruginosa*, nous avons décidé de purifier PlpD à partir de la fraction de membrane externe, et ce avec la forme entière de PlpD puisque nous en avons la possibilité. Cela présentera aussi peut-être l'avantage d'obtenir la première structure d'une PLP bactérienne, et surtout, d'observer comment sont connectés les deux modules (le transporteur et celui sécrété) avant le clivage.

La purification réalisée sur colonne de streptobiotine (affine pour la streptavidine) a permis d'enrichir de manière très significative la fraction membrane externe en PlpD (Fig.76D). Ces échantillons ont ensuite été envoyés à l'équipe du Dr Remaut où, avant d'être utilisés pour trouver les conditions de cristallisation, ils ont subi une dernière étape de



- Figure 77 -

### Rôle chaperon du domaine POTRA chez PIPD?

Les souches sauvages PAO1 de *P. aeruginosa* transformées avec le vecteur vide (+pMMB67) ou avec le PRS30, ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance. L'expression du gène *plpD* $\Delta$ POTRA sur le plasmide a été induite par ajout d'IPTG aux concentrations indiquées, pendant 90 minutes. Les cellules (C) et les surnageants de culture (SN) ont été analysés par SDS-PAGE 10% et révélés par immunodétection avec l'anticorps polyclonal  $\alpha$ -PIPd. L'astérisque représente une bande aspécifique reconnue par l'anticorps. L'équivalent de 0,1 et 1 UDO<sub>600</sub> a été déposé pour les cellules et les surnageants de culture respectivement.

purification par « Gel filtration » (tamisage moléculaire) qui va séparer les produits selon leurs tailles.

### I.3.2. Un rôle chaperon ?

Le domaine POTRA est un domaine impliqué dans l'interaction protéine-protéine entre le TpsB et son TpsA correspondant, ou entre la protéine BamA et une protéine qui doit être insérée dans la membrane externe. Dans le cas présent, la sécrétion du domaine patatine ne requiert pas le recrutement du domaine C-terminal, puisqu'ils sont tous deux sur un même polypeptide. Quelle pourrait donc être la fonction du domaine POTRA dans ce mécanisme ? C'est pour répondre à cette question que nous avons généré une construction du gène *plpD* dans laquelle la région codant le domaine POTRA a été retirée (*plpD<sub>ΔPOTRA</sub>*). Nous avons ensuite cloné cette construction dans un vecteur navette sous le contrôle d'un promoteur *tac* inductible à l'IPTG (pRS30), et ce vecteur a été conjugué chez la souche sauvage de *P. aeruginosa*. Après induction de l'expression de ce variant par l'ajout d'IPTG, les échantillons cellulaires et les surnageants de culture sont prélevés et analysés comme précédemment décrit (voir *Matériels & Méthodes*). La production en *trans* de PlpD<sub>ΔPOTRA</sub> ne perturbe ni la production naturelle de PlpD, ni sa sécrétion (Fig.77). En revanche, la protéine PlpD<sub>ΔPOTRA</sub> n'est plus sécrétée. On détecte en effet une bande dans les cellules aux environs de 74 kDa, ce qui très proche de la taille de PlpD<sub>ΔPOTRA</sub> non clivée (69,8 kDa) et exclut donc la sécrétion du domaine patatine. La perte du domaine POTRA entraîne visiblement un problème de clivage de la protéine. Cette expérience nous montre également que la protéine est très faiblement détectée en l'absence du domaine POTRA, peut-être en raison d'une plus grande instabilité.

## I.4. Discussion

### I.4.1. PlpD est sécrétée par un système original : le SST5d

ExoU, et VipD sont deux PLPs bactériennes qui ont la particularité d'être injectées dans le cytosol eucaryote. ExoU utilise le SST3, alors que VipD utilise le SST4b. La présence d'un domaine patatine (un domaine de nature eucaryote) sur ces deux protéines est

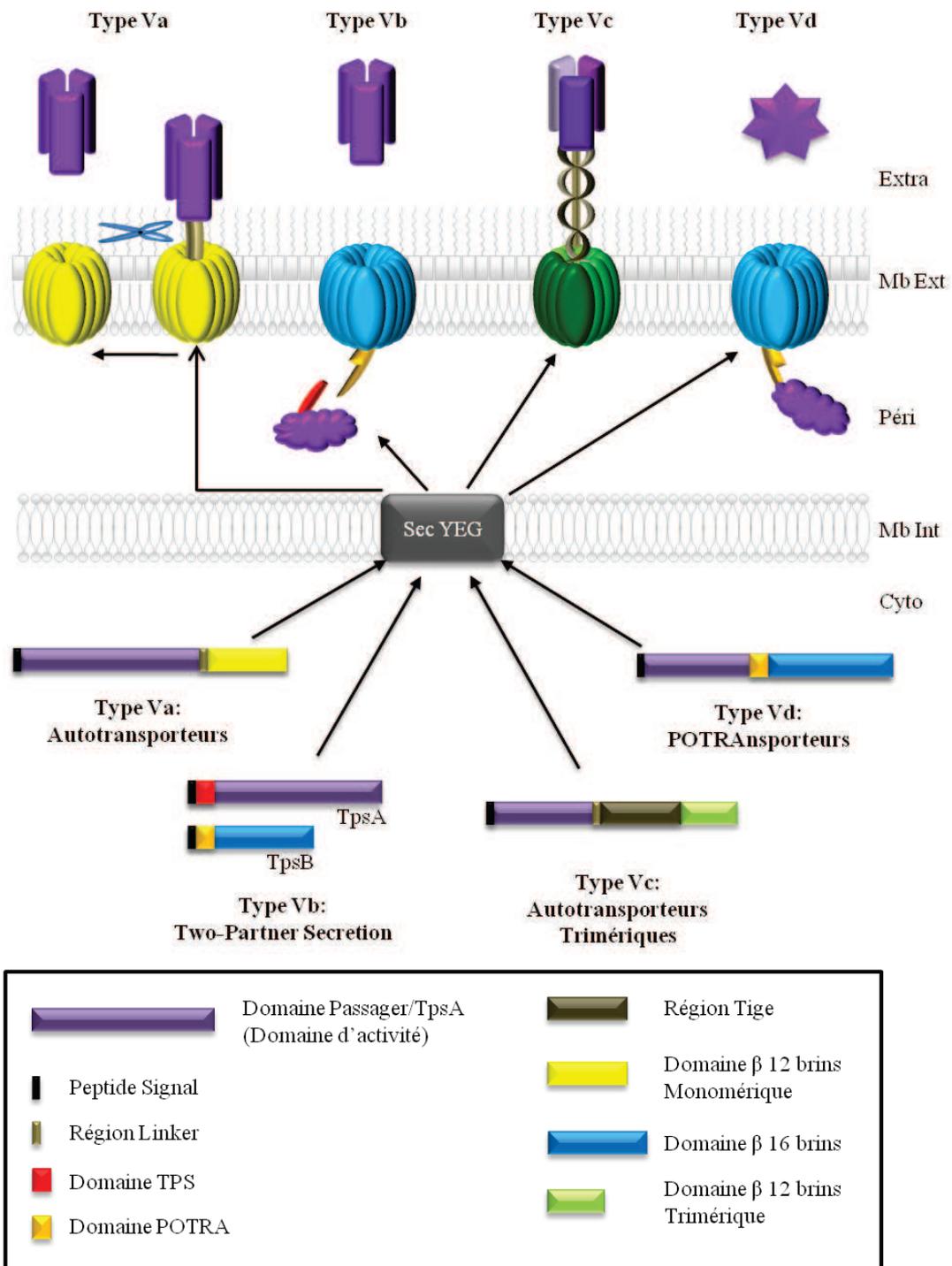


concordante avec la localisation finale de ces protéines. De cette façon, la bactérie produit des armes capables d'aller directement interagir avec les défenses, voies de signalisation ou autres processus de son hôte. Il est donc cohérent non seulement de trouver des protéines avec de tels motifs, mais en plus qu'elles soient sécrétées et injectées.

Une observation rapide de PlpD indique qu'elle ne peut emprunter une voie semblable à celle d'ExoU, puisqu'elle possède un peptide signal (ce qui exclut de fait le SST3, ou un éventuel SST4, comme pour VipD, qui n'aurait pas encore été découvert chez *P. aeruginosa*). Nos analyses *in silico* et les données que nous avons obtenues expérimentalement démontrent toutefois que PlpD est une protéine sécrétée dans le milieu extracellulaire. Par contre, le mode de sécrétion qu'elle emprunte est inattendu et original. En effet, son architecture suggère à première vue un mécanisme de type AT, puisque l'on observe que le domaine patatine sécrété est fusionné à un tonneau  $\beta$ . Cependant, il ne peut s'agir d'un mécanisme de sécrétion de type AT car le domaine  $\beta$  est prédit pour être composé de 16 brins, ce qui est caractéristique des TpsB (ceux des ATs sont constitués de 12 brins), tout comme la présence d'un domaine POTRA qui précède le tonneau.

D'autres indications soutiennent le fait que la sécrétion de PlpD ne soit pas conciliable avec un modèle AT. Bien que dans mon introduction bibliographique j'ai fait ressortir qu'il était difficile d'établir des règles générales quant à l'état de repliement des protéines sécrétées par le SST5, jusqu'à l'étude récente de Choi et collaborateurs (Choi & Bernstein, 2010), il semblait que la plupart des TPS ne subissaient pas de repliement dans le périplasma, contrairement aux ATs. Les TPS permettraient donc une sécrétion plus rapide, ne laissant pas le temps au TpsA d'entamer son repliement. Cette différence venait donc conforter notre conviction que PlpD est constitué d'un transporteur de type TpsB plutôt qu'AT. De plus, nous avons montré que PlpD est active malgré l'absence d'un cofacteur et même sous forme non clivée. Or les lipides membranaires de la bactérie sont des substrats putatifs de PlpD. La sécrétion de PlpD par un transporteur de type TpsB (qui ne laisserait pas assez de temps pour initier le repliement) serait donc le mécanisme mis en jeu ici pour éviter que cette protéine n'exerce son activité contre son propre organisme. On peut noter d'ailleurs que VipD et ExoU sont sécrétées par des systèmes (SST4 et SST3 respectivement) qui évitent à ces protéines de rencontrer les membranes.

En définitive, il semble plus cohérent ou approprié de proposer que cette protéine soit le fruit d'une fusion d'un domaine patatine et d'un TpsB. Un tel mécanisme est d'ailleurs



- Figure 78 -

### Le Système de Sécrétion de Type V

PlpD est donc sécrétée par le SST5d, que nous proposons d'appeler « POTRAtransporteur ». Dans ce cas, un transporteur de type TpsB est fusionné à un domaine passager, dépourvu de domaine TPS. Dans ce schéma, le domaine sécrété du SST5d est représenté différemment des autres SST5, car pour l'heure, seuls des domaines PLP ont été retrouvés potentiellement sécrétés par cette voie, or ils ne forment pas d'hélice  $\beta$  comme pour la plupart des substrats du SST5a, b ou c. (Actualisation de la Figure 34)

considéré comme étant à l'origine des ATs : en effet il est proposé que ces protéines apparaissent par fusion d'une protéine  $\lambda$  et d'une protéine de type tonneau  $\beta$  de 12 brins (Davis *et al.*, 2001; Henderson *et al.*, 2004; Yen *et al.*, 2002). Il est donc possible d'imaginer un tel mécanisme pour PlpD : un TpsA de type patatin-like aurait fusionné avec son TpsB. Cependant, un élément va à l'encontre de cette théorie. Les TpsA possèdent sur leur extrémité N-terminale un domaine TPS, qui permet l'interaction avec le domaine POTRA du TpsB. Ce domaine TPS est absent de PlpD. Evidemment, on peut aussi conjecturer que dans une telle situation une interaction supplémentaire entre les domaines N- et C-terminaux est superflue, ce qui pourrait avoir conduit à la non conservation de ce domaine TPS au cours de l'évolution de cette protéine. On peut d'ailleurs noter à cet effet que bien que les TpsB possèdent deux domaines POTRA, le domaine C-terminal de PlpD n'en possède qu'un.

Il est donc clair que PlpD possède de nombreux points communs avec les ATs, et avec les TPS, mais qu'elle n'appartient à aucune de ces deux catégories. C'est la raison pour laquelle nous proposons de positionner PlpD dans une nouvelle branche du SST5, qui serait donc le SST5d, que nous proposons d'appeler « POTRAnseurs » (Fig.78).

Grâce à l'analyse phylogénétique que nous avons menée, nous avons pu observer que les seules protéines qui possèdent une architecture de type « domaine enzymatique-domaine de type TpsB » sont des protéines avec un domaine patatine. Il semble donc que le SST5d soit dédié à des domaines PLP, à l'image des TAAs qui sont dédiés à la sécrétion des adhésines. Cette branche constituerait alors un cas unique dans le SST5, en ne sécrétant que des protéines de type globulaires, puisque la vaste majorité des protéines sécrétées par ce système sont prédites pour former des hélices  $\beta$ .

#### I.4.2. Son domaine POTRA assurerait un rôle de chaperon intramoléculaire

Une autre question se pose alors. Si on considère que le domaine TPS n'a pas été conservé en raison de son inutilité, pour quelle(s) raison(s) un domaine POTRA (et un seul) a-t-il été conservé ? L'interaction physique avec le domaine TPS étant déjà devenue dispensable, il n'a plus son partenaire dans la protéine PlpD. La raison de sa conservation est une question qui reste ouverte, mais plusieurs hypothèses sont envisageables. La première est qu'il puisse avoir un rôle réminiscent du recrutement du TpsA. PlpD est une protéine clivée



au cours de sa sécrétion. La protéase qui mature PlpD pourrait être alors recrutée par une interaction physique avec le domaine POTRA, ce qui pourrait particulièrement être envisageable s'il s'agit d'une protéase de membrane externe. En effet, les protéines de membrane externe sont insérées dans leur membrane par BamA, qui possède 5 domaines POTRA. Une hypothèse alternative est que suite au clivage et à la sécrétion du domaine patatine, le domaine transporteur de PlpD puisse permettre la sécrétion d'un TpsA, conventionnel et orphelin. Cette situation serait assez similaire à celle du mécanisme par lequel est sécrété CupB5, un TpsA orphelin : la protéine P-Usher CupB3 dont le rôle est de permettre l'export à la surface d'un *fimbriae* CupB, assure aussi la sécrétion de CupB5 (Ruer *et al.*, 2007). Ceci est permis grâce à son domaine  $\beta$  et son domaine POTRA.

Les résultats que nous avons obtenus en supprimant le domaine POTRA de PlpD montrent malgré tout son caractère essentiel pour la sécrétion puisque l'on observe dans les bactéries la protéine PlpD $_{\Delta}$ POTRA non clivée. Nos résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse d'une activité de chaperonne intramoléculaire. En effet, en plus de la perte de la sécrétion, la délétion de ce domaine s'accompagne d'une production très faible du variant de PlpD, ce qui pourrait indiquer une augmentation de son instabilité. En accord avec ceci, il a été proposé que le domaine POTRA joue un tel rôle aussi bien pour les TPS que pour les protéines de la famille de BamA (Sanchez-Pulido *et al.*, 2003). De manière intéressante, il a été montré que chez l'AT BrkA de *B. pertussis*, un domaine d'une centaine de résidus, situé juste avant le domaine  $\beta$ , était indispensable à la sécrétion du domaine passager (Oliver *et al.*, 2003). La délétion de ce domaine peut être complétée par sa production *in trans*. Il a donc été proposé que ce domaine ait une activité chaperonne intramoléculaire. Ce domaine est assez bien conservé chez les ATs, et il est probablement structuré en hélice  $\beta$ , ce qui diffère d'un domaine POTRA, dont la structure est établie. Cependant, en termes de fonctionnalité, il est surprenant et intéressant de retrouver sur PlpD un domaine qui pourrait avoir une fonction rencontrée par ailleurs chez un AT.

Il est évidemment impossible d'exclure la possibilité que la délétion du domaine POTRA entraîne une déstabilisation de la protéine en raison d'un mauvais repliement, voire qu'en déléant ce domaine, nous ayons supprimé aussi le site de clivage pour PlpD et que sous cette forme la protéine soit plus instable. Cependant, la délétion que nous avons réalisée a été faite en se restreignant aux bornes du domaine POTRA. Or le domaine POTRA ayant une structure établie, conservée, et ne subissant pas de maturation dans les autres protéines, il est



peu probable que le site de clivage de PlpD soit localisé dans ce domaine. Afin de discriminer cette hypothèse de celle du rôle chaperon, il faudrait effectuer des mutations ponctuelles du domaine POTRA et vérifier le devenir de PlpD. Cependant, cette approche pourrait s'avérer très complexe à mettre en place en raison de la grande variabilité rencontrée dans les séquences des domaines POTRA. Pour exemple, sur PlpD, ce domaine ne possède aucune des deux Glycines relativement bien conservées.

#### I.4.3. PlpD est une lipase, mais elle ne nécessite pas de cofacteur

Puisque cette protéine est sécrétée, il est raisonnable de penser qu'elle remplit une fonction profitable à la bactérie. Nous avons démontré qu'elle possédait une activité lipolytique, et en particulier une activité lipase, de manière similaire à ExoU. En revanche, une énorme différence apparaît ici entre ces deux protéines, puisqu'aucun cofacteur eucaryote n'est requis pour l'activité de PlpD, comme c'est aussi le cas pour la PLP MXAN\_3852 de *M. xanthus*. Ceci pourrait sembler surprenant de prime abord, mais le fait de rencontrer des protéines homologues à PlpD (avec la même organisation architecturale) chez des espèces environnementales suggère que cette protéine et ses homologues ne sont finalement peut-être pas dédiés au processus de virulence de la bactérie. De plus, cette protéine n'est pas injectée dans le cytosol de la cellule hôte, à *contrario* de VipD et ExoU, ce qui constitue une autre différence majeure entre ces protéines.

Cela pose la question de la pertinence de tels motifs sur une protéine qui n'aurait finalement pas l'hôte comme cible. Il ne faut néanmoins pas oublier que PlpD est une phospholipase, et en tant que telle, elle pourrait tout exercer son activité sur les phospholipides membranaires constituant la membrane plasmique de la cellule eucaryote. Dans de telles conditions, en agissant depuis l'extérieur de la cellule, ne pas recourir à un cofacteur extérieur, et posséder des motifs eucaryotes aurait un sens.

Il semble donc qu'on puisse bâtir des hypothèses (qui nécessiteront bien évidemment confirmation) répondant à certaines interrogations soulevées par l'absence d'injection de PlpD. Cependant, nous ne tenons pas à définitivement exclure que PlpD puisse avoir une action intracellulaire. En effet, une étude menée sur l'AT EspC d'*E. Coli* nous indique qu'un substrat du SST5 peut accéder au cytosol de l'hôte, grâce à une coopération avec le SST3 de cette bactérie (Vidal & Navarro-Garcia, 2008). Il a été démontré que l'internalisation d'EspC,



nécessaire à son activité cytotoxique (dommages causés au cytosquelette), fait appel à une machinerie de type III fonctionnelle. Il est possible alors d'imaginer un tel phénomène avec PlpD, qui lui permettrait d'être injectée, et active de l'intérieur, sans pour autant avoir besoin d'être activée par un cofacteur. Il est en outre envisageable que dans ces conditions (dans le cytosol de la cellule eucaryote), l'activité de PlpD soit potentialisée par la présence d'un cofacteur, ce qui démontrerait que l'activité que nous avons observée ne serait alors que le niveau résiduel de PlpD.

#### I.4.4. Une forte représentation dans certaines niches précises

L'analyse phylogénétique que nous avons menée met en évidence que des homologues de PlpD sont retrouvés chez des bactéries environnementales et chez des bactéries en contact avec un hôte. L'étude un peu plus précise des différentes niches écologiques dans lesquelles vivent ces bactéries indique qu'elles sont assez proches. On retrouve des bactéries vivant dans un tractus intestinal ou pulmonaire, pour les bactéries en contact, et des bactéries plutôt aquatiques pour les environnementales. Le plus souvent, ces bactéries vivent dans des milieux à tendance extrêmes : ce sont soit des bactéries retrouvées dans les profondeurs marines, ou au niveau des cheminées, soit des bactéries isolées dans des eaux polluées bordant des usines ou des eaux de rejet d'égouts.

Cette analyse met aussi en avant la probable dissémination de ce gène par le moyen de transferts horizontaux. Dans de telles circonstances, il apparaît plausible que la force de sélection qui permet le transfert et la conservation des homologues de cette protéine soit liée au caractère difficile de ces niches, procurant ainsi un avantage sélectif à la bactérie. Cette hypothèse est intéressante dans la mesure où le rôle premier des patatines végétales est de permettre aux végétaux une meilleure résistance au stress et aux infections. Il est possible d'imaginer que chez les bactéries aussi, ce rôle ait été conservé. Il serait alors intéressant de savoir si ses fonctions enzymatiques et de stockage de nutriments existent, et le cas échéant, laquelle serait ici responsable de cette éventuelle résistance.



# ARTICLE

---

## « The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein PlpD is the archetype of a novel Type V Secretion System »

**Richard Salacha**, Filip Kovačić, Céline Brochier-Armanet, Susanne Wilhelm, Jan Tommassen, Alain Filloux, Romé Voulhoux, and Sophie Bleves

*Environmental Microbiology*, 2010



# The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein PlpD is the archetype of a novel Type V secretion system

Richard Salacha,<sup>1</sup> Filip Kovačić,<sup>2</sup>  
Céline Brochier-Armanet,<sup>3</sup> Susanne Wilhelm,<sup>2</sup>  
Jan Tommassen,<sup>4</sup> Alain Filloux,<sup>1,5</sup> Romé Voulhoux<sup>1</sup>  
and Sophie Bleves<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires, CNRS-Aix Marseille Université, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France.

<sup>2</sup>Institute for Molecular Enzyme Technology, Heinrich-Heine-University Duesseldorf at FZ-Juelich Stettenericher Forst, D-52426 Juelich, Germany.

<sup>3</sup>Laboratoire de Chimie Bactérienne, CNRS-Aix Marseille Université, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France.

<sup>4</sup>Department of Molecular Microbiology and Institute of Biomembranes, Utrecht University, 3584 CH Utrecht, the Netherlands.

<sup>5</sup>Centre for Molecular Microbiology and Infection, Division of Cell and Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Imperial College London, South Kensington Campus, London SW7 2AZ, UK.

## Summary

We discovered a novel secreted protein by *Pseudomonas aeruginosa*, PlpD, as a member of the bacterial lipolytic enzyme family of patatin-like proteins (PLPs). PlpD is synthesized as a single molecule consisting of a secreted domain fused to a transporter domain. The N-terminus of PlpD includes a classical signal peptide followed by the four PLP conserved blocks that account for its lipase activity. The C-terminus consists of a POTRA (polypeptide transport-associated) motif preceding a putative 16-stranded  $\beta$ -barrel similar to those of TpsB transporters of Type Vb secretion system. We showed that the C-terminus remains inserted into the outer membrane while the patatin moiety is secreted. The association between a TpsB component and a passenger protein is a unique hybrid organization that we propose to classify as Type Vd. More than 200 PlpD orthologues exist among pathogenic and envi-

ronmental bacteria, which suggests that bacteria secrete numerous PLPs using this newly defined mechanism.

## Introduction

Proteins secreted by Gram-negative bacteria are transported across the cell envelope, which is composed of the inner membrane, the peptidoglycan-containing periplasm and the outer membrane. To date, six different secretion pathways have been identified (Economou *et al.*, 2006; Filloux *et al.*, 2008; Michel and Voulhoux, 2009). The Type V secretion system (T5SS) comprises diverse branches, the autotransporter (AT or Type Va and Type Vc) pathway and the two-partner secretion (TPS or Type Vb) pathway. The AT family of secreted proteins are supposedly able to translocate by themselves across the outer membrane (hence their name) (Henderson *et al.*, 2004; Linke *et al.*, 2006; Dautin and Bernstein, 2007). ATs are modular proteins consisting of an N-terminal signal peptide, a C-terminal  $\beta$ -barrel (the  $\beta$ -domain) and, in between, a secreted passenger domain. Depending on the AT, the passenger domain may either remain attached to the transporter domain protruding from the bacterial surface, or be cleaved from the  $\beta$ -domain and released into the extracellular medium. Processing by both exogenous and endogenous proteolytic activities has been reported (Hendrixson *et al.*, 1997; Shere *et al.*, 1997; Coutte *et al.*, 2003; van Ulsen *et al.*, 2003). In contrast to ATs, TPS systems consist of two separate proteins, a TpsB transporter involved in the secretion of the TpsA protein across the outer membrane (Hodak and Jacob-Dubuisson, 2007; Mazar and Cotter, 2007). Like the AT passenger domains, TpsAs are large proteins that remain attached at the cell surface or are released into the extracellular medium. Although the AT pathway is regarded as a variant of the TPS pathway, in which the transported protein and the translocator are connected in a single polypeptide, it should be pointed out that there is no sequence or structural similarities between the  $\beta$ -domains of ATs on the one hand and the TpsB transporters on the other hand. Indeed, while the  $\beta$ -domains of ATs present a 12-stranded  $\beta$ -barrel (Oomen *et al.*, 2004), the TpsBs have a  $\beta$ -barrel with 16  $\beta$ -strands (Clantin *et al.*, 2007; Hodak and Jacob-Dubuisson, 2007). Moreover, the N-terminal portion of TpsBs

Received 12 November, 2009; accepted 22 December, 2009.

\*For correspondence. E-mail bleves@ifr88.cnrs-mrs.fr; Tel. (+33) 491164126; Fax (+33) 491712124.

extends in the periplasm and contains two POTRA (polypeptide transport-associated) domains, one of which is proposed to be involved in the recruitment of the TpsA partner via its N-proximal secretion signal, the TPS domain (Clantin *et al.*, 2004; Hodak and Jacob-Dubuisson, 2007). POTRA domains are also found among other members of the Omp85 protein superfamily to which the TpsB proteins belong, but never in ATs. The Omp85 superfamily includes the Omp85/BamA proteins required for the insertion of  $\beta$ -barrel membrane proteins into the outer membrane of bacteria (Voulhoux *et al.*, 2003; Bos *et al.*, 2007). The periplasmic POTRA domains may have chaperone-like qualities, and together with the  $\beta$ -barrel constitute the functional core of BamA (Bos *et al.*, 2007). Interestingly, the BamA protein has been proposed to insert the  $\beta$ -barrel of the AT into the outer membrane and to transport the passenger domain to the cell surface (Gentle *et al.*, 2005; Hodak and Jacob-Dubuisson, 2007; Jain and Goldberg, 2007), suggesting that the TPS and AT pathways have analogous transporters.

A new family of bacterial lipolytic enzymes, called patatin-like proteins (PLPs), has recently been proposed (Banerji and Flieger, 2004). Patatins represent 40% of total soluble potato tuber proteins and, while they are considered as storage proteins, they show lipid acyl hydrolase activity (Shewry, 2003). Such activity may be considered as a possible defence mechanism against plant pathogens and stress (Dhondt *et al.*, 2000). Potato patatin B2 and human cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) share conserved domains (Hirschberg *et al.*, 2001), including a Serine–Aspartate active-site dyad instead of the more common Serine–Histidine–Aspartate (or Glutamate) triad of lipolytic enzymes (Rydel *et al.*, 2003). In bacteria, genes encoding patatin homologues are highly represented in some animal pathogen and plant pathogen/symbiont genomes, suggesting that they are important during interaction with host (Banerji and Flieger, 2004). The first characterized bacterial PLP was the ExoU protein from the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. ExoU is a substrate for the Type III secretion system (T3SS) of strains PA103 and PA14 and is directly delivered into the cytosol of the eukaryotic cell during the infection process. ExoU is the major cytotoxin secreted by *P. aeruginosa*. It produces rapid cell death (Finck-Barbancon *et al.*, 1997; Hauser *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2003) and is an important virulence determinant in most animal models of infection (Finck-Barbancon *et al.*, 1997; Hauser *et al.*, 1998; Shaver and Hauser, 2004). ExoU cleaves phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine *in vitro* (Sato *et al.*, 2005) and requires eukaryotic superoxide dismutase as a cofactor for its phospholipase A<sub>2</sub> activity (Sato *et al.*, 2006). ExoU is trafficked to the plasma membrane of the host cell where it undergoes

ubiquitinylation, which allows efficient utilization of adjacent substrate phospholipids (Stirling *et al.*, 2006). In *Legionella pneumophila*, four ExoU homologues were found (Vanrheenen *et al.*, 2006) and they were shown to be injected into target cells via a Type IV secretion system (T4SS). In the social bacteria *Myxococcus xanthus*, the MXAN\_3852 protein contains motifs characteristic of patatins. Furthermore, the purified recombinant protein hydrolysed esters of short-chain fatty acids (Moraleda-Munoz and Shimkets, 2007).

It is well known that the *P. aeruginosa* strain PAO1, as well as many other *P. aeruginosa* strains, does not contain the *exoU* gene but instead carries an *exoS* gene encoding another T3SS effector (Wolfgang *et al.*, 2003). The basis for the incompatibility between *exoU* and *exoS* within the same *P. aeruginosa* genome is not known, but the carriage of *exoS* appears more prevalent (Kulasekara *et al.*, 2006).

In this study we identified an ExoU homologue in the PAO1 and PA14 strains of *P. aeruginosa*. This homologue, named PlpD, has a lipase activity and could be secreted into the extracellular medium. Interestingly it has an N-terminal signal peptide and is likely, in contrast to ExoU, T3SS-independent. Instead, we showed that PlpD secretion involves a novel secretion pathway, which is conceptually close to the Type Vb secretion system. Yet, we revealed drastic structural differences that lead us to propose a novel secretion pathway, which we named Type Vd.

## Results

### *PA3339 encodes a patatin-like protein*

We used the ExoU amino acid (aa) sequence to perform a BLAST search on the *P. aeruginosa* PAO1 proteome and to identify putative PLPs. The results obtained revealed that the PA3339 protein (GI:15598535) shares 40% of similarity and 25% of identity with ExoU within its N-terminal domain (between residues 23 and 216). PA3339 is a protein of 728 residues, with a predicted molecular weight of 80 899 (Fig. 1A). A Pfam domain search identified a patatin-like domain (PF01734) between residues 27 and 220, within the N-terminal part of PA3339. Usually, bacterial PLPs possess the three conserved domains (blocks I, II and IV) of potato patatin B2 (Banerji and Flieger, 2004) and an additional motif, named block III. Each of these conserved domains is present in the protein coded by *pa3339* (Fig. 1A). In Fig. 1B, we show the alignment between the PA3339 blocks with those of three other bacterial PLPs, namely ExoU from *P. aeruginosa* PA103, VipD from *L. pneumophila* and MXAN\_3852 from *M. xanthus*. Block I consists of a Glycine-rich region containing a conserved basic

residue, Arginine or Lysine (Arg<sub>35</sub> in PA3339), which probably serves as an oxyanion hole. Block II is located 10–20 aa downstream block I and comprises a typical lipase motif Gly-X-Ser-X-Gly with the putative active-site Serine (Gly<sub>58</sub>-X-Ser<sub>60</sub>-X-Gly<sub>62</sub>) (Arpigny and Jaeger, 1999). Block III contains a conserved Serine (Ser<sub>188</sub>), which may be an important structural element. Block IV contains the active-site Aspartate (Asp<sub>207</sub>) residue that, together with the active-site Serine, forms the catalytic Serine–Aspartate dyad. Finally, the highly conserved Proline residues in blocks III and IV (Pro<sub>192</sub> and Pro<sub>215</sub>) may be important for the proper conformation of the protein. Based on these observations, we concluded that PA3339 belongs to the PLP family and we designated this protein PlpD for Patatin-like protein D.

#### *PlpD harbours a C-terminal TpsB-like domain*

Interestingly, in contrast to ExoU, PlpD is predicted to contain a type I N-terminal signal peptide when using the PSORTB (Gardy *et al.*, 2003) or SignalP softwares (Nielsen *et al.*, 1997; Bendtsen *et al.*, 2004) (Fig. 1A). Moreover, two Pfam domains could be identified within the C-terminal domain of PlpD. First a POTRA motif from the surface Ag VNR family (PF07244) is located between residues 333 and 404 (Fig. 1A). Second, a bacterial surface Ag domain (PF01103) is located immediately downstream of the POTRA domain, between residue 404 and the C-terminal residue of PlpD. Both domains are typically found in BamA proteins as well as in TpsB proteins (Gentle *et al.*, 2005). Secondary structure predictions of the PlpD POTRA domain indicate three  $\beta$ -strands with a pair of  $\alpha$ -helices (order is  $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ ), in agreement with the POTRA domain fold of BamA (formerly known as YaeT) from *Escherichia coli* (Kim *et al.*, 2007) (Fig. 1C). The DYF aa sequence (highlighted in Fig. 1C), which is located within a loop between the second  $\alpha$ -helix and the second  $\beta$ -strand of PlpD, aligns with the GYF aa signature of the POTRA sequence family. An in-depth analysis of the last 324 C-terminal residues of PlpD, comprising PF01103, using the BOMP server (Berven *et al.*, 2004) and a combination of secondary structure prediction tools (see *Experimental procedures*), predicted 16 putative amphipathic  $\beta$ -strands (shown in black in Fig. 1D) that may form a  $\beta$ -barrel. All together these data suggest that the N-terminal signal peptide of PlpD allows translocation across the inner membrane in a Sec-dependent manner, and PlpD is subsequently inserted in the outer membrane via its C-terminal  $\beta$ -barrel domain. Accordingly, as for most bacterial outer membrane proteins, the last C-terminal amino acid residue of PlpD is a Phenylalanine, which is preceded by a series of hydrophobic residues at positions 5, 7 and 9 from the C-terminus (Fig. 1D) (Struyve *et al.*, 1991). It is worth noting that the PlpD

$\beta$ -barrel (PF01103) is unrelated to the aa sequence motifs found in PF03797 and PF03895, which typically constitute the  $\beta$ -domains of ATs.

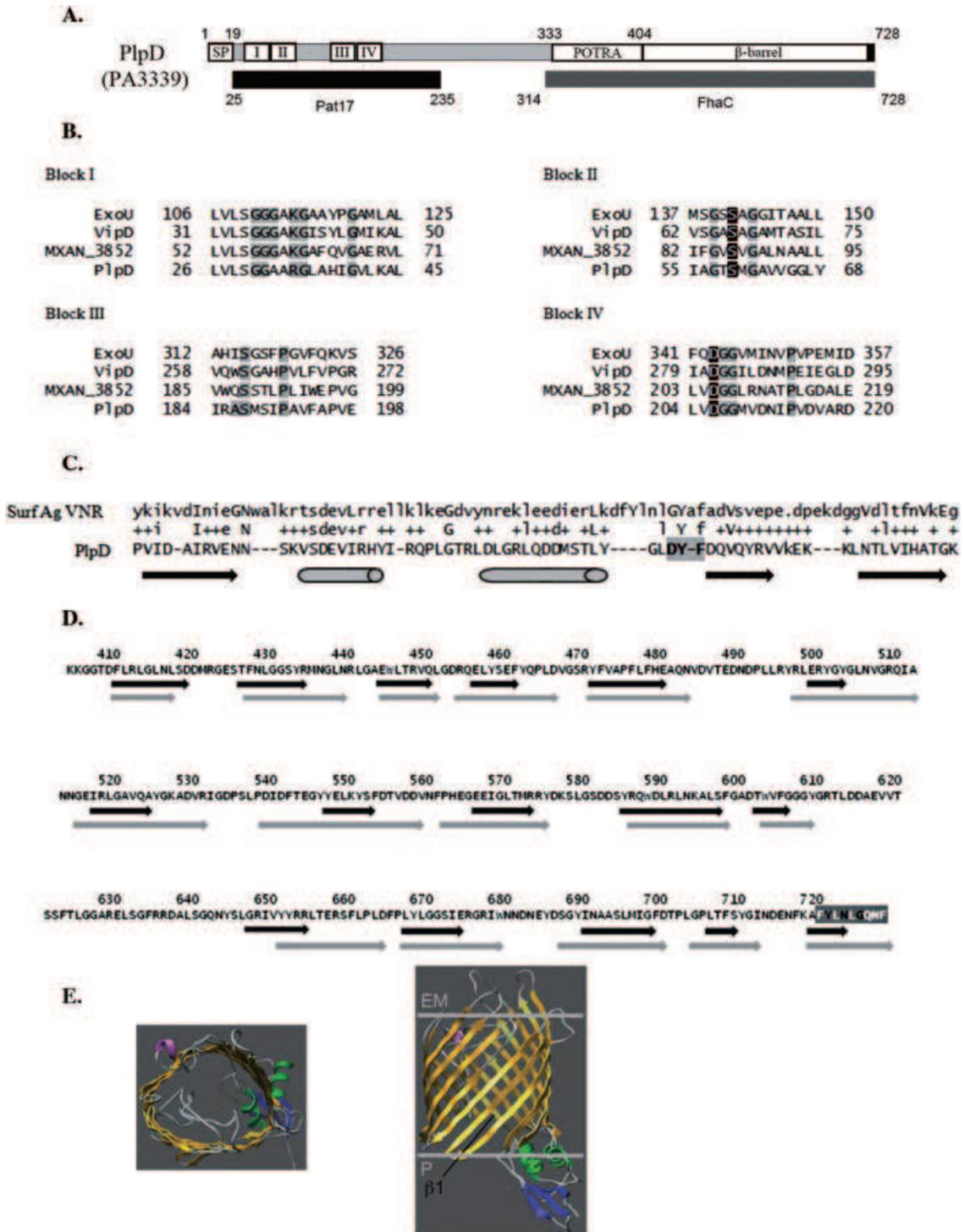
All together these *in silico* data, i.e. (i) a large protein with a signal peptide, (ii) an N-terminal domain with a putative enzymatic activity, and (iii) a putative C-terminal  $\beta$ -barrel domain, suggest that PlpD belongs to the AT family (Type Va). However, since the  $\beta$ -barrel fused with a POTRA domain is similar to a TspB component (Type Vb) we concluded that PlpD might belong to the family of T5SS proteins but of a previously unidentified type.

#### *PlpD structure prediction supports a fold with two independent modules*

The three-dimensional structure of PlpD was predicted by using the Phyre server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>). The results obtained are summarized in Fig. 1A and E and confirmed an organization of PlpD into two modules. The structure of the N-terminal domain of PlpD is predicted according the potato patatin Pat17 (Fig. S1 in *Supporting information*) (Rydel *et al.*, 2003). The C-terminal moiety of PlpD was structured with the TpsB protein FhaC, which mediates the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin (FHA) (Clantin *et al.*, 2007) (Fig. 1E). This domain of PlpD is predicted to form a  $\beta$ -barrel, composed of 16 antiparallel  $\beta$ -strands (shown in yellow in Fig. 1E and in grey in Fig. 1D). The periplasmic side of the barrel consists of the globular POTRA domain, organized as a three-stranded  $\beta$ -sheet and two  $\alpha$ -helices (shown in blue and green in Fig. 1E), confirming the secondary structure prediction (Fig. 1C). In conclusion, we predicted that the C-terminus domain of PlpD is likely a periplasmic POTRA domain and an outer membrane  $\beta$ -barrel. The  $\beta$ -barrel is likely to form a channel in the outer membrane through which the patatin passenger domain can be translocated at the cell surface.

#### *The patatin domain of PlpD is secreted by P. aeruginosa*

In order to study the fate of PlpD in *P. aeruginosa*, we introduced a V5/His<sub>6</sub> tag at the C-terminal end of PlpD. The recombinant gene was cloned in a broad-host-range vector (leading to pRS9) under the control of a *tac* promoter. The pRS9 plasmid was conjugated into the *P. aeruginosa* strain PAO1, and expression of *plpD* was induced with IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) for 1 or 3 h (Fig. 2A). Protein samples from whole cell extracts and from culture supernatants were prepared as usual (Blevés *et al.*, 1999) and subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting using anti-V5 tag antibodies. A protein with an apparent molecular weight of 49 kDa



was specifically recognized in the whole cell fraction (Fig. 2A), while the anti-V5 tag antibodies did not detect any product from the culture supernatants (data not shown). From these results, we concluded that PlpD<sub>V5/His6</sub> is cleaved in *P. aeruginosa*, with the C-terminal V5/His<sub>6</sub> tagged domain remaining associated with the bacterial

cell, presumably with the outer membrane, while the untagged N-terminal domain could not be detected.

To analyse the fate of both PlpD domains, the recombinant PlpD protein produced in *E. coli* was purified and used to raise a polyclonal antiserum (see *Experimental procedures*). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 was grown

**Fig. 1.** PlpD (PA3339) sequence analysis.

A. Schematic representation of PlpD domains: the N-terminal signal peptide (SP), the central passenger domain in which the four bacterial patatin-like blocks are shown (I, II, III and IV), and the TpsB-like  $\beta$ -domain with a POTRA motif preceding a  $\beta$ -barrel with the OMP signature indicated by a black box. The patatin-like domain and the TpsB-like  $\beta$ -domain are homologous to Pat17 patatin and the TpsB FhaC proteins respectively. The numbers indicate the amino acid position in the sequence.

B. The patatin blocks. Alignment of the N-terminal domain of PlpD with conserved bacterial patatin block domains from ExoU of *P. aeruginosa*, VipD of *L. pneumophila*, MXAN\_3852 of *M. xanthus*. Shown on grey background are identical amino acids; residues necessary for catalytic activity are white on a black background. The numbers between blocks indicate the numbers of amino acids preceding or following the conserved blocks.

C. The POTRA motif. Alignment of amino acids 333–404 of PlpD with the surface Ag VNR POTRA sequence. Predicted  $\beta$ -strands and  $\alpha$ -helices are indicated with arrows and cylinders, respectively, under the sequence.

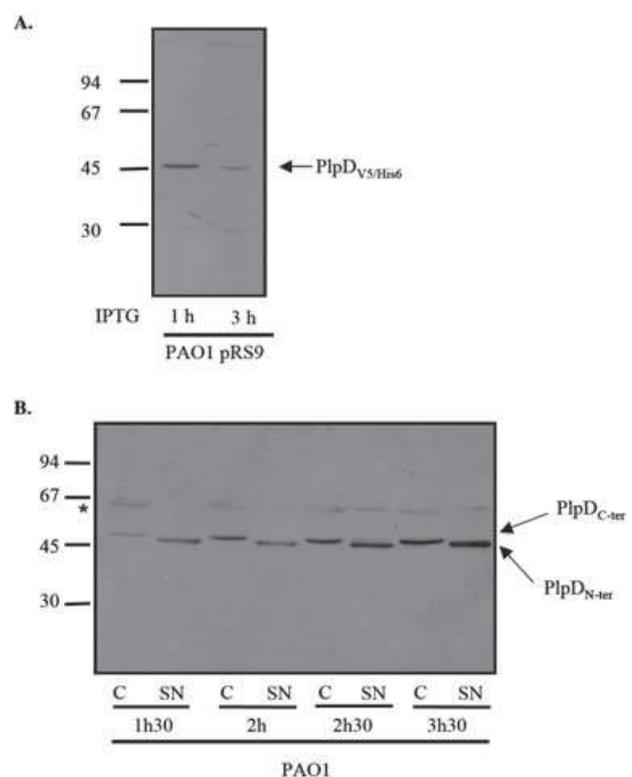
D. The  $\beta$ -barrel. Predicted  $\beta$ -strands are indicated with black arrows under the C-terminal sequence of PlpD, and the OMP signature in white on a grey background. Putative  $\beta$ -strands from the tertiary structure predictions (from E) are shown with grey arrows.

E. PlpD tertiary structure prediction. The C-terminal part of PlpD (residues 333–728) can fold as the  $\beta$ -barrel of the TpsB/FhaC protein from *B. pertussis*, preceded by the POTRA domain.  $\beta$ -Strands and helices of POTRA motif are shown in blue and green, respectively, and  $\beta$ -strands of the  $\beta$ -barrel in yellow. The outer membrane is delimited by two grey lines, P stands for periplasm, EM for extracellular milieu and the first  $\beta$ -strand of the  $\beta$ -barrel is indicated with a black arrow. Left panel, top view; right panel, side view.

in LB at 37°C for 1.5–3.5 h and protein samples prepared as described above. A protein of ~47 kDa, similar to the one previously observed, was readily detected in the cell, indicating a significant level of expression from the chromosomal copy of the *plpD* gene (Fig. 2B). From the PlpD aa sequence, the calculated size of the  $\beta$ -domain including the POTRA motif is 44.97 kDa, which is in agreement with the product detected in cells. Interestingly, another protein, with a slightly smaller molecular weight, was detected in the culture supernatants (Fig. 2B). This secretion is specific and not simply due to cell lysis since the periplasmic DsbA proteins was not found in the same supernatant samples (data not shown). Although the size of the PLP domain after cleavage of the signal peptide is predicted to be 33.10 kDa, which is considerably smaller than the product detected in culture supernatant, this observation suggests that this protein is likely corresponding to the secreted passenger domain of PlpD. This size difference could be due to an aberrant migration or to a post-translational modification of the patatin domain. It is worth noting that neither the chromosomal PlpD nor the recombinant PlpD<sub>V5/His6</sub> is detected as mature full-length protein in *P. aeruginosa* and this even in early time points of growth (Fig. 2B).

#### The C-terminal domain of PlpD is folded in the outer membrane

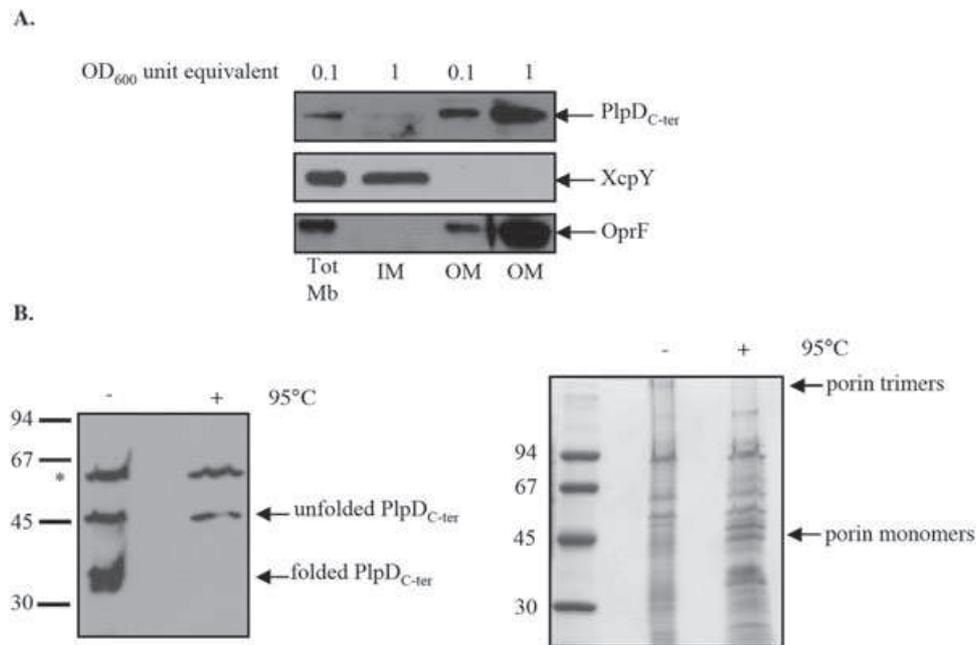
We further analysed the intracellular localization of the putative C-terminal  $\beta$ -domain of PlpD. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 was grown in LB at 37°C up to stationary phase and bacteria were collected by centrifugation. Bacterial cells were then lysed by sonication (see *Experimental procedures*), and the cell envelope fraction was collected by ultracentrifugation. The inner membrane proteins were solubilized in sodium lauryl sarcosinate (SLS), whereas the outer membrane proteins are recovered in the insoluble fraction. The inner membrane fraction contained the XcpY protein but was totally free of PlpD. In



**Fig. 2.** The PlpD passenger domain is cleaved from the TpsB-like  $\beta$ -domain to be released into the extracellular medium.

A. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 wild-type strain carrying the pRS9 plasmid coding the PlpD<sub>V5/His6</sub> protein was grown in LB to an OD<sub>600</sub> of 0.5, 0.5 mM IPTG was then added to the culture for 1 and 3 h. Proteins from bacterial cell pellets were separated on a SDS-PAGE for immunoblotting with anti-V5-specific antibody. The bacterial culture equivalent of 0.1 unit of OD<sub>600</sub> was loaded on a 10% acrylamide gel. Molecular weight markers are shown in kDa on the left.

B. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 wild-type strain was grown in LB for 1.5–3.5 h. Cells and TCA-precipitated proteins of supernatant were separated by SDS-PAGE for immunoblotting with anti-PlpD-specific antiserum. The bacterial culture equivalent of 0.1 unit of OD<sub>600</sub> for cells fraction (C) and of 1 unit of OD<sub>600</sub> for supernatants (SN) were loaded on a 10% acrylamide gel. Molecular weight markers are shown in kDa on the left, a non-specific background protein with an asterisk.



**Fig. 3.** The C-terminal domain is folded in the outer membrane.

**A.** *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 was submitted to fractionation. The cell envelope (Tot Mb), the inner membrane (IM) and outer membrane (OM) fractions were separated on a SDS-PAGE for immunoblotting with anti-PlpD-, anti-XcpY-, anti-OprF-specific antisera. The bacterial culture equivalents loaded on the gel in units of OD<sub>600</sub> are indicated on the top.

**B.** *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 cell samples were analysed by semi-native PAGE with (+) or without (-) denaturation at 95°C, followed with immunoblotting with anti-PlpD antiserum (left panel). The total membrane fraction prepared as described in *Experimental procedures* was stained with Coomassie blue for porins observation (right panel). The bacterial culture equivalent of 0.2 units of OD<sub>600</sub> was loaded on a 10% acrylamide gel. Folded/unfolded PlpD<sub>C-ter</sub> and porin monomers/trimers are indicated with arrows. Molecular weight markers are shown in kDa on the left and a non-specific background protein with an asterisk.

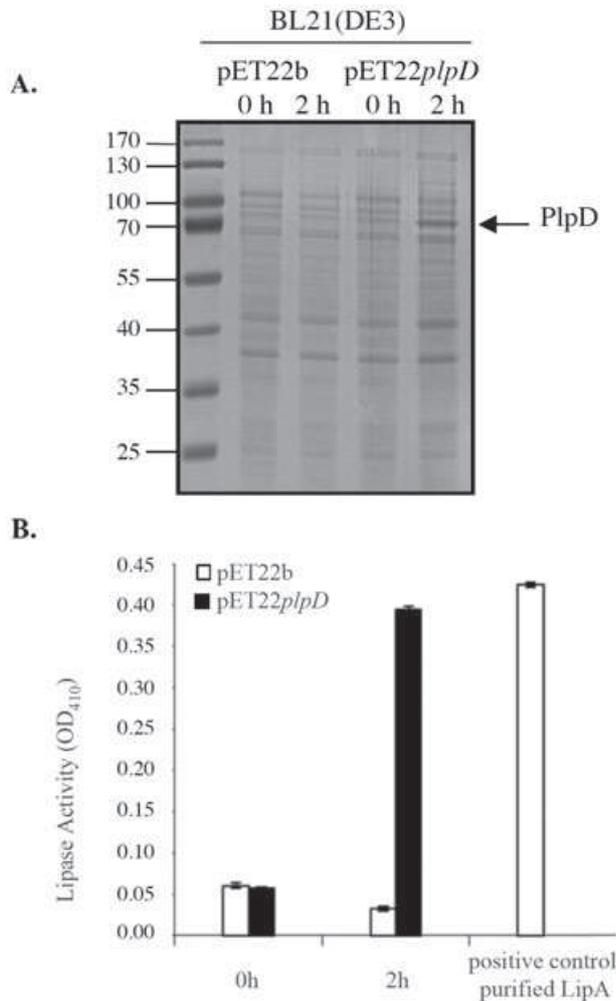
contrast, the C-terminal domain of PlpD was mostly detected in the same fraction as OprF, a *P. aeruginosa* porin indicating that it localized into the outer membrane (Fig. 3A, lane 3 and 4). Indeed the PlpD C-terminus should essentially be associated with the outer membrane fraction since that is where the cleavage should occur as it is described for the ATs.

Many outer membrane proteins displayed heat modifiability (Dekker *et al.*, 1995; Konieczny *et al.*, 2001; Oomen *et al.*, 2004) that is the correctly folded monomer had a faster electrophoretic mobility in semi-native PAGE than the heat-denatured form. To assess if the C-terminal domain of PlpD attains a proper  $\beta$ -barrel conformation in the outer membrane, its heat modifiability was tested on semi-native gels as described in *Experimental procedures*. As shown in Fig. 3B (left panel), PlpD C-terminus is immunodetected as a folded monomeric form that migrates faster in semi-native PAGE than the heat-denatured form. In those semi-native conditions, the *P. aeruginosa* porin trimers are stable and observable at the top of the gel, while the heat-denatured porins are dissociated into monomers (Fig. 3B, right panel). The C-terminal domain of PlpD thus displays the heat modifiability of many outer membrane proteins that tends to

indicate a proper folding of this transporter domain as a  $\beta$ -barrel in the outer membrane.

#### *PlpD* possesses lipase activity

To gain insight into the function of PlpD, we assessed the activity of PlpD produced in *E. coli* since *P. aeruginosa* itself secretes several lipolytic enzymes. The *plpD* gene was cloned in the expression vector pET22b(+), yielding plasmid pET22*plpD*. The plasmid contains the *plpD* gene under the control of an IPTG-inducible T7 promoter. The recombinant plasmid carrying *plpD* was introduced in *E. coli* BL21(DE3), *plpD* gene expression was induced with IPTG, cells were collected by centrifugation, the total cellular proteins were separated on SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. A protein with an apparent size of 90 kDa is specifically abundant in the BL21(DE3) (pET22*plpD*) cell fraction upon IPTG induction, which likely represents the full-length form of PlpD (Fig. 4A, lane 4). This was confirmed by Western blotting using anti-PlpD antibodies (data not shown and Figs S2 and S3 in *Supporting information*). In contrast with *P. aeruginosa*, PlpD is not cleaved in *E. coli*. The size of the PlpD protein produced in *E. coli* (~90 kDa) is higher than the predicted



**Fig. 4.** The full-length PlpD produced in *E. coli* has a lipase activity *in vitro*.

A. *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying the pET22b(+) empty vector or the pET22plpD plasmid coding the PlpD<sub>His6</sub> protein was grown in LB to an OD<sub>600</sub> of 0.8, 0.4 mM IPTG was then added to the culture for induction of expression. Samples were taken at 0 h and 2 h after induction. The bacterial culture equivalent of 0.1 unit of OD<sub>600</sub> was loaded on a 10% acrylamide gel. Proteins from bacterial cell pellets were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. PlpD is indicated on the right by an arrow, and molecular weight markers in kDa on the left.

B. Lipase activity was assayed by *p*-nitrophenyl palmitate hydrolysis with *E. coli* extracts carrying pET22b(+) or the pET22plpD. The release of *p*-nitrophenol was measured at 410 nm. Purified LipA was used as a positive control. Error bars indicate standard deviations.

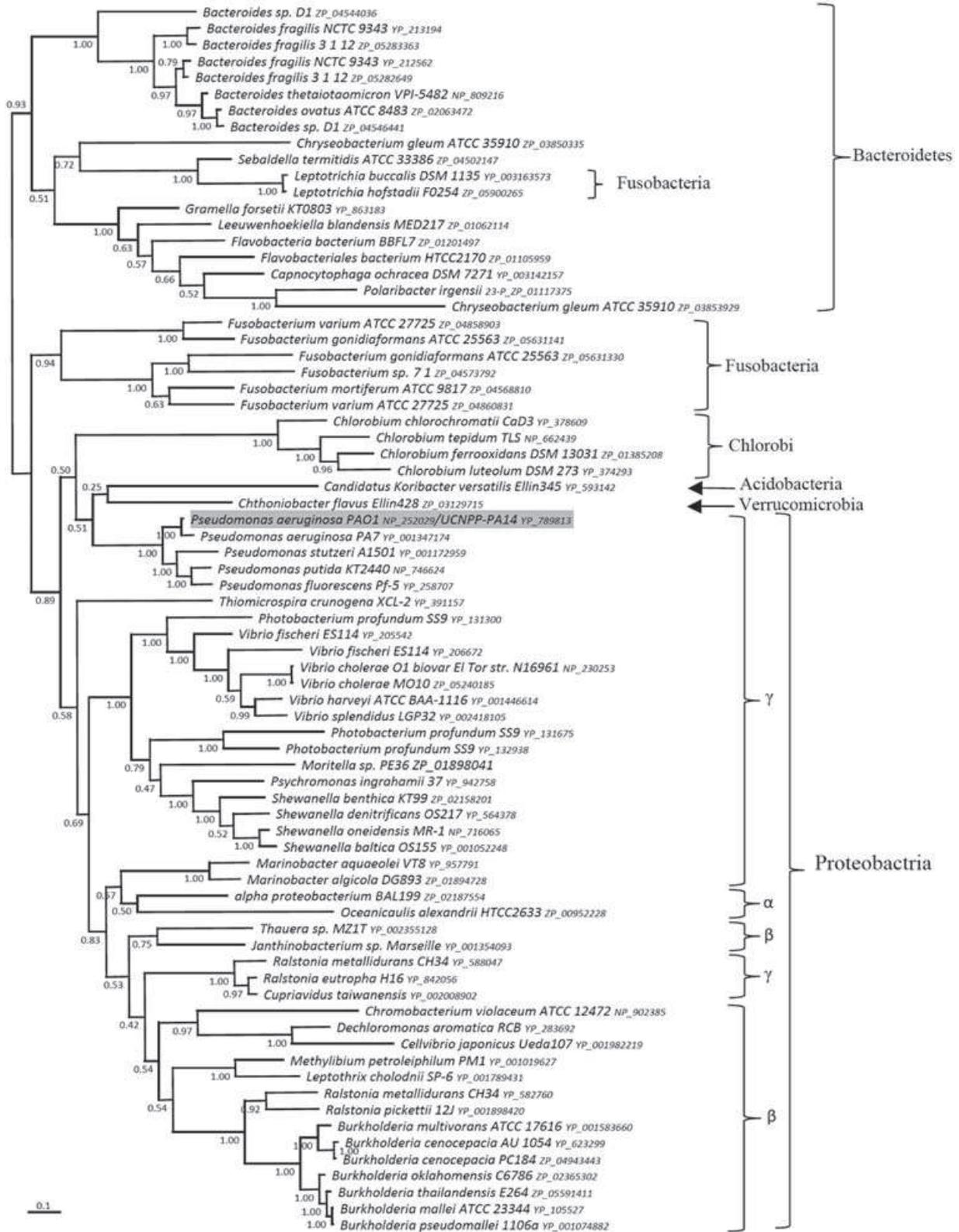
molecular weight (80 899) but is in agreement with the sum of the apparent sizes of the intracellular PlpD C-terminus (~47 kDa) and the secreted domain (~45 kDa) observed in *P. aeruginosa*.

We further examined the activity of PlpD towards lipids. Whole cell extracts of *E. coli* producing full-length PlpD, or not, were mixed with *p*-nitrophenyl palmitate and the release of *p*-nitrophenol was measured (see *Experimental*

*procedures*). Extracts from bacteria producing PlpD released significantly more *p*-nitrophenol than samples from the strains containing either the empty vector or pET22plpD for which expression was not induced. PlpD activity in the IPTG-induced *E. coli* strain was comparable to the *P. aeruginosa* LipA activity used as a positive control (Fig. 4B). We concluded that the full-length PlpD has a lipase activity *in vitro*, which further confirms that PlpD is a PLP.

#### *Putative PlpD-like transporters are found among Gram-negative bacteria*

So far bacterial PLPs were shown to be secreted via Type III (Finck-Barbancon *et al.*, 1997; Hauser *et al.*, 1998) and Type IV (Vanrheenen *et al.*, 2006) secretion machinery. To our knowledge, *P. aeruginosa* PlpD is thus the first example of a PLP using a Type V mechanism to reach the extracellular medium. In order to establish whether this is a unique case or not, we searched for PlpD homologues with a similar domain architecture at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) A total of 133 proteins harbouring the three domains (patatin-like, POTRA and 16-stranded  $\beta$ -barrel) were found. Moreover, 99 PlpD homologues containing the patatin domain and the  $\beta$ -domain but no obvious POTRA domain, which may be due to the limited aa sequence identity between POTRA domains, were also discovered. PlpD-like proteins are present among pathogens (*Burkholderia* species, *Vibrio cholerae*), symbiotic bacteria (*Vibrio fischeri*), commensal bacteria (*Bacteroides ovatus*) and environmental bacteria (*Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* and *Shewanella oneidensis*) (Fig. 5). The taxonomic distribution of PlpD-like proteins reveals that these proteins are not abundant among bacteria. They are mainly represented in four phyla (*Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* and *Chlorobi*), among which they are restricted to few sublineages. For instance, PlpD is only found in 43 genomes among 239 sequenced genomes of  $\gamma$ -*Proteobacteria*. This distribution suggests that these lineages have acquired these genes by horizontal gene transfers. The phylogenetic analysis confirms this hypothesis. PlpD acquisition could be due to inter- as well as to intra-phyla transfers. While *Bacteroidetes* and *Chlorobi* phyla belong to the same superphyla, their PlpD-like proteins are not regrouped that can be explained by independent acquisition during inter-phyla transfer. Intra-phyla transfers can be illustrated by the monophyletic group (posterior probability = 1.00) that contains *Vibrionales* (*Vibrio* sp.) and *Alteromonadales* (*Shewanella* sp.). Despite such kind of horizontal transfers, some groups corresponding to taxonomic units are present (i.e.  $\beta$ -proteobacteria phylogenetic group,  $\gamma$ -proteobacteria phylogenetic group). This observation suggests that when the *plpD*-like gene has been acquired



**Fig. 5.** Distribution of PlpD-like transporters. Bayesian phylogenetic tree of 75 PlpD-like sequences (209 analysed positions). Numbers at nodes are Bayesian posterior probabilities. Scale bar represents the number of estimated changes per position for a unit of branch length. The taxonomic groups are indicated by braces. The *P. aeruginosa* PlpD protein is underlined in grey.

in one particular organism of a group, it has then been transferred within this group. Moreover PlpD-like proteins are mainly found within bacteria leaving in animals (respiratory and gastrointestinal tracts), marine bacteria and bacteria isolated from polluted waters. The strength that can sustain such transfers is thus the same lifestyle or the same ecological niche.

## Discussion

ExoU is one of the most potent toxins produced by *P. aeruginosa* towards host cells. Its cytotoxic activity depends on an original catalytic dyad, present in vegetal patatins and in human cytosolic PLA<sub>2</sub>. In this study we discovered a new secreted protein in *P. aeruginosa*, which, because of its similarity with patatin, was designated PlpD for patatin-like protein D. PlpD is synthesized as a single molecule consisting of a secreted domain fused to a transporter domain. An in-depth *in silico* analysis predicted that the C-terminal domain of PlpD can form a  $\beta$ -barrel in the outer membrane to allow translocation of the patatin-like passenger domain across the outer membrane. This organization suggests a T5SS mechanism. In agreement with this model, we showed that the passenger patatin-like domain of PlpD was secreted into the extracellular medium by the PAO1 and PA14 strains, whereas the C-terminal domain remained inserted into the outer membrane in a folded form. With this result we definitively demonstrated that PlpD was a novel secreted protein from *P. aeruginosa*.

We took advantage of heterologous production of PlpD in *E. coli* as a full-length protein to monitor the enzymatic activity of PlpD. Besides their activity towards phospholipids, PLA<sub>2</sub>-like patatins usually display esterase and/or lipase activities. *Escherichia coli* extracts producing PlpD clearly resulted in the hydrolysis of a typical lipase substrate, the *p*-nitrophenyl palmitate. The full-length PlpD is thus an active lipase even when it remains covalently associated to the  $\beta$ -domain. The lack of processing in *E. coli* is maybe the consequence of the mislocalization of the protein that was either found in inclusion bodies or stucked in the inner membrane (Fig. S3 in *Supporting information*). One can also not exclude the possibility that additional factors are required for proper outer membrane targeting and are not present in the heterologous background. Contrary to ExoU (Sato *et al.*, 2003; 2006), PlpD does not require an eukaryotic cofactor to be active. This suggests that the secreted PlpD can be active in the extracellular environment and not only in the context of the target host cell, which can make sense regarding the fact that some environmental bacteria possess PlpD-like proteins.

Interestingly, we found that the nature of the PlpD transporter is totally original. Whereas the organization of this

large protein with an N-terminal signal peptide, a central passenger domain and a C-terminal  $\beta$ -domain could be reminiscent of an AT protein, the characteristics of the latter domain fit nicely with those of a TpsB transporter. These two pathways are two distinct branches of the T5SS, Type Va/Vc (AT) and Type Vb (TPS) respectively. ATs are secreted proteins supposedly able to translocate by themselves across the outer membrane (Henderson *et al.*, 2004; Linke *et al.*, 2006; Dautin and Bernstein, 2007). The TPS pathway involves two protagonists, the secreted TpsA protein, which crosses the outer membrane thanks to a TpsB transporter (Hodak and Jacob-Dubuisson, 2007; Mazar and Cotter, 2007). The  $\beta$ -domain of PlpD displayed features of TpsB channels with a POTRA motif preceding a putative 16-stranded  $\beta$ -barrel that can be folded accordingly with the structure of the FhaC/TpsB protein of *B. pertussis* (Clantin *et al.*, 2007). The TpsB protein via its first POTRA domain recognizes the TPS secretion signal of its cognate TpsA, thus allowing the outer membrane translocation of TpsA through the TpsB  $\beta$ -barrel. A hallmark of TpsA proteins is the N-terminal TPS domain, with a highly conserved NPNGL motif (Mazar and Cotter, 2007). This domain is necessary and sufficient for secretion of several TpsA, like ShIA (Schonherr *et al.*, 1993) or FHA (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1996) by their cognate TpsB transporters. We could not identify any TPS domain in the PlpD sequence (data not shown), but since the secreted domain is fused to the transporter in the PlpD protein, the recognition between the two partners is not a limiting step in this case and there might be no requirement for a secretion signal.

Maturation by both exogenous and endogenous proteolytic activities has been reported for AT and TPS systems. In order to understand the processing of PlpD we pursued two hypotheses (Fig. S4 in *Supporting information*). It is known that the outer membrane protease called IcsP is responsible for maturation and release of the *Shigella flexneri* AT IcsA (Shere *et al.*, 1997). We thus considered that an outer membrane protease of *P. aeruginosa* could be responsible for PlpD cleavage. We tested the effect of the OprD protein (Yoshihara *et al.*, 1996) and showed that PlpD was correctly processed in its absence. Moreover, as the maturation of an AT can depend on the protease activity of another AT, like for the IgA protease with the serine protease AT NalP in *Neisseria meningitidis* (van Ulsen *et al.*, 2003) or the serine protease SphB1 for FHA (Coutte *et al.*, 2003), we tested the effect of a mutation in *sprS* (PA3535), coding a putative Serine protease AT of *P. aeruginosa* (Ma *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 2009). PlpD was efficiently processed in this mutant. There might be other candidates to be tested and alternatively we could consider an autoproducting mechanism since the catalytic dyad of the patatin active site is based on a Serine residue like in Serine proteases. Indeed, the pas-

senger domain of the *Haemophilus influenzae* Hap is released by an endogenous Ser protease activity that mediates an intermolecular reaction (Hendrixson *et al.*, 1997). As neither the intracellular C-terminal domain of PlpD, nor the N-terminal secreted part is detectable with Coomassie blue staining or silver staining (data not shown), we still do not know where the cleavage takes place. But even for well-characterized ATs, the exact cleavage site might be still not known. Indeed to crystallize the C-terminal domain of the NalpP autotransporter, Oomen and colleagues (2004) delimited and produced the transporter domain on the basis of sequence alignment of 120 autotransporters.

What can be the function of the POTRA domain in PlpD? Considering the targeting role of the POTRA motif in the TpsB transporter, one possibility would be that the PlpD POTRA domain may recruit a partner, perhaps the protease responsible for its processing. Alternatively, the POTRA domain can function as an intramolecular chaperone that assists and limits the folding of PlpD in the periplasm for an efficient translocation across the outer membrane. Accordingly, while structural elements of AT passengers are formed in the periplasm prior to secretion (Skillman *et al.*, 2005), folding in that compartment is limited for TpsA (Hodak and Jacob-Dubuisson, 2007). Indeed, the cytolysin ShIA is not only secreted but also activated through a conformational change by its cognate ShIB/TpsB transporter (Walker *et al.*, 2004). This model has also been proposed for the P-usher, a hybrid transporter of *P. aeruginosa*, responsible for both fimbrial assembly and TpsA protein secretion. It consists of an outer membrane usher domain fused to a POTRA-like domain possibly involved in folding the secreted CupB5/TpsA protein (Ruer *et al.*, 2008). Finally, a reason why the patatin domain is fused with a TpsB-like domain in PlpD may be that a folded patatin enzyme in the periplasm could be active towards *P. aeruginosa* phospholipid membranes. Indeed we showed that the full-length PlpD produced by *E. coli* could be active towards lipids. The fusion of the patatin domain to the translocator domain might thus enable a rapid export out of the periplasm into the extracellular milieu. In agreement with this, the other known bacterial PLPs are secreted by T3SS (Finck-Barbancon *et al.*, 1997; Hauser *et al.*, 1998) or T4SS (Vanrheenen *et al.*, 2006), and in these cases the secreted proteins have no access to the periplasm, are unfolded during the transport and moreover are directly injected into host cells.

We found more than 200 PlpD orthologues in Gram-negative bacteria suggesting that numerous PLPs may be secreted by this original T5SS transporter that we propose to call a Type Vd system, to differentiate it from AT (Type Va and Vc) and TPS (Type Vb). The presence of PlpD-like transporters in pathogenic as well as in non-pathogenic

bacteria suggests that PlpD-like proteins involvement is not limited to virulence, but that they may be implicated in functions such as host/symbiont–commensal communication, exchange and cell–cell communication. We have only found patatin domains fused to TpsB-like transporters, but it cannot be excluded that other types of passenger domain may be encountered. In future studies, we will investigate the role of the POTRA domain in this new kind of protein transporter.

## Experimental procedures

### *Bacterial strains, plasmids and growth conditions*

The bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 1. The *E. coli* DH5 $\alpha$  and TGI strains were used for standard genetic manipulations. Recombinant plasmids were introduced in *P. aeruginosa* using the conjugative properties of pRK2013. *Pseudomonas* transconjugants were selected on *Pseudomonas* isolation agar (PIA, Difco Laboratories) supplemented with appropriate antibiotics. The following antibiotic concentrations were used: for *E. coli*, ampicillin (50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), kanamycin (25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ); for *P. aeruginosa*, carbenicillin (500  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). *Escherichia coli* and *P. aeruginosa* cultures were inoculated at an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.1 with overnight cultures, and strains were grown at 37°C with aeration in LB.

### *Sequence analysis*

The BLAST search was performed on the *Pseudomonas* genome site (<http://v2.pseudomonas.com/>). The presence of an N-terminal signal peptide was searched using the signalP program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/signalp-2.0>) and PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/>), which predicts also protein localization sites in cells. The C-terminal 350 amino acid residues of PlpD were analysed by the BOMP server (<http://www.bioinfo.no/tool/bomp>) for the presence of a domain that could form a  $\beta$ -barrel structure. Additional sequence alignments were performed using the facilities of the T-COFFEE server (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/t-coffee/index.html>) and CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). The predictive assignment of the C-terminal domain was performed using the servers PSIPred, JPred, Yaspin, HNN, Predator (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>, <http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/>, <http://ibivu.cs.vu.nl/programs/yaspinwww/>, [http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_nn.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html), <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/predator-simple.html>). Prediction of the tertiary structure of PlpD was performed through the Phyre server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>) and results were analysed and visualized through the free UCSF Chimera Program (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html>) (Pettersen *et al.*, 2004).

### *Phylogenetic analysis*

The PlpD protein sequence was used to search for proteins with a similar domain organization (PF01734, PF07244 and

**Table 1.** Strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Genotype or description <sup>a</sup>	Source and/or reference
<i>E. coli</i> strain		
TG1	<i>F</i> : <i>lacI</i> <sup>R</sup> <i>Tn10</i> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) <i>supE</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) <i>thi</i> <i>hsdR</i> $\Delta$ 5 ( <i>F</i> : <i>tra</i> $\Delta$ 36 <i>proA</i> <sup>+</sup> <i>B</i> <sup>+</sup> <i>Z</i> $\Delta$ M15)	Laboratory collection
DH5 $\alpha$	<i>F</i> / <i>endA</i> <i>hsdR</i> 17 ( <i>r<sub>K</sub></i> <i>m<sub>K</sub></i> ) <i>supE</i> 44 <i>thi</i> -1 <i>recA</i> 1 <i>gyrA</i> (Nal <sup>R</sup> ) <i>relA</i> 1 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169( $\phi$ 80 <i>dlac</i> $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15)	Laboratory collection
1047	<i>met</i> <i>supE</i> <i>supF</i> <i>hsdS</i> <i>recA</i>	Laboratory collection
BL21(DE3)	<i>F</i> -, <i>hsdS</i> , <i>gel</i> , <i>ompT</i> , lysogen for DE3, derived from $\lambda$ phage that carries the gene encoding the RNA polymerase of T7 of phage T7 controlled by <i>P</i> <i>lac</i> promoter	Laboratory collection
<i>P. aeruginosa</i> strains		
PAO1	Wild-type prototroph, chl-2	Laboratory collection
PA14	Wild-type strain, clinical isolate	Liberati <i>et al.</i> (2006)
PA14::PA14_18630	Insertion of MAR2xT7 transposon in PA14_18630 gene [orthologue to <i>sp</i> S (PA3535) of PAO1], in PA14 strain	Liberati <i>et al.</i> (2006)
PA14::oprD	Insertion of MAR2xT7 transposon in <i>oprD</i> (PA14_51880 gene, orthologue to PA0958 of PAO1), in PA14 strain	Liberati <i>et al.</i> (2006)
Plasmids		
pRK2013	<i>ori</i> ColE1, Tra <sup>+</sup> Mob <sup>+</sup> , Km <sup>R</sup>	Laboratory collection
pUC19	<i>ori</i> ColE1, Ap <sup>R</sup>	Laboratory collection
pMMB67EH	Broad host range, <i>oriV</i> , <i>oriT</i> , Ap <sup>R</sup>	Laboratory collection
pET-DEST42	P77, C-terminal V5/His <sub>6</sub> tag, Ap <sup>R</sup>	Invitrogen
pRS4	<i>plpD</i> cloned into the pET-DEST42 from the PAO1 ORF collection	This work
pRS5	XbaI–ClaI fragment from pRS4 containing <i>plpD</i> cloned in sites XbaI–Accl of pUC19	This work
pRS9	EcoRI–SphI fragment from pRS5 <i>plpD</i> cloned in sites EcoRI–SphI of pMMB67EH	This work
pET22b(+)	P77, Ap <sup>R</sup>	Invitrogen
pET22 <i>plpD</i>	<i>plpD</i> cloned into the pET22b(+)	This work

a. Ap<sup>R</sup> stands for ampicillin resistance, Km<sup>R</sup> for kanamycin resistance.

PF01103) into the NCBI database. A total of 133 proteins with the same organization, including PipD, and 99 proteins with only two domains (PF01734, PF01103) were found. The PipD-like homologues were aligned with CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994). The resulting alignment was manually refined with the program ED of the MUST package (Philippe, 1993). Regions where homology between sites was doubtful were removed and 209 amino acid positions were finally kept for the phylogenetic analyses. First, we performed a preliminary phylogenetic analysis of the 232 PipD-like sequences by Maximum likelihood using the LG model with a  $\Gamma$  law (four rate categories and an estimated alpha parameter) implemented in PHYML (Guindon and Gascuel, 2003). The resulting tree was used to choose a subset of 75 sequences representative of the diversity of the PipD-like homologues as following: 23 from the  $\gamma$ -proteobacteria, 19 from the  $\beta$ -proteobacteria, 17 from the bacteroidetes, 8 from the fusobacteria, 4 from the chlorobi, 2 from the  $\alpha$ -proteobacteria, 1 from the verrucomicrobia and 1 from the acidobacteria. Next, we performed a bayesian phylogenetic analysis of these 75 PipD-like sequences using the program MrBAYES 3 with a mixed substitution model and a  $\Gamma$  law (six rate categories) and a proportion of invariant sites to take among-site rate variation into account (Ronquist and Huelsenbeck, 2003).

#### Preparation of antisera

The *plpD* gene from the *Pseudomonas* gene collection (Labaer *et al.*, 2004) was cloned using the Gateway technology (Invitrogen) in the pET-DEST42 vector under a T7 promoter leading to pRS4 encoding PipD<sub>V5/His</sub> tagged at the C-terminus. The recombinant PipD protein was produced in

*E. coli* strain BL21(DE3) grown under agitation at 37°C, after induction of the T7 RNA-polymerase gene with 1 mM IPTG. Bacteria were harvested by centrifugation for 10 min at 5000 *g*, and sonicated (five pulses of 15 s). Proteins found in inclusion bodies were solubilized with 8 M urea for 2 h at room temperature. Purification was performed by affinity chromatography on HiTrap Chelating HP (GE Healthcare). Polyclonal antisera were raised in rabbits (Eurogentec). Two rabbits (NZW) were injected four times using 100  $\mu$ g per injection during a course of 3 months.

#### SDS-PAGE, semi-native PAGE and immunoblotting

Bacterial cell pellets were resuspended in loading buffer (Laemmli, 1970). Exoproteins from culture supernatants were precipitated with 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA), washed with acetone, and resuspended in loading buffer. The protein samples were boiled and separated on SDS gels containing 10% (w/v) acrylamide. Protein samples analysed in semi-native conditions were resuspended in SDS-PAGE loading buffer containing only 0.2% SDS and no  $\beta$ -mercaptoethanol. These samples were not heated, but kept at 4°C before electrophoresis. Electrophoresis was performed at 100 V in polyacrylamide gels without SDS. For Western blotting, proteins were transferred from gels onto nitrocellulose membranes. After 30 min to overnight saturation in Tris-buffered saline (TBS) (0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, pH 7.5), 0.05% (v/v) Tween 20 and 5% (w/v) skim milk, the membrane was incubated for 1 h with anti-V5 (diluted 1:5000), anti-PipD (1:1000), anti-XcpY (1:5000) or anti-OprF (1:2500); washed three times with TBS, 0.05% Tween 20; incubated for 45 min with goat anti-rabbit immunoglobulin G

(IgG) antibodies (Sigma) diluted 1:5000; washed three times with TBS, 0.05% Tween 20; and then revealed with a Super Signal Chemiluminescence system (Pierce).

#### *P. aeruginosa* fractionation

Bacteria were grown until the stationary phase ( $OD_{600} = 3.5\text{--}4$ ), harvested with low-speed centrifugation, and pellets were washed and resuspended in 10 mM Tris-HCl (pH 7.2). The cells were then disrupted by sonication (four pulses of 20 s each) in the presence of 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Unbroken cells and cellular debris were removed by low-speed centrifugation. The soluble and membrane fractions were separated by ultracentrifugation for 40 min at 72 000 *g* (Beckman, TLA-55 rotor). Cytoplasmic and periplasmic proteins in the supernatant were precipitated with 10% (w/v) TCA. Inner and outer membrane proteins were separated by differential solubilization in SLS. Cell envelope fractions were incubated with 2% SLS for 15 min at 4°C with gentle shaking. SLS-insoluble outer membrane proteins were separated from soluble inner membrane proteins by ultracentrifugation (72 000 *g*, 40 min). Inner membrane proteins were then precipitated with 10% (w/v) TCA. Inner and outer membrane protein pellets were resuspended in sample buffer.

#### Determination of lipase activity

The *plpD* gene was amplified with chromosomal DNA of *P. aeruginosa* PAO1 as a template using *Pfu* DNA polymerase (Promega) with oligonucleotides *plpD* Up (5'-AAACATATG CGCCGCTGCTG-3') and *plpD* Down (5'-ATGAGCTCTCA GAAGTTCTGCCC-3'), creating NdeI and SacI sites at each end respectively. The resulting PCR product (2184 bp) was hydrolysed with NdeI and SacI and cloned into the NdeI and SacI sites of the pET22b(+) vector producing pET22*plpD*. *Escherichia coli* BL21(DE3) transformed with the pET22b(+) and pET22*plpD* plasmids were grown in LB medium with 0.4% (w/v) glucose at 37°C until  $OD_{600} = 0.8$ , and expression of *plpD* was then induced with IPTG at 0.4 mM final concentration for 2 h. The cells were collected by centrifugation for 2 min at 10 000 *g* and resuspended in 100 mM Tris-HCl (pH 8). Cell disruption was carried out by sonication (two times for 3 min) and inclusion bodies were separated from soluble proteins by centrifugation at 2600 *g* for 10 min.

Lipolytic activity was measured using the *p*-nitrophenyl palmitate as substrate according a modified Winkler and Stuckmann method (Winkler and Stuckmann, 1979). The substrate solution was prepared by mixing 5 ml of *p*-nitrophenyl palmitate stock solution (8 mM in propan-2-ol) with 50 ml of solution containing 50 mM  $Na_2HPO_4$ , 50 mM  $KH_2PO_4$ , 5 mM sodium deoxycholate and 0.1% (w/v) gum arabic. The measurement was started by adding 200  $\mu$ l of substrate to the 10  $\mu$ l aliquot of cell lysate in 96-well plate. The absorbance of the *p*-nitrophenol was spectrophotometrically measured at a wavelength of 410 nm in 20 s intervals for 20 min at 30°C. In parallel with every measurement, the blank sample (buffer used instead of cell sample) was used to set a zero point to avoid incorrect measurements as a result of the spontaneous hydrolysis of the substrate. Each sample was measured in triplicate.

#### Acknowledgements

This work is dedicated to the memory of Benjamin Toubiana. We thank members of the '*Pseudomonas*' group for fruitful discussions, A. Hachani for helping during PlpD purification for antibodies production and Pascal Hingamp for advices in bioinformatic analysis. R.S. was financed with a PhD fellowship from the French Research Minister. F.K. is financed with a PhD fellowship in frame of 'Marie Curie Actions Antibiotarget' project financed from European Union. S.W. is financed by Deutsche Forschungsgemeinschaft in the priority program SPP1170. A.F. is supported by the Royal Society. This work was supported by grants-in aid for scientific research from 'EuroPathoGenomics' REX (LSHB-CT-2005512061-EPG), 'Antibiotarget' (MEST-CT-2005-020278) and 'Pathomics' ERA-net PATHO (ANR-08-PATH-004-01).

#### References

- Arpigny, J.L., and Jaeger, K.E. (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* **343** (Part 1): 177–183.
- Banerji, S., and Flieger, A. (2004) Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria? *Microbiology* **150**: 522–525.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**: 783–795.
- Berven, F.S., Flikka, K., Jensen, H.B., and Eidhammer, I. (2004) BOMP: a program to predict integral beta-barrel outer membrane proteins encoded within genomes of Gram-negative bacteria. *Nucleic Acids Res* **32**: W394–W399.
- Bleves, S., Gerard-Vincent, M., Lazdunski, A., and Filloux, A. (1999) Structure–function analysis of XcpP, a component involved in general secretory pathway-dependent protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 4012–4019.
- Bos, M.P., Robert, V., and Tommassen, J. (2007) Functioning of outer membrane protein assembly factor Omp85 requires a single POTRA domain. *EMBO Rep* **8**: 1149–1154.
- Clantin, B., Hodak, H., Willery, E., Loch, C., Jacob-Dubuisson, F., and Villeret, V. (2004) The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 6194–6199.
- Clantin, B., Delattre, A.S., Rucktoo, P., Saint, N., Meli, A.C., Loch, C., et al. (2007) Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily. *Science* **317**: 957–961.
- Coutte, L., Willery, E., Antoine, R., Drobecq, H., Loch, C., and Jacob-Dubuisson, F. (2003) Surface anchoring of bacterial subtilisin important for maturation function. *Mol Microbiol* **49**: 529–539.
- Dautin, N., and Bernstein, H.D. (2007) Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol* **61**: 89–112.
- Dekker, N., Merck, K., Tommassen, J., and Verheij, H.M. (1995) *In vitro* folding of *Escherichia coli* outer-membrane phospholipase A. *Eur J Biochem* **232**: 214–219.
- Dhondt, S., Geoffroy, P., Stelmach, B.A., Legrand, M., and Heitz, T. (2000) Soluble phospholipase A2 activity is

- induced before oxylipin accumulation in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves and is contributed by patatin-like enzymes. *Plant J* **23**: 431–440.
- Economou, A., Christie, P.J., Fernandez, R.C., Palmer, T., Plano, G.V., and Pugsley, A.P. (2006) Secretion by numbers: protein traffic in prokaryotes. *Mol Microbiol* **62**: 308–319.
- Filloux, A., Hachani, A., and Bleves, S. (2008) The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* **154**: 1570–1583.
- Finck-Barbancon, V., Goranson, J., Zhu, L., Sawa, T., Wiener-Kronish, J.P., Fleiszig, S.M., et al. (1997) ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol Microbiol* **25**: 547–557.
- Gardy, J.L., Spencer, C., Wang, K., Ester, M., Tusnady, G.E., Simon, I., et al. (2003) PSORT-B: improving protein subcellular localization prediction for Gram-negative bacteria. *Nucleic Acids Res* **31**: 3613–3617.
- Gentle, I.E., Burri, L., and Lithgow, T. (2005) Molecular architecture and function of the Omp85 family of proteins. *Mol Microbiol* **58**: 1216–1225.
- Guindon, S., and Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**: 696–704.
- Hardie, K.R., Pommier, S., and Wilhelm, S. (2009) The secreted proteins of *Pseudomonas aeruginosa*: their export machineries and how they contribute to pathogenesis. In *Bacterial Secreted Proteins*, Vol. 1. Karl Wooldridge Centre for Biomolecular Sciences, U.o.N., UK (ed.). Nottingham, UK: Caister Academic Press, pp. 451–478.
- Hauser, A.R., Kang, P.J., and Engel, J.N. (1998) PepA, a secreted protein of *Pseudomonas aeruginosa*, is necessary for cytotoxicity and virulence. *Mol Microbiol* **27**: 807–818.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., and Ala'Aldeen, D. (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 692–744.
- Hendrixson, D.R., de la Morena, M.L., Stathopoulos, C., and St Geme, J.W., 3rd (1997) Structural determinants of processing and secretion of the *Haemophilus influenzae* hap protein. *Mol Microbiol* **26**: 505–518.
- Hirschberg, H.J., Simons, J.W., Dekker, N., and Egmond, M.R. (2001) Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A. *Eur J Biochem* **268**: 5037–5044.
- Hodak, H., and Jacob-Dubuisson, F. (2007) Current challenges in autotransport and two-partner protein secretion pathways. *Res Microbiol* **158**: 631–637.
- Jacob-Dubuisson, F., Buisine, C., Mielcarek, N., Clement, E., Menozzi, F.D., and Locht, C. (1996) Amino-terminal maturation of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol* **19**: 65–78.
- Jain, S., and Goldberg, M.B. (2007) Requirement for YaeT in the outer membrane assembly of autotransporter proteins. *J Bacteriol* **189**: 5393–5398.
- Kim, S., Malinverni, J.C., Sliz, P., Silhavy, T.J., Harrison, S.C., and Kahne, D. (2007) Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. *Science* **317**: 961–964.
- Konieczny, M.P.J., Benz, I., Hollinderbaumer, B., Beinke, C., Niederweis, M., and Schmidt, M.A. (2001) Modular organization of the AIDA autotransporter translocator: the N-terminal beta1-domain is surface-exposed and stabilizes the transmembrane beta2-domain. *Antonie Van Leeuwenhoek* **80**: 19–34.
- Kulasekara, B.R., Kulasekara, H.D., Wolfgang, M.C., Stevens, L., Frank, D.W., and Lory, S. (2006) Acquisition and evolution of the *exoU* locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**: 4037–4050.
- Labaer, J., Qiu, Q., Anumanthan, A., Mar, W., Zuo, D., Murthy, T.V., et al. (2004) The *Pseudomonas aeruginosa* PA01 gene collection. *Genome Res* **14**: 2190–2200.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Liberati, N.T., Urbach, J.M., Miyata, S., Lee, D.G., Drenkard, E., Wu, G., et al. (2006) An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 2833–2838.
- Linke, D., Riess, T., Autenrieth, I.B., Lupas, A., and Kempf, V.A. (2006) Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends Microbiol* **14**: 264–270.
- Ma, Q., Zhai, Y., Schneider, J.C., Ramseier, T.M., and Saier, M.H., Jr (2003) Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Biochim Biophys Acta* **1611**: 223–233.
- Mazar, J., and Cotter, P.A. (2007) New insight into the molecular mechanisms of two-partner secretion. *Trends Microbiol* **15**: 508–515.
- Michel, G.P.F., and Voulhoux, R. (2009) The type II secretory system (T2SS) in Gram negative bacteria: a molecular nanomachine for secretion of Sec and Tat-dependent extracellular proteins. In *Bacterial Secreted Proteins*, Vol. 1. Karl Wooldridge Centre for Biomolecular Sciences, U.o.N., UK (ed.). Nottingham, UK: Caister Academic Press, pp. 67–92.
- Moraleda-Munoz, A., and Shimkets, L.J. (2007) Lipolytic enzymes in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **189**: 3072–3080.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**: 1–6.
- Oomen, C.J., van Ulsen, P., van Gelder, P., Feijen, M., Tommassen, J., and Gros, P. (2004) Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *EMBO J* **23**: 1257–1266.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**: 1605–1612.
- Philippe, H. (1993) MUST, a computer package of Management Utilities for Sequences and Trees. *Nucleic Acids Res* **21**: 5264–5272.
- Ronquist, F., and Huelsenbeck, J.P. (2003) MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572–1574.

- Ruer, S., Ball, G., Filloux, A., and de Bentzmann, S. (2008) The 'P-usher', a novel protein transporter involved in fibrillar assembly and TpsA secretion. *EMBO J* **27**: 2669–2680.
- Rydel, T.J., Williams, J.M., Krieger, E., Moshiri, F., Stallings, W.C., Brown, S.M., et al. (2003) The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser–Asp catalytic dyad. *Biochemistry* **42**: 6696–6708.
- Sato, H., Frank, D.W., Hillard, C.J., Feix, J.B., Pankhaniya, R.R., Moriyama, K., et al. (2003) The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J* **22**: 2959–2969.
- Sato, H., Feix, J.B., Hillard, C.J., and Frank, D.W. (2005) Characterization of phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III cytotoxin, ExoU. *J Bacteriol* **187**: 1192–1195.
- Sato, H., Feix, J.B., and Frank, D.W. (2006) Identification of superoxide dismutase as a cofactor for the pseudomonas type III toxin, ExoU. *Biochemistry* **45**: 10368–10375.
- Schonherr, R., Tsolis, R., Focareta, T., and Braun, V. (1993) Amino acid replacements in the *Serratia marcescens* haemolysin ShIA define sites involved in activation and secretion. *Mol Microbiol* **9**: 1229–1237.
- Shaver, C.M., and Hauser, A.R. (2004) Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun* **72**: 6969–6977.
- Shere, K.D., Sallustio, S., Manassis, A., D'Aversa, T.G., and Goldberg, M.B. (1997) Disruption of IcsP, the major *Shigella* protease that cleaves IcsA, accelerates actin-based motility. *Mol Microbiol* **25**: 451–462.
- Shewry, P.R. (2003) Tuber storage proteins. *Ann Bot (Lond)* **91**: 755–769.
- Skillman, K.M., Barnard, T.J., Peterson, J.H., Ghirlando, R., and Bernstein, H.D. (2005) Efficient secretion of a folded protein domain by a monomeric bacterial autotransporter. *Mol Microbiol* **58**: 945–958.
- Stirling, F.R., Cuzick, A., Kelly, S.M., Oxley, D., and Evans, T.J. (2006) Eukaryotic localization, activation and ubiquitinylation of a bacterial type III secreted toxin. *Cell Microbiol* **8**: 1294–1309.
- Struyve, M., Moons, M., and Tommassen, J. (1991) Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J Mol Biol* **218**: 141–148.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) Improved sensitivity of profile searches through the use of sequence weights and gap excision. *Comput Appl Biosci* **10**: 19–29.
- van Ulsen, P., van Alphen, L., Hove, J., Fransen, F., van der Ley, P., and Tommassen, J. (2003) A *Neisserial* autotransporter NalP modulating the processing of other autotransporters. *Mol Microbiol* **50**: 1017–1030.
- VanRheenen, S.M., Luo, Z.Q., O'Connor, T., and Isberg, R.R. (2006) Members of a *Legionella pneumophila* family of proteins with ExoU (phospholipase A) active sites are translocated to target cells. *Infect Immun* **74**: 3597–3606.
- Voulhoux, R., Bos, M.P., Geurtsen, J., Mols, M., and Tommassen, J. (2003) Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* **299**: 262–265.
- Walker, G., Hertle, R., and Braun, V. (2004) Activation of *Serratia marcescens* hemolysin through a conformational change. *Infect Immun* **72**: 611–614.
- Winkler, U.K., and Stuckmann, M. (1979) Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **138**: 663–670.
- Wolfgang, M.C., Kulasekara, B.R., Liang, X., Boyd, D., Wu, K., Yang, Q., et al. (2003) Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 8484–8489.
- Yoshihara, E., Gotoh, N., Nishino, T., and Nakae, T. (1996) Protein D2 porin of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane bears the protease activity. *FEBS Lett* **394**: 179–182.

### Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Fig. S1.** PlpD tertiary structure prediction. The N-terminal part of PlpD (residues 25–235) can fold according the potato Part17 protein structure (Rydel et al., 2003). In this putative PlpD structure, the four homology blocks (shown in blue, purple, green and yellow respectively) are located in a pocket, where the side-chains of the putative active-site residues Ser<sub>60</sub> and Asp<sub>207</sub> (shown in red) are facing each other. This catalytic region is presumably wrapped in between two layers of  $\alpha$ -helices.

**Fig. S2.** PlpD<sub>V5/His6</sub> is produced as a full-length protein in *E. coli*. The recombinant C-terminal V5/His<sub>6</sub> tagged PlpD was produced in *E. coli* BL21(DE3) from the pRS4 plasmid. After SDS-PAGE separation (10%), the total cellular proteins were immunodetected with an anti-PlpD (left panel) and anti-V5 tag (right panel) antisera. A specific product with an apparent size of ~90 kDa that could represent the full-length form of PlpD<sub>V5/His6</sub> was specifically found upon IPTG induction (2 h at the indicated concentration). In *E. coli* the passenger domain is thus not cleaved. The molecular markers are indicated in kDa on the left, a non-specific background protein with an asterisk.

**Fig. S3.** PlpD<sub>V5/His6</sub> is targeted to the inner membrane (IM) of *E. coli*. Bacteria producing PlpD<sub>V5/His6</sub> were submitted to fractionation. After sonication of cell lysate, half of PlpD was recovered in inclusion bodies (data not shown). The envelope (Env) and soluble fractions (C/P) were obtained by ultracentrifugation, and the IM proteins were then solubilized with SLS (2%). The TolA protein and the OmpA porin were used respectively as inner and outer membrane (OM) markers of *E. coli*. The recombinant PlpD was detected with anti-V5 tag antiserum in the same fraction as TolA, indicating that it was localized in the inner membrane of *E. coli*.

**Fig. S4.** The PlpD passenger domain processing. We examined the possible role in the process of two *P. aeruginosa* outer membrane proteins, the OprD protein (PA0958), a porin with protease activity (Yoshihara et al., 1996), and SprS (PA3535), an annotated AT with a serine-protease passenger domain (Ma et al., 2003; Hardie et al., 2009). *Pseudomonas aeruginosa* PA14 and isogenic *oprD* and *oprS* (PA3535)

mutant strains were grown in LB to early stationary phase. Cells and TCA-precipitated proteins of supernatant were separated by SDS-PAGE for immunoblotting with anti-PlpD-specific antiserum. The bacterial culture equivalent of 0.5 units of OD<sub>600</sub> for cells (C) and of 5 units of OD<sub>600</sub> for supernatants (SN) were loaded on a 10% acrylamide gel. PlpD<sub>C-ter</sub> is indicated with a black arrow, PlpD<sub>N-ter</sub> with a white arrow. The fate of the PA14 PlpD orthologue is similar to what was observed in PA01 albeit the secreted domain was detected at a much lower level in the PA14 strain. However, in the *oprD*

and *oprS* transposon-insertion mutant strains, the ~47 kDa fragment of PlpD was immunodetected in the cell fraction showing that these two proteases are not required for PlpD maturation.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.





**A****Bloc 1 : Oxyanion Hole**

GGGXR/KGXXXXG

Exo U	106	LVL	GGGAKGA	YPG	AML	LAL	125
Vip D	31	LVL	GGGAKGIS	YLG	MI	KAL	50
MXAN_3852	52	LVL	GGGAKGAF	QVGA	ER	VL	71
Plp D	26	LVL	GGAA	RGLA	HIG	V	44
Plp A	6	LVL	GGARG	YAHIG	V	I	25
Plp B	35	VP	GAA	GGPK	ALGI	QGLDL	54
Plp C	13	LIL	GGGAR	AA	YQV	GL	32

**Bloc 2 : Sérine Catalytique**

GXSXG

Exo U	137	MSG	SSAGG	ITA	ALL	150		
Vip D	62	VSG	ASAG	AM	TAS	IL	75	
MXAN_3852	82	IFG	VS	GAL	NA	ALL	95	
Plp D	55	IAG	TS	MG	AV	VGG	68	
Plp A	35	IAG	CS	MG	SV	IGGI	48	
Plp B	68	LIG	AS	IG	SW	R	FASA	81
Plp C	47	IVG	TS	SAG	AIN	AV	GL	60

**Bloc 3 : Proline Conservée**

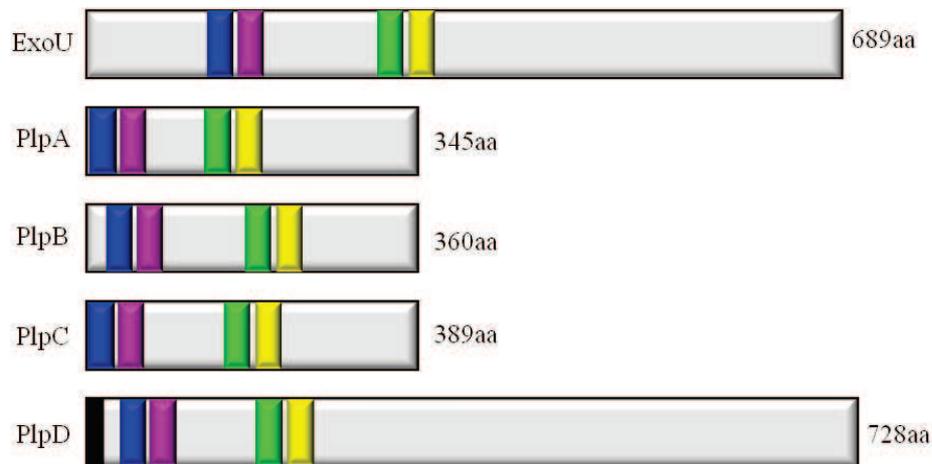
ASXXXXP

Exo U	312	AHI	SGS	FPG	V	FQ	KVS	326				
Vip D	258	VQW	SGA	HP	V	L	FV	PGR	272			
MXAN_3852	185	VWQ	SST	L	P	L	I	W	PVG	199		
Plp D	184	IR	AS	MS	I	P	AV	F	APVE	198		
Plp A	130	MR	AS	AA	I	P	S	L	F	PVM	144	
Plp B	215	LL	AS	GS	I	P	M	V	ME	GVR	229	
Plp C	190	LL	AS	AA	I	P	L	L	F	P	PVR	204

**Bloc 4 : Asp Catalytique**

DGG/AXXXXXP

Exo U	341	FQD	GG	V	M	I	N	V	P	V	P	E	M	I	D	357	
Vip D	279	IAD	GG	I	L	D	N	M	P	E	I	E	G	L	D	295	
MXAN_3852	203	LVD	GG	L	R	N	A	T	P	L	G	D	A	L	E	219	
Plp D	204	LVD	GG	M	V	D	N	I	P	V	D	V	A	R	D	220	
Plp A	150	LVD	GG	L	L	N	P	L	P	I	V	P	V	V	S	166	
Plp B	205	HL	D	GG	N	L	R	Q	A	L	L	A	S	G	S	I	221
Plp C	210	FGD	G	A	V	R	S	Q	A	P	I	S	P	A	L	H	226

**B***- Figure 79 -*

Les blocs patatines chez les trois autres PLPs de la souche PAO1

(A) L'alignement des séquences de PlpA, B et C avec les séquences de PlpD, ExoU, VipD, et MXAN\_3852 révèle une bonne conservation de séquence au niveau des blocs patatines. Les résidus conservés sont en rouge. Les numéros de résidus correspondent au résidu encadrant le bloc.

(B) Position des blocs sur les PLPs de *P. aeruginosa*. Les tailles des protéines sont indiquées en acides aminés (aa). Les blocs 1, 2, 3 et 4 sont représentés en bleu, mauve, vert et jaune respectivement. En noir: peptide signal.

## II. Caractérisation de trois autres PLPs de la souche PAO1 de *P. aeruginosa* : PlpA, PlpB et PlpC

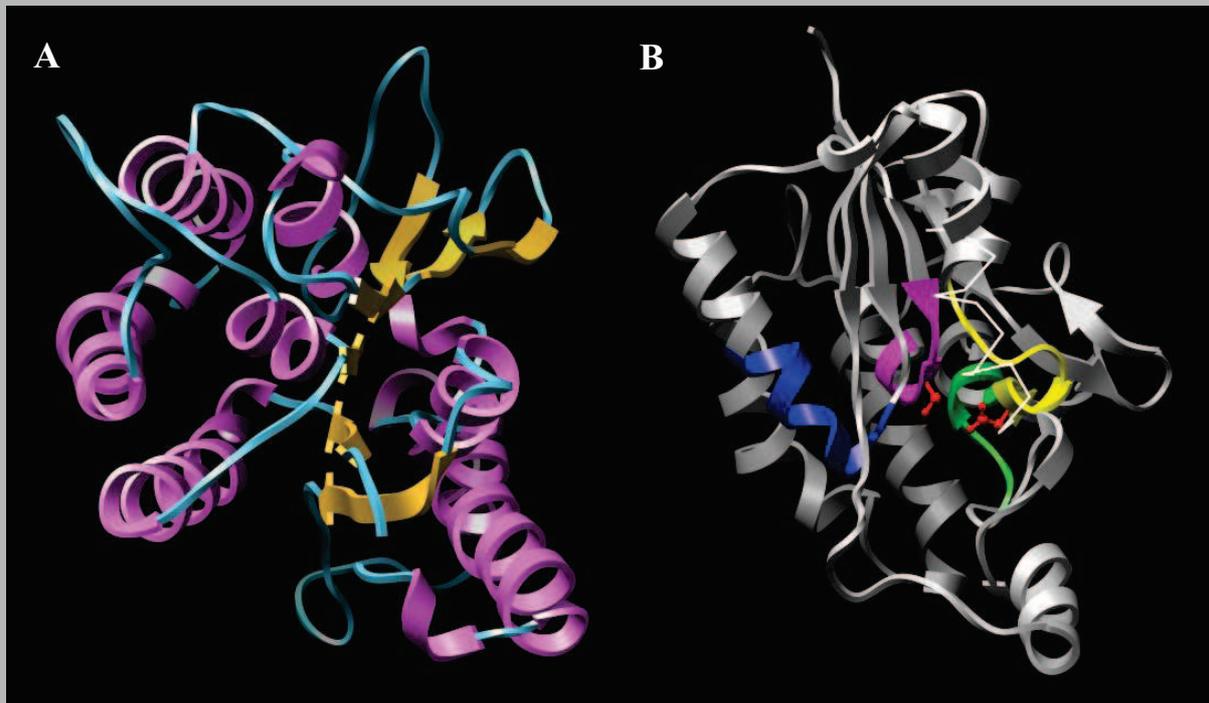
---

Lorsque nous avons recherché des homologues d'ExoU dans la souche PAO1 de *P. aeruginosa*, nous avons identifié quatre homologues putatifs. Le chapitre précédent présentait les résultats obtenus concernant la protéine PlpD, l'un de ces quatre candidats. Ce chapitre présente les résultats obtenus pour les trois autres candidats : PlpA (PA2660), PlpB (PA2660) et PlpC (PA3241).

### II.1. Trois autres PLPs

De manière similaire à ce que nous avons fait pour PlpD, nous avons voulu dans un premier temps déterminer si PlpA, PlpB et PlpC étaient des protéines de la famille des PLPs. Nous avons d'abord aligné les séquences de ces trois protéines avec celles d'ExoU, de PlpD, de VipD et de MXAN\_3852. Tout comme pour PlpD, la conservation de séquences entre ces protéines est relativement faible, à l'exception des quatre blocs caractéristiques des PLPs (Fig.79A). Chacune de ces protéines possède les deux résidus Sérine et Aspartate qui composent la dyade catalytique putative.

Cet alignement apporte une autre indication, concernant la taille de ces protéines. En effet, les domaines patatine d'ExoU, de PlpD, de VipD et de MXAN\_3852, sont localisés en N-terminal, les domaines C-terminaux étant dévolus à une autre tâche (localisation à la membrane plasmique pour ExoU, sécrétion pour PlpD, interférence avec le transport vésiculaire pour VipD). En ce qui concerne PlpA, PlpB et PlpC, ces protéines sont beaucoup plus petites que les autres, et les quatre blocs sont répartis sur l'ensemble de la protéine (Fig.79B). Ces trois PLPs ne sont donc composées que d'un seul domaine, le domaine patatine. De plus, il y a une différence supplémentaire importante avec PlpD, l'absence d'un peptide signal. A l'instar d'ExoU, ces protéines ne possèdent pas de peptide signal, ce qui



- Figure 80 -

### Modélisation du domaine N-terminal de PlpA

(A) PlpA serait organisé en 3 couches  $\alpha/\beta/\alpha$ , à l'identique de l'organisation de Pat17 (Rydel *et al.*, 2003). En mauve: les hélices  $\alpha$ ; en orange: les brins  $\beta$ ; en cyan, les régions non structurées. Vue du dessus.

(B) Les 4 blocs PLP de PlpA, comme pour PlpD, seraient localisés les uns à cotés des autres, à la manière d'une poche catalytique. Pour une meilleure compréhension, l'hélice  $\alpha$  au 1<sup>er</sup> plan a été représentée en fil de fer. En bleu: bloc 1; en mauve: bloc 2, en vert: bloc 3, en jaune: bloc 4; en rouge: les résidus de la dyade catalytique putative (Ser40 et Asp153).

signifie que si elles sont sécrétées, elles le sont par un mécanisme de sécrétion en une étape, indépendant du système Sec. De ce fait, une sécrétion par le SST3 (qui est responsable de la sécrétion d'ExoU) est envisageable.

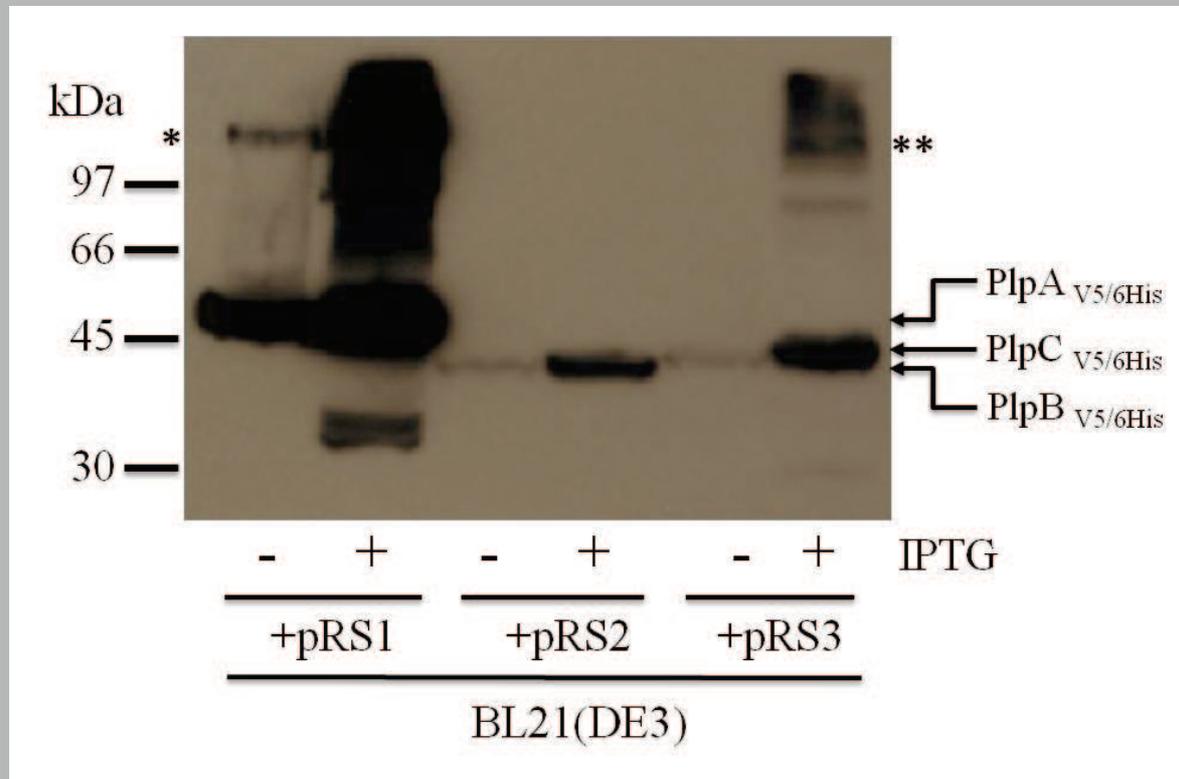
L'étape suivante de notre caractérisation *in silico* a été d'établir un modèle de la structure de PlpA. Les résultats obtenus avec le serveur Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>) indiquent qu'ici aussi, le meilleur modèle pour structurer cette protéine est Pat17. Le modèle généré présente un repliement globulaire similaire à celui obtenu pour PlpD (Fig.80, vs Fig.66) : il y aurait un repliement en 3 couches  $\alpha/\beta/\alpha$  (Fig.80A) et les quatre blocs patatine seraient situés à proximité les uns des autres, formant une cavité au centre de laquelle la Sérine et l'Aspartate constituent la dyade catalytique putative (Fig.80B).

L'ensemble de ces résultats indiquent que ces trois protéines appartiennent bien à la famille des PLPs, tout comme PlpD. En conclusion, la souche PAO1 de *P. aeruginosa* ne possède certes pas la protéine ExoU, mais quatre autres PLPs.

## **II.2. Production chez *E. coli***

Afin de tester la production et la sécrétion de ces protéines chez *P. aeruginosa*, nous avons cloné les trois gènes correspondants en aval d'un promoteur T7, et en amont d'une séquence codant une étiquette V5/6His (donnant les plasmides pRS1, pRS2 et pRS3 pour les gènes *plpA*<sub>V5/6His</sub>, *plpB*<sub>V5/6His</sub>, et *plpC*<sub>V5/6His</sub> respectivement). Ainsi, nous pouvons surproduire trois protéines étiquetées V5/6His au niveau de leur extrémité C-terminale. Nous avons choisi cette extrémité car nous avons émis l'hypothèse que ces protéines pourraient être sécrétées par le SST3, comme c'est le cas pour ExoU, or le signal de sécrétion des effecteurs du SST3 serait en tout début de l'extrémité N-terminale.

Nous avons tout d'abord introduit ces plasmides dans la souche BL21(DE3) d'*E. coli* pour tester la production de nos protéines recombinantes. L'expression du gène codant la polymérase T7 a été induite en ajoutant de l'IPTG (ce qui a pour effet d'induire l'expression de chacun des trois gènes), et les bactéries ont été collectées, centrifugées, lysées, et les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE, suivie d'une immunodétection avec un anticorps anti-V5. Les résultats obtenus indiquent que ces trois protéines sont produites de



- Figure 81 -

Production de PlpA<sub>V5/6His</sub>, PlpB<sub>V5/6His</sub> et PlpC<sub>V5/6His</sub> chez *E. coli*

Les vecteurs portant les gènes codant *plpA*<sub>V5/6His</sub>, *plpB*<sub>V5/6His</sub>, et *plpC*<sub>V5/6His</sub> (respectivement pRS1, pRS2 et pRS3) ont été introduits dans la souche d'*E. coli* BL21(DE3), et leur expression a été induite par la présence d'IPTG 2 mM dans le milieu (culture de 12h sur boîte LB, ampicilline 50 µm, et +/- IPTG). Les cellules ont été lysées et les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE 10%, et révélés par immunodétection au moyen d'un anticorps α-V5. Les 3 protéines sont détectées à leur taille théorique. En absence d'induction, on observe des faibles quantités de protéines (dues à la fuite du promoteur du gène de la polymérase T7). Des bandes de tailles correspondant à des polymères putatifs de PlpA (\*) ou de PlpC (\*\*) sont aussi détectées. L'équivalent de 0,1 UDO<sub>600</sub> a été déposé.

manière stable chez *E. coli*, à des tailles correspondant à leurs tailles théoriques pour PlpB et PlpC (respectivement 39,75 kDa et 42,1 kDa), et légèrement plus lourde pour PlpA (50 kDa pour 37,61 kDa théorique) (Fig.81). Pour PlpA et PlpC, des bandes de hauts poids moléculaires sont détectées (indiquées par des \* sur la Fig.81), laissant penser à une possible oligomérisation (tout du moins chez *E. coli*), ce qui serait une originalité par rapport à ExoU et PlpD. Il est ici intéressant de noter que Pat17, la patatine végétale dont la structure a été déterminée, a été cristallisée sous forme de trimère, bien qu'il soit connu que les conditions de cristallisation entraînent fréquemment des oligomérisations aspécifiques.

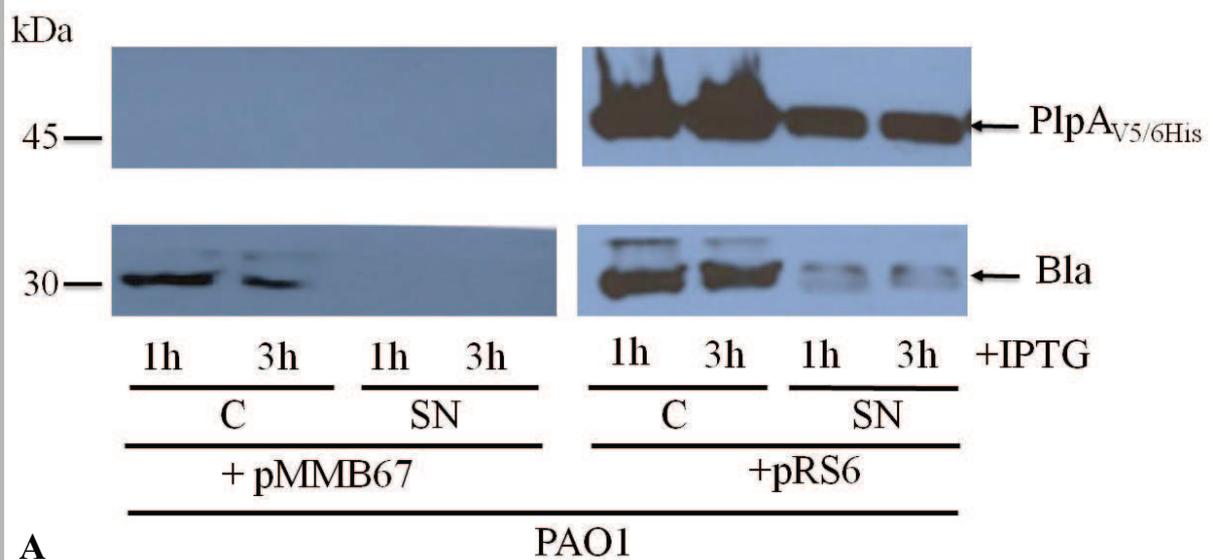
## **II.3. Production et sécrétion chez *P. aeruginosa***

### **II.3.1. PlpA<sub>V5/6His</sub> est une protéine sécrétée**

#### **II.3.1.1. Dans la souche sauvage PAO1**

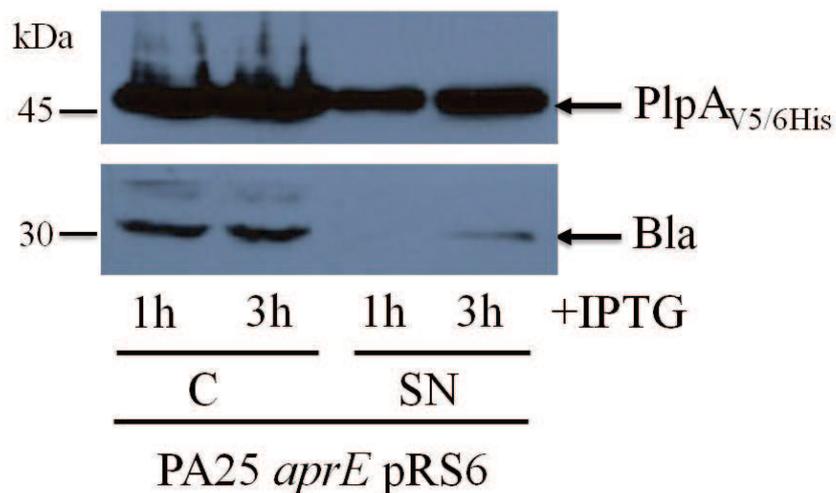
Le gène *plpA<sub>V5-6His</sub>* a été sous-cloné dans un vecteur navette, et placé sous le contrôle d'un promoteur *tac*, inductible à l'IPTG (donnant ainsi le plasmide pRS6). Le pRS6 a été transféré dans la souche sauvage PAO1 pour tester la production de PlpA<sub>V5/6His</sub>. L'expression du gène a été induite par l'ajout d'IPTG, et les bactéries et les échantillons ont été préparés comme précédemment décrit, et analysés par western-blot, en utilisant un anticorps anti-V5. La protéine PlpA<sub>V5/6His</sub> est détectée dans les cellules de *P. aeruginosa* après 1h et 3h d'induction, à la même taille (50 kDa) que celle observée chez *E. coli* (Fig.82A).

Nous avons ensuite voulu vérifier si cette protéine est sécrétée. Des surnageants de culture de la souche PAO1 surproduisant PlpA<sub>V5/6His</sub> ont été préparés et les protéines sécrétées ont été précipitées à l'acide trichloro-acétique (TCA), et analysées par western blot avec l'anticorps anti-V5. Après 1h et 3h d'induction, la protéine est détectée dans les surnageants de culture, indiquant qu'elle est sécrétée (Fig.82A). La taille de la protéine est identique à celle retrouvée dans les cellules, signifiant que dans ces conditions, sa sécrétion ne fait intervenir aucune maturation, à l'inverse de PlpD. En contrôle, la  $\beta$ -lactamase (une enzyme périplasmique) est retrouvée seulement dans le compartiment cellulaire, indiquant qu'il n'y a pas eu de lyse bactérienne (Fig.82A). La détection de PlpA<sub>V5/6His</sub> dans le milieu extracellulaire



A

PAO1



B

PA25 *aprE* pRS6

- Figure 82 -

Production et sécrétion de PlpA<sub>V5/6His</sub> chez *P. aeruginosa*

(A) Les vecteurs vides (pMMB67) ou portant le gène codant *plpA*<sub>V5/6His</sub> (pRS6), ont été introduits dans la souche PAO1 de *P. aeruginosa*, et l'expression a été induite par ajout d'IPTG 2 mM dans le milieu. Les cellules ont été lysées et les échantillons cellulaires (C) et de surnageants de culture (SN) ont été analysés par SDS-PAGE 10%, et révélés par immunodétection au moyen d'un anticorps  $\alpha$ -V5 ou  $\alpha$ - $\beta$ lactamase (Bla). PlpA<sub>V5/6His</sub> est produite à partir du plasmide, et est détectée dans les surnageants de culture spécifiquement puisque le  $\beta$ lactamase, qui est une enzyme périplasmique, n'est pas retrouvée dans le milieu extracellulaire. (B) La même expérience que précédemment a été réalisée dans une souche mutante pour le SST1, PA25*aprE*. PlpA<sub>V5/6His</sub> est toujours détectée dans les surnageants, signifiant que la sécrétion est indépendante de ce système de sécrétion. L'équivalent de 0,1 et 1 UDO<sub>600</sub> a été déposé pour les cellules et les surnageants de culture respectivement.

est donc spécifiquement due à sa sécrétion. On peut aussi noter que l'efficacité de sécrétion n'est pas optimale puisque l'on détecte une plus grande quantité de protéine dans les cellules que dans le milieu extracellulaire. Cela peut être lié à la surproduction de PlpA<sub>V5/6His</sub> qui pourrait conduire à la saturation de la machinerie qui la sécrète, ou cela peut être le signe d'une efficacité de sécrétion plutôt faible.

PlpA<sub>V5/6His</sub> est donc une protéine sécrétée en condition de surproduction. L'absence de peptide signal suggère que ce soit par un système de sécrétion indépendant de la machinerie Sec.

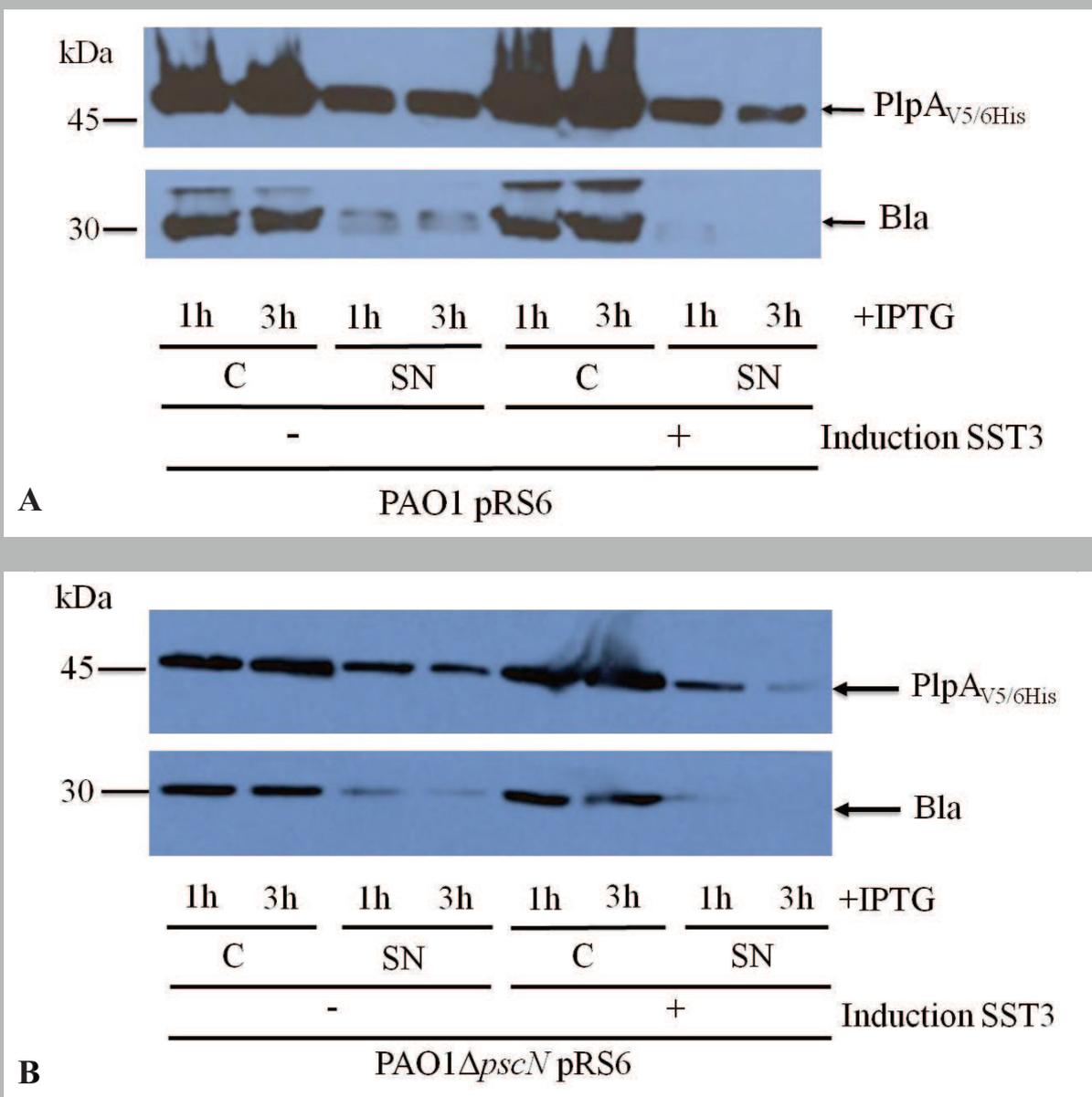
#### II.3.1.2. Dans une souche mutante pour le SST1

Le SST1 est un des mécanismes de sécrétion en une étape, indépendant du système Sec. *P. aeruginosa* possède au moins deux exemplaires de ce système de sécrétion, le système Apr impliqué dans sa virulence en sécrétant notamment la protéase alcaline AprA et la protéine AprX, et le système Has impliqué dans la captation du fer, probablement important dans les étapes précoces d'infection. Nous possédons au laboratoire un mutant d'insertion du gène *aprE*, qui code un constituant de la membrane interne de la machinerie de sécrétion Apr (Fig.15). Nous avons donc testé la sécrétion de la protéine recombinante PlpA<sub>V5/6His</sub> dans ce contexte génétique, en introduisant le plasmide pRS6 dans cette souche. Le traitement des surnageants de culture de cette souche par western blot révèle que PlpA<sub>V5/6His</sub> est toujours sécrétée dans ce mutant, éliminant la possibilité que le système Apr soit responsable de la sécrétion de cette PLP (Fig.82B).

Il n'est pas exclu que PlpA<sub>V5/6His</sub> puisse être sécrétée par le système Has, cependant, au vu du rôle joué par cette machinerie (sécrétion d'un hémophore pour captation du fer de l'hémoglobine notamment (Letoffe *et al.*, 1998)), il est peu probable que ce soit le cas.

#### II.3.1.3. Dans une souche mutante pour le SST3

ExoU est la première PLP bactérienne caractérisée. Elle est sécrétée par le SST3. Il est donc possible que PlpA, une autre PLP dépourvue de peptide signal, soit sécrétée par cette voie. Ce système et ses effecteurs sont réprimés en conditions standards de culture (agitation,



- Figure 83 -  
PlpA<sub>V5/6His</sub> et le SST3

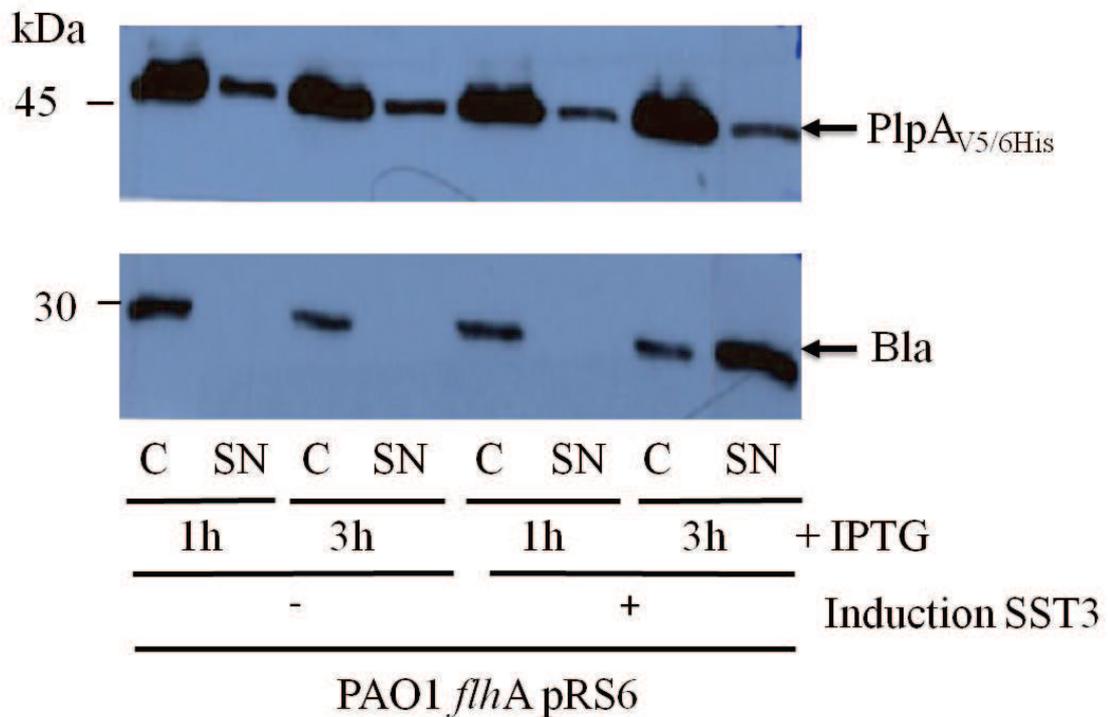
Le vecteur portant le gène codant *plpA*<sub>V5/6His</sub> (pRS6) a été introduit dans la souche sauvage PAO1, (en A), ou la souche PAO1ΔpscN (mutant de l'ATPase du SST3) de *P. aeruginosa* (en B), et l'expression a été induite par ajout d'IPTG 2mM (en A) ou 1mM (en B) dans le milieu. Les bactéries ont été cultivées dans des conditions standards de culture, ce qui équivaut à une absence d'induction du SST3 (-) ou en milieu chélaté en ions Ca<sup>2+</sup>, ce qui correspond à une condition d'induction du SST3 (+). Les cellules ont été lysées et les échantillons cellulaires (C) et de surnageants de culture (SN) ont été analysés par SDS-PAGE 10%, et révélés par immunodétection au moyen d'un anticorps α-V5 ou α-βlactamase (Bla) pour avoir un contrôle de sécrétion. PlpA<sub>V5/6His</sub> est détectée dans les surnageants des souches sauvage et mutante pour le SST3, que les gènes codant l'ensemble de la machinerie aient été induits ou non. On note malgré tout une diminution de l'efficacité de sécrétion au temps 3h en condition d'induction du SST3. L'équivalent de 0,1 et 1 UDO<sub>600</sub> a été déposé pour les cellules et les surnageants de culture respectivement.

37°C, milieu riche, condition aérobie). En revanche, ils sont induits *in vivo* par le contact de la bactérie avec la cellule hôte (Vallis *et al.*, 1999b). Par ailleurs, cette machinerie peut être induite *in vitro* (en absence de cellules hôtes) en chélatant les ions  $\text{Ca}^{2+}$  par l'ajout d'EGTA dans le milieu de culture. Ceci nous offre deux approches différentes pour tester la dépendance vis-à-vis du SST3 : se placer dans une souche sauvage et comparer la sécrétion en condition d'induction ou non du SST3, ou se placer dans un mutant de sécrétion.

La souche sauvage de PAO1, portant le plasmide pRS6, a été cultivée en conditions standards et en milieu chélaté en ions  $\text{Ca}^{2+}$  (respectivement répression et induction du SST3), en présence d'IPTG pour induire l'expression du gène *plpA<sub>V5/6His</sub>*. Les cellules et les surnageants de cultures sont préparés selon le protocole habituel, et analysés par western-blot avec un anticorps anti-V5. La sécrétion de la protéine ExoS (effecteur du type III) a été suivie comme contrôle positif pour l'induction du SST3, au moyen d'un anticorps anti-ExoS (données non montrées). On peut ainsi observer que quelque soit les conditions (1h ou 3h d'induction à l'IPTG, en absence ou présence du SST3), PlpA<sub>V5/6His</sub> est produite et détectée dans les cellules, mais elle est aussi retrouvée dans les surnageants de culture (Fig.83A). Cependant, il est intéressant de noter qu'au temps 3h, lorsque le SST3 est induit, on détecte systématiquement moins de protéine dans les surnageants que dans les autres conditions. Il y a ici une diminution dans l'efficacité de sécrétion.

Ces résultats pourraient nous conduire à conclure que le SST3 n'est pas responsable de la sécrétion de PlpA, cependant, cette diminution reproductible au temps 3h, en condition d'induction du système, demande à être comprise.

En parallèle, nous avons introduit le plasmide pRS6 dans la souche PAO1 $\Delta pscN$ , (le gène *pscN* code l'ATPase de membrane interne du SST3), et avons reproduit l'expérience précédente (en diminuant toutefois la concentration en IPTG à 1mM au lieu de 2 mM). Dans ces conditions, PlpA<sub>V5/6His</sub> est toujours détectée dans le milieu extracellulaire, aussi bien en condition d'induction que de répression du système (Fig.83B). Cependant, cette fois encore, on peut noter que l'efficacité de sécrétion au temps 3h, en condition d'induction du SST3, est plus faible que pour les autres conditions, et ce malgré qu'une concentration plus faible d'IPTG ait permis de moins surproduire PlpA<sub>V5/6His</sub>.



- Figure 84 -

*PlpA<sub>V5/6His</sub>* et le flagelle

Le vecteur portant le gène codant *plpA<sub>V5/6His</sub>* (pRS6) a été introduit dans la souche mutante PAO1*flhA*, (un mutant de la machinerie flagellaire) de *P. aeruginosa*, et l'expression a été induite par ajout d'IPTG 2mM dans le milieu. Les bactéries ont été cultivées dans des conditions standards de culture, ce qui équivaut à une absence d'induction du SST3 (-) ou en milieu chélaté en ions  $Ca^{2+}$ , ce qui correspond à une condition d'induction du SST3 (+). Les cellules ont été lysées et les échantillons cellulaires (C) et de surnageants de culture (SN) ont été analysés par SDS-PAGE 10%, et révélés par immunodétection au moyen d'un anticorps  $\alpha$ -V5 ou  $\alpha$ - $\beta$ lactamase (Bla) pour avoir un contrôle de sécrétion. *PlpA<sub>V5/6His</sub>* est détectée dans les surnageants de culture, que les gènes codant l'ensemble de la machinerie du SST3 aient été induits ou non. *PlpA<sub>V5/6His</sub>* ne semble donc pas sécrétée par le flagelle. L'équivalent de 0,1 et 1 UDO<sub>600</sub> a été déposé pour les cellules et les surnageants de culture respectivement.

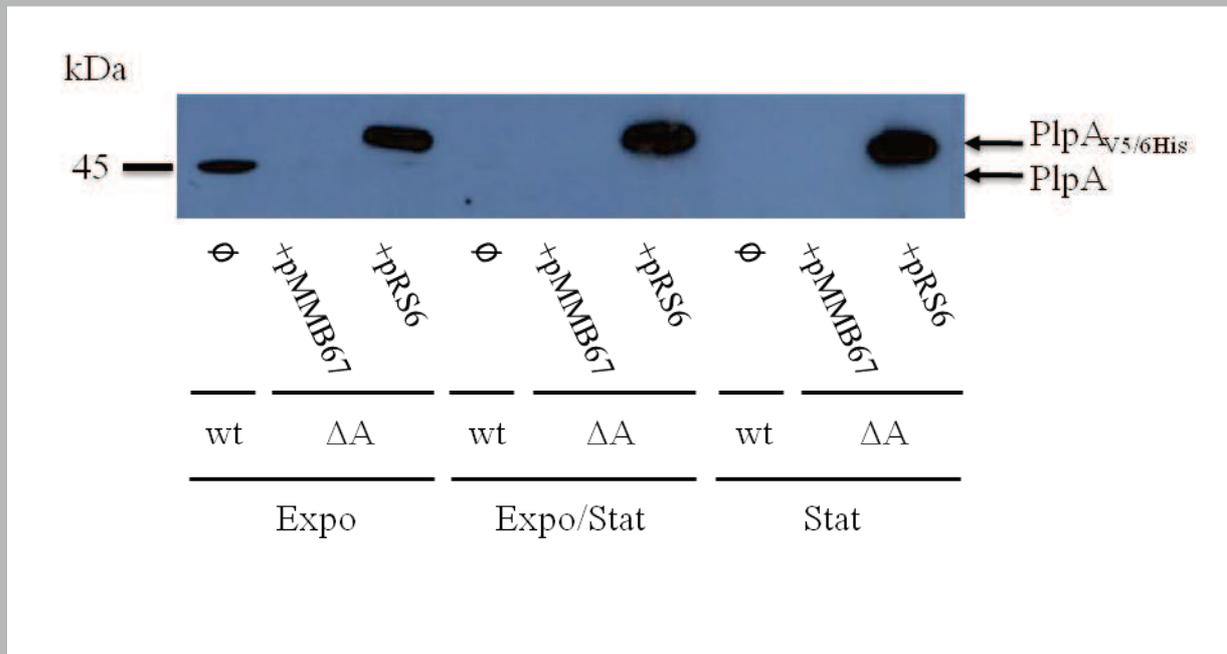
Ces résultats indiquent donc que PlpA<sub>V5/6His</sub> semble ne pas être sécrétée par ce système, contrairement à ExoU. Néanmoins, la diminution de sécrétion observée dans certaines conditions nous conduit à ne pas éliminer définitivement cette hypothèse (voir § II.3.1.6 des Résultats)

#### II.3.1.4. Dans une souche mutante pour le système de sécrétion flagellaire

Le flagelle est un appendice extracellulaire très proche du SST3. Les deux systèmes sont composés de protéines homologues, le corps basal du flagelle possède une architecture très similaire à celle du SST3 (Fig.12 Bis), et il permet notamment l'export à la surface des sous-unités flagellines, protéines majeures du filament flagellaire. Chez *Y. enterocolitica*, il a été démontré que le flagelle était en plus responsable de la sécrétion d'une enzyme lipolytique, YplA, et d'autres protéines, appelées FOPs (flagellar outer protein)(Young *et al.*, 1999). Nous avons donc émis et testé l'hypothèse que le flagelle de *P. aeruginosa* pouvait être responsable de la sécrétion de PlpA<sub>V5/6His</sub>.

Pour cela, nous avons introduit le pRS6 dans une souche PAO1*flhA*, mutante pour un gène codant un des constituants de la membrane interne de la machinerie de sécrétion flagellaire, et nous avons répété notre approche expérimentale. Lorsque cette souche est cultivée en condition standard de croissance, PlpA<sub>V5/6His</sub> est détectée dans le milieu extracellulaire (Fig.84). Puisqu'il est connu qu'il existe un « cross-talk » négatif entre le flagelle et l'appareil de sécrétion du type III (Soscia *et al.*, 2007), nous avons également mené cette expérience en condition d'induction du SST3 afin d'observer une éventuelle modification du comportement de PlpA<sub>V5/6His</sub>. Le résultat obtenu est identique au précédent, PlpA<sub>V5/6His</sub> est toujours retrouvée dans les surnageants de culture (Fig.84).

Il semble donc que la sécrétion de PlpA<sub>V5/6His</sub> ne soit pas non plus réalisée par le système flagellaire. Néanmoins, des données de redondance fonctionnelle entre le SST3 et le flagelle (Givskov & Molin, 1993; Lee & Galan, 2004; Young & Young, 2002) nous conduisent à pousser plus avant nos recherches avant d'éliminer définitivement ce système (voir § II.3.1.6 des Résultats).



- Figure 85 -

### PlpA est produite en phase exponentielle de croissance

Les souches sauvages (wt) ou délétée du gène *plpA* ( $\Delta A$ ) ont été cultivées en milieu riche à 37°C. Des échantillons cellulaires ont été prélevés en phase exponentielle de croissances (Expo), en transition de phase (Expo/Stat), et en phase stationnaire de croissance (Stat), et analysés par SDS-PAGE 10%, et révélés avec un anticorps polyclonal  $\alpha$ -PlpA. La souche mutante a été transformée selon le cas avec le pMMB67 ou avec le pRS6. On peut observer que PlpA (produite depuis la version chromosomique du gène *plpA*) n'est produite qu'au cours de la phase exponentielle de croissance de *P. aeruginosa*, et que PlpA<sub>V5/6His</sub> (produite depuis le gène *plpA*<sub>V5/6His</sub> sur le pRS6) est produite par la souche mutante PAO1 $\Delta plpA$ . L'équivalent de 0,1 UDO<sub>600</sub> a été déposé.

### II.3.1.5. Production et sécrétion de PlpA en conditions physiologiques

Pour travailler dans des conditions physiologiques et pallier donc au problème de surproduction de PlpA<sub>V5/6His</sub>, nous avons dû générer deux outils : (i) des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine PlpA<sub>V5/6His</sub>, cette dernière ayant été produite chez *E. coli* puis purifiée par chromatographie d'affinité au nickel ; (ii) un mutant de délétion du gène *plpA* dans la souche PAO1 par recombinaison homologue et utilisation d'un vecteur suicide de type pEX18 (Hoang *et al.*, 1998).

A l'aide de l'anticorps  $\alpha$ -PlpA épuisé contre un lysat de la souche PAO1 $\Delta$ *plpA*, nous avons voulu observer si PlpA était produite et sécrétée dans les conditions standards de croissance (milieu riche oxygéné, 37°C, agitation). Nous avons reproduit nos expériences précédentes de suivi de sécrétion, en prélevant des échantillons cellulaires à différents points de la phase de croissance. En contrôle nous avons utilisé la souche PAO1 $\Delta$ *plpA* dans laquelle le pRS6 ou le vecteur de clonage ont été introduits. Le western blot réalisé montre la présence d'une bande d'environ 45 kDa dans la souche sauvage, en phase exponentielle de croissance uniquement (Fig.85). Cette bande est absente de la souche mutante PAO1 $\Delta$ *plpA*, indiquant donc qu'il s'agit de PlpA, produite à partir du chromosome. On peut remarquer que PlpA ne semble être donc produite qu'au cours de la phase exponentielle de croissance en conditions standard de culture.

Lorsque le pRS6 est ajouté dans la souche mutante, on détecte la présence d'une bande au voisinage des 50 kDa, de manière identique à ce que nous avons préalablement observé avec ce plasmide (Fig.85). Il s'agit donc de la protéine PlpA<sub>V5/6His</sub>, la différence de taille s'expliquant par la présence de l'étiquette. Cette protéine est aussi sécrétée par le mutant PAO1 $\Delta$ *plpA*, comme le montre l'analyse des surnageants de culture de cette souche (Fig.90).

Nous avons ensuite voulu déterminer si PlpA était sécrétée en conditions standards de croissance. Nous avons donc prélevé le milieu extracellulaire de la souche sauvage PAO1 tout au long de la courbe de croissance afin de suivre la sécrétion de PlpA. En contrôle, nous avons prélevé un échantillon cellulaire en phase exponentielle de croissance pour vérifier qu'elle est bien produite. Dans ces conditions, quelle que soit la phase de croissance, PlpA n'est jamais détectée dans le milieu extracellulaire (données non montrées). Il apparaît donc que bien qu'elle soit produite en phase exponentielle de croissance en conditions standards,



ces conditions ne sont pas celles qui permettent la sécrétion de la protéine sauvage, lorsqu'elle est produite depuis son chromosome.

#### II.3.1.6. Conclusions sur la sécrétion de PlpA

Nous avons démontré que PlpA<sub>V5/6His</sub> est sécrétée par la souche PAO1 de *P. aeruginosa*, en conditions de surproduction. Nous avons aussi montré que PlpA est physiologiquement produite en phase exponentielle de croissance en conditions standards (milieu riche oxygéné, 37°C, agitation), mais ces conditions n'induisent pas la sécrétion de cette protéine lorsqu'elle est produite à partir de la version chromosomique de son gène. Il faudrait donc faire varier différents paramètres de croissance (comme la température, le pH, les concentrations en ions ou en sel) de sorte à identifier les conditions dans lesquelles on pourrait observer la sécrétion de PlpA. Il est aussi envisageable de tester sa sécrétion en présence de cellules eucaryotes.

Bien que nous n'ayons pas déterminé les conditions de sécrétion de la forme sauvage de PlpA, nous avons utilisé la protéine recombinante PlpA<sub>V5/6His</sub> comme outil pour tester différentes hypothèses sur la nature du système de sécrétion impliqué dans la sécrétion de cette protéine. Malheureusement, après avoir criblé plusieurs mutants de machineries de sécrétion, nous n'avons pas pu établir de façon définitive quelle voie est empruntée par PlpA<sub>V5/6His</sub>, puisque celle-ci est retrouvée dans les surnageants des souches à notre disposition.

Cependant, nos résultats concernant la dépendance vis-à-vis du SST3 soulèvent quelques interrogations. La diminution observée systématiquement au temps 3h d'induction nous laisse suggérer que le système de sécrétion soit saturé. En effet, nous devons tenir compte du fait que PlpA<sub>V5/6His</sub> est surproduite depuis un plasmide en multicopies, et que le gène est placé sous le contrôle d'un promoteur fort. A ce stade de notre réflexion, nous ne pouvons donc pas encore exclure la machinerie de type III.

Mais alors, comment expliquer la sécrétion dans la souche mutante PAO1 $\Delta$ *pscN* ou en condition standard de croissance (donc de non induction de l'appareil de type III) (Fig.83)? Les protéines SopE et SptB, effecteurs du SST3 de *S. typhimurium*, délétées de leur domaine



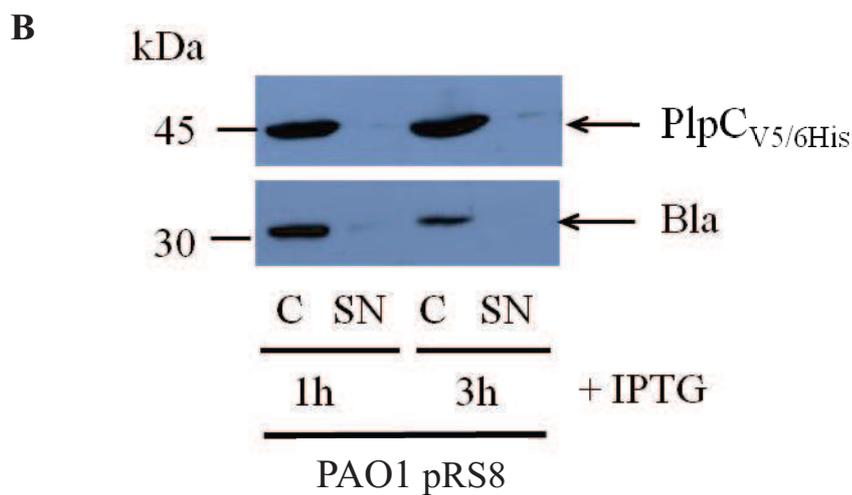
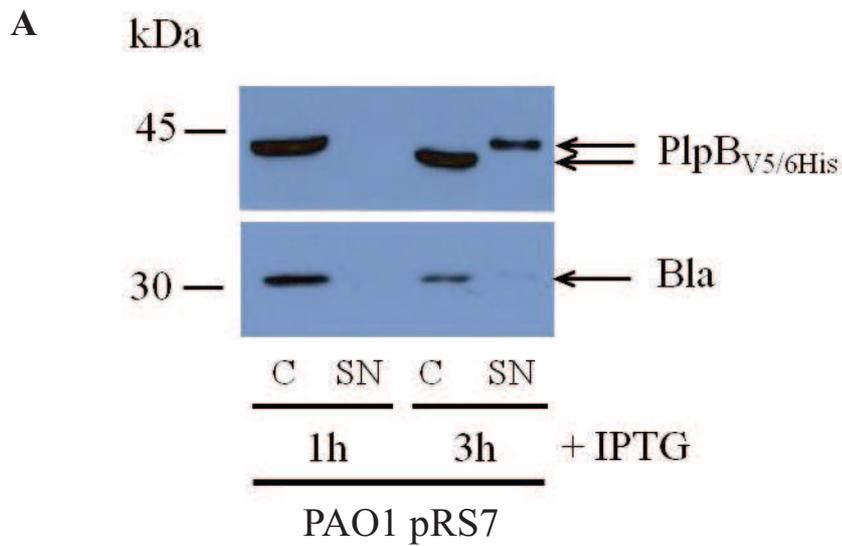
de liaison à leurs chaperonnes respectives, sont sécrétées par le flagelle (Lee & Galan, 2004). Il est décrit qu'une phospholipase sécrétée par le SST3 de *Serratia liquefaciens* peut emprunter le système d'export flagellaire lorsqu'elle est produite chez *E. coli* (Givskov & Molin, 1993). Il a de plus été montré chez *Y. enterocolitica* que la phospholipase YplA pouvait emprunter aussi bien les deux SST3 de cette bactérie, que son système de sécrétion du flagelle (Young & Young, 2002). Le recours à ce « système de secours » pourrait expliquer pourquoi on peut observer la sécrétion de PlpA tant dans un mutant du SST3 qu'en condition standard (Fig.83).

Dans ce cas, comment expliquer que dans un mutant du flagelle, en condition standard (donc de répression du SST3), on détecte toujours de la sécrétion (Fig.84)? Des recherches menées au laboratoire sur la souche PAO1 de *P. aeruginosa* ont démontré qu'en condition standard, l'opéron comprenant les gènes de la machinerie est exprimé au même niveau qu'en conditions d'induction du SST3 (Bleves *et al.*, 2005). Ceci se traduit par une production, certes faible, de la protéine de l'aiguille PscF de la machinerie de sécrétion de type III (Bleves *et al.*, 2005). Dans ces mêmes conditions, les gènes codant les effecteurs, eux, ne sont pas du tout induits, ce qui explique pourquoi leur sécrétion ne peut être visualisée. De plus, dans une autre souche, la souche PAK, il est possible de détecter la sécrétion d'ExoS, un effecteur du SST3, dans des conditions de non induction du SST3 (Bleves, communication personnelle). On peut donc légitimement supposer que la sécrétion de PlpA dans un mutant du flagelle, en condition standard de croissance soit le fait de la production à un niveau basal de la machinerie de type III. De fait, nous ne pouvons pas exclure que la sécrétion de PlpA soit dépendante du SST3. Afin de trancher définitivement sur cette question, il apparaît donc nécessaire de construire une souche mutante pour les deux appareils : l'appareil de type III et l'appareil d'export flagellaire. Dans ce contexte génétique, il sera alors possible de conclure sans équivoque à ce sujet.

Dans le cas où cette approche exclurait la dépendance vis-à-vis du SST3, nous avons encore plusieurs hypothèses :

(i) Il est possible que PlpA soit sécrétée par le SST6. En effet, le gène *plpA* est localisé à proximité du locus de gènes *H2-T6SS (PA1656-PA1671)*, codant la machinerie de sécrétion de type VI.

(ii) Il est également possible que la sécrétion de PlpA fasse intervenir un système de sécrétion encore inconnu à ce jour. Dans ce cas, seule l'analyse d'une banque de mutants



- Figure 86 -

PlpB<sub>V5/6His</sub> est sécrétée contrairement à PlpC<sub>V5/6His</sub>

Les plasmides portant les gènes *plpB*<sub>V5/6His</sub> (pRS7) (en A) ou *plpC*<sub>V5/6His</sub> (pRS8) (en B) ont été introduits par conjugaison dans la souche sauvage PAO1 de *P. aeruginosa*. Ces souches ont été cultivées en présence d'IPTG 2mM pour induire l'expression des gènes. Des échantillons cellulaires (C) et des surnageants de culture (SN) ont été prélevés et analysés par SDS-PAGE 10% et révélés par immunodétection au moyen d'un anticorps  $\alpha$ -V5, ou  $\alpha$ - $\beta$ lactamase (Bla) comme contrôle de sécrétion. PlpB<sub>V5/6His</sub> et PlpC<sub>V5/6His</sub> sont produites et détectées dans les cellules avec cet anticorps. PlpB<sub>V5/6His</sub> est sécrétée sous une forme plus lourde que celle retrouvée dans les surnageants. PlpC<sub>V5/6His</sub> en revanche n'est pas sécrétée dans ces conditions. L'équivalent de 0,1 et 1 UDO<sub>600</sub> a été déposé pour les cellules et les surnageants de culture respectivement.

permettrait d'identifier quels sont les gènes jouant un rôle dans cette sécrétion. Le problème ici réside dans l'absence de phénotype facilement testable, le seul moyen à notre disposition étant le western blot.

### II.3.2. PlpB<sub>V5/6His</sub> et PlpC<sub>V5/6His</sub>

La sécrétion de PlpB<sub>V5/6His</sub> et PlpC<sub>V5/6His</sub> a également été testée. Les plasmides navettes pRS7 et pRS8, portant respectivement les gènes *plpB<sub>V5/6His</sub>* et *plpC<sub>V5/6His</sub>* sous le contrôle du promoteur *tac*, ont été introduits dans la souche PAO1. En utilisant la même approche que pour PlpA et PlpD, nous avons observé le comportement de PlpB<sub>V5/6His</sub> et PlpC<sub>V5/6His</sub> en condition de surproduction. L'anticorps anti-V5 révèle une bande dans les surnageants de culture de la souche PAO1 portant le pRS7, mais à une taille légèrement supérieure à celle de la bande détectée dans les cellules (Fig.86A). Cette bande correspond néanmoins nécessairement à PlpB<sub>V5/6His</sub>, puisque l'anticorps que nous utilisons est dirigé contre l'étiquette V5. Cette modification de taille observée dans les surnageants nous indique que PlpB<sub>V5/6His</sub> subit visiblement une modification post-traductionnelle au cours de sa sécrétion. Dans la mesure où les patatines sont des protéines de stockage glycosylées (Sonnewald *et al.*, 1989a), l'hypothèse la plus vraisemblable serait que PlpB<sub>V5/6His</sub> soit glycosylée au cours de sa sécrétion.

A *contrario*, l'expérience menée avec la souche PAO1 portant le pRS8 indique que PlpC<sub>V5/6His</sub> n'est visiblement pas sécrétée, tout du moins dans les conditions que nous avons testées (Fig.86C).

### II.3.3. Discussion générale sur la sécrétion des PLPs

On peut légitimement se poser la question de l'intérêt pour cet organisme d'avoir quatre gènes homologues dans son génome. Ont-ils une fonction redondante ? Sont-ils chacun dédiés à un processus spécial ?

En nous penchant sur leur sécrétion, nous avons déjà pu mettre en évidence certaines pistes pour répondre à ces questions. Il apparaît peu probable que ces protéines soient simplement des copies redondantes les unes des autres, puisqu'elles se comportent différemment sur le plan de la sécrétion. PlpD est sécrétée par un système en deux étapes, le



SST5. Son action intervient vraisemblablement depuis le milieu extracellulaire. PlpA et PlpB sont aussi sécrétées, mais par des systèmes différents du SST5.

Pour PlpA, nous avons seulement pu éliminer la dépendance vis-à-vis du système de sécrétion de type I, et nous n'avons pas encore pu conclure pour le SST3, et le système flagellaire. Le SST6 est un autre candidat connu que nous n'avons pas encore testé. Bien évidemment, on ne peut exclure que la sécrétion puisse être le fait d'un système inconnu aujourd'hui, ou que notre approche par surproduction ait conduit à une sécrétion aberrante.

Pour PlpB, bien que nous n'ayons pu mener les mêmes expériences que pour PlpA, une différence est à noter : sa modification post-traductionnelle intervenant au cours de sa sécrétion.

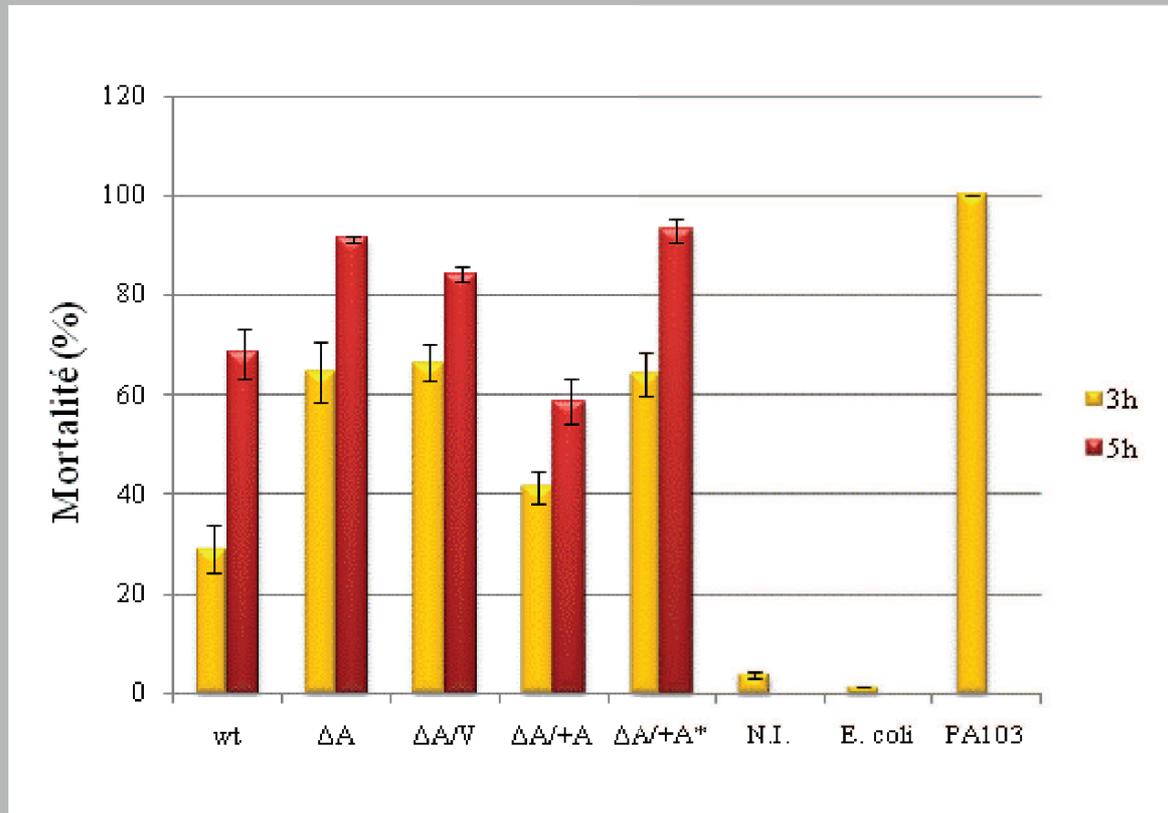
Enfin, sur les quatre PLPs de la souche PAO1, il semble que PlpC soit la seule à ne pas être sécrétée. Dans ce cas, on peut émettre l'hypothèse d'un rôle métabolique (puisqu'elle possède les motifs d'une PLA<sub>2</sub>) différent de celui des autres PLPs.

Bien que nous n'ayons pas identifié le mode de sécrétion de PlpA, nous nous sommes intéressés au phénotype de cette protéine en conditions d'infection de lignées cellulaires. En effet, puisqu'elle est homologue à ExoU, une cytotoxine très puissante, qu'elle est sécrétée, et que nous ne pouvons exclure l'hypothèse qu'elle puisse être injectée par le SST3 ou le SST6, il nous a semblé intéressant d'observer son éventuelle implication lors de l'interaction de *P. aeruginosa* avec des cellules hôtes.

## **II.4. PlpA jouerait un rôle inattendu**

### **II.4.1. PlpA entraîne une meilleure survie cellulaire**

Quelque soit le type cellulaire utilisé, ExoU est capable de générer une mort cellulaire rapide par nécrose, que ce soit lors d'infection par *P. aeruginosa* (Finck-Barbancon et al., 1997; Hauser et al., 1998), ou lorsqu'elle est produite *in situ* dans la cellule eucaryote (Rabin & Hauser, 2003; Sato *et al.*, 2003). Nous avons donc souhaité observer si PlpA avait un impact sur la survie cellulaire.



- Figure 87 -

PlpA diminue la mortalité des cellules, de manière dépendante de son activité

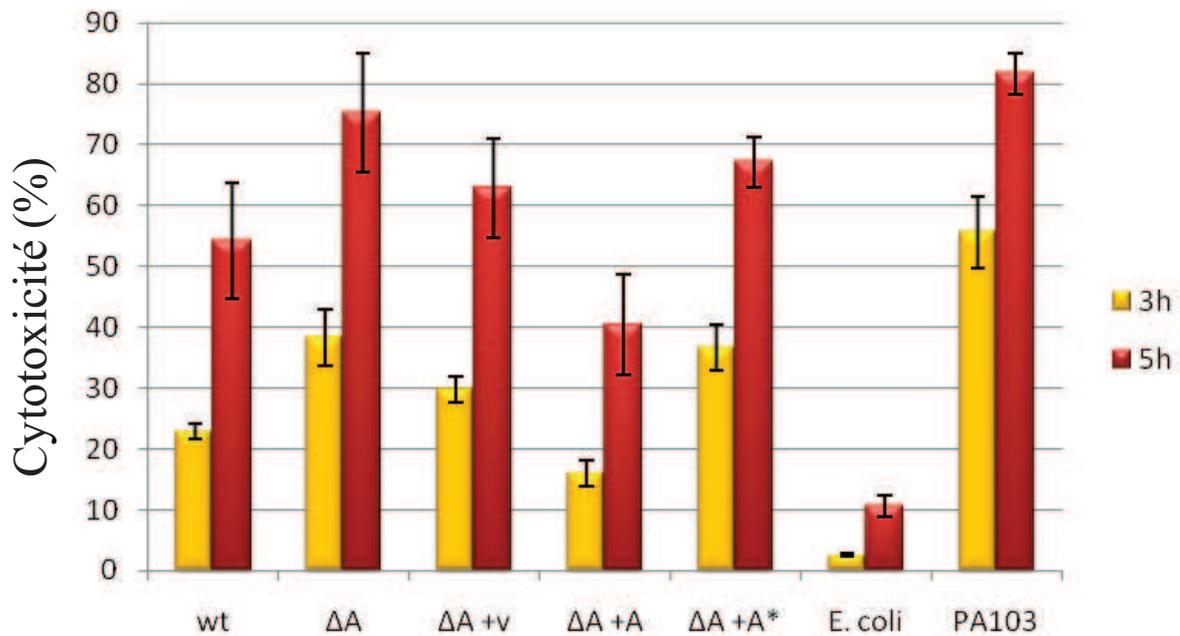
Les souches bactériennes indiquées (sauvages, mutantes ou complémentées) ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance ( $DO_{600} = 0,5$ ), collectées, lavées et mises en contact avec des macrophages murins RAW 264.7 (MOI = 10). Après 3 et 5h d'infection, les cellules sont colorées au bleu trypan pour marquer les cellules mortes ou en train de mourir. Les souches PA103 de *P. aeruginosa* et TG1 d'*E. coli* sont utilisées respectivement comme contrôle positif et négatif de mortalité. Le taux de mortalité a été calculé en réalisant le rapport entre le nombre de cellules bleues sur le nombre de cellules totales sur un champ d'observation représentatif de l'ensemble du puits. wt indique PAO1 sauvage, ΔA : PAO1  $\Delta plpA$ , V : pMMB67, +A : pMMB67-*plpA*, +A\* : pMMB67-*plpA*<sub>S40A</sub>, NI : non infecté

Ces résultats sont représentatifs d'une expérience réalisée 3 fois, dont chaque condition a été testée en triplicat. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type moyen.

Pour ce faire, des macrophages murins RAW 264.7 ont été infectés par une souche sauvage et un mutant  $\Delta plpA$  produisant ou non la forme sauvage de PlpA ou une forme mutante de la Sérine catalytique. En effet, pour déterminer si l'activité lipolytique de PlpA était impliquée dans ce processus, nous avons construit un variant de PlpA dans lequel la Sérine catalytique putative, la Sérine 40, a été substituée par une Alanine, à l'image des différentes études menées sur la protéine ExoU. Les bactéries cultivées jusqu'en milieu de phase exponentielle de croissance sont mises en contact avec les macrophages pendant 3 et 5 heures, à une multiplicité d'infection de 10 (MOI pour multiplicity of infection). La mortalité est suivie par comptage des cellules mortes ou en train de mourir, qui sont colorées au bleu trypan. En effet, ce colorant ne peut pénétrer et marquer que les cellules dont l'intégrité de la membrane plasmique est altérée. Le calcul de la mortalité consiste en le ratio « cellules bleues/nombre total de cellules \* 100 » sur un champ de vision (chaque valeur étant représentative de résultats obtenus en triplicat). En contrôle, l'infection par la souche PA103 de *P. aeruginosa* entraîne 100% de mortalité, contrairement à la souche de laboratoire TG1 d'*E. coli* dont le pourcentage de mortalité est équivalent à celui de cellules non infectées. Après 3h d'infection, de façon inattendue, le taux de mortalité des cellules infectées avec la souche sauvage PAO1 est plus élevé que celui des cellules infectées par les souches PAO1 $\Delta plpA$  ou PAO1 $\Delta plpA$ -pMMB67 (30% *versus* 65% respectivement) (Fig.87). Au temps 5h d'infection, cette différence s'observe toujours, bien qu'il y ait une diminution de l'amplitude (65% *versus* 90%). Lorsque la mutation  $\Delta plpA$  est complétée en *trans* par la version sauvage du gène, on observe une nette diminution à 3h comme à 5h de la mortalité des cellules par rapport à la souche PAO1 $\Delta plpA$ -pMMB67, sans toutefois atteindre le taux mesuré pour la souche sauvage. Les résultats relatifs au variant de PlpA, (PlpA<sub>S40A</sub>) sont abordés au paragraphe II.2.4.2.

Ces résultats indiquent que PlpA protégerait les cellules lors de l'infection. Ce rôle est plutôt inattendu et surprenant, dans la mesure où PlpA appartient à la même famille de protéine qu'ExoU. Elle aurait à priori un effet inverse !

Les cibles naturelles de *P. aeruginosa* étant entre autres les macrophages alvéolaires dans les poumons, et les cellules épithéliales bronchiques, nous avons voulu confirmer ce résultat par deux approches différentes : un test de cytotoxicité et une observation morphologique des cellules infectées. Le premier test traduit la lyse cellulaire, et il a été réalisé sur les macrophages RAW264.7. Le second, les changements morphologiques,



- Figure 88 -

### PlpA diminue la cytotoxicité sur les cellules

Les souches bactériennes indiquées (sauvages, mutantes ou complémentées) ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance, collectées, lavées et mises en contact avec des macrophages murins RAW 264.7 (MOI = 10). Après 3 et 5h d'infection, les milieux de culture des cellules sont prélevés pour en doser la concentration en lactate déshydrogénase (une enzyme eucaryote périplasmique) (Kit ROCHE). Les souches PA103 de *P. aeruginosa* et TG1 d'*E. coli* sont utilisées respectivement comme contrôle positif et négatif de mortalité.

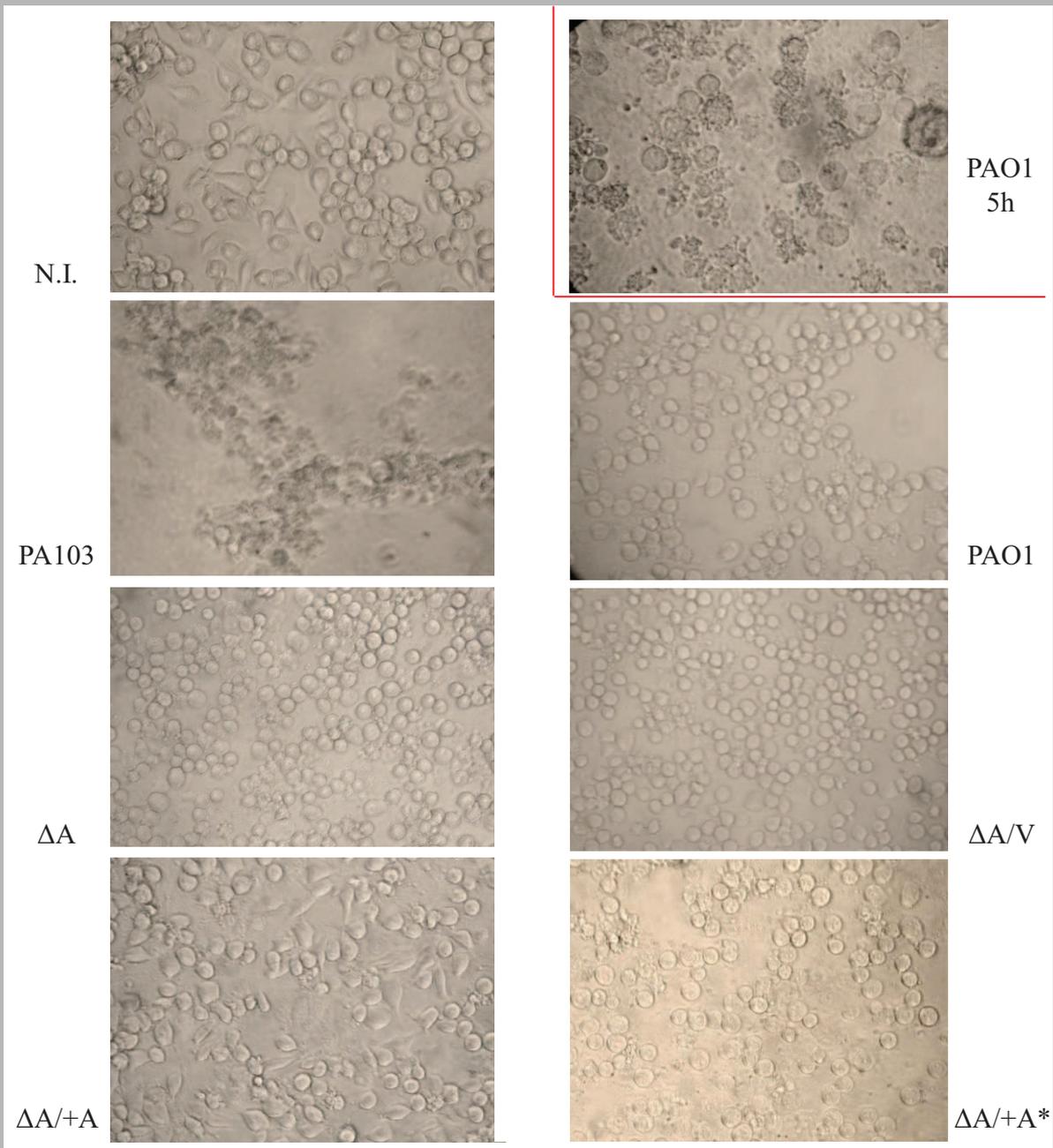
wt indique: PAO1 sauvage, ΔA : PAO1  $\Delta plpA$ , V : pMMB67, +A : pMMB67-*plpA*, +A\* : pMMB67-*plpA*<sub>S40A</sub>.

Ces résultats sont représentatifs d'une expérience réalisée 3 fois, dont chaque condition a été testée en triplicat. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type moyen.

correspond à des réarrangements du cytosquelette suite à une dépolymérisation des filaments d'actine conduisant à l'arrondissement de la cellule et au détachement du support sur lequel elle adhérerait. La morphologie est généralement observée sur des cellules épithéliales, dont les changements de forme sont plus facilement constatables que pour des macrophages, qui sont des cellules plutôt rondes.

La cytotoxicité de PlpA sur macrophages RAW264.7 a été suivie en mesurant après infection la libération de la lactate déshydrogénase (LDH), une enzyme cytosolique eucaryote. Son relargage est un témoin de l'altération des membranes plasmiques, et donc de la cytotoxicité de la souche infectieuse. Nous avons observé un phénotype cytotoxique qui corrèle les résultats obtenus sur la mortalité précédemment décrite : la cytotoxicité de la souche PAO1 $\Delta$ *plpA* est supérieure à celle de la souche sauvage PAO1, et elle est diminuée par la complémentation en *trans* de la mutation par le gène sauvage *plpA*<sub>V5/6His</sub> (Fig.88). Les résultats des expériences de cytotoxicité corroborent donc ceux des expériences de mortalité.

Pour le test morphologique, des cellules épithéliales humaines HeLa ont été infectées dans les mêmes conditions que précédemment décrit (Fig.89). Le fort pouvoir cytotoxique de la souche PA103 se traduit par une lyse totale des cellules après 3 heures d'infection, seuls des fantômes de cellules étant observables dans ce cas. A l'inverse, des cellules non infectées sont pour la plupart étalées, adhérentes au support, et montrent de nombreuses extensions plasmiques, avec une forme étirée caractéristique. La souche PAO1 de *P. aeruginosa* entraîne un arrondissement de la quasi-totalité des cellules qui se détachent de leur support. De plus, on observe des cellules fragmentées (particulièrement au temps 5h), comme si la membrane était en train de former des vésicules. La souche PAO1 $\Delta$ *plpA* provoque un phénotype morphologique identique. En revanche, la complémentation de cette mutation par le gène sauvage *plpA*<sub>V5/6His</sub> provoque un changement de phénotype assez net. En effet, les cellules infectées par cette souche forme une population hétérogène au sein de laquelle on retrouve des cellules arrondies, quelques cellules fragmentées, mais principalement de nombreuses cellules présentant une morphologie intacte et jamais observable avec les souches PAO1 et PAO1 $\Delta$ *plpA*, et ce, même au temps 5h d'infection. Ces résultats corroborent ceux obtenus lors du test de mortalité, et semblent ici aussi indiquer que PlpA protège les cellules épithéliales des effets de *P. aeruginosa*.



- Figure 89 -

### PlpA prévient l'arrondissement des cellules

Les souches bactériennes indiquées (sauvages, mutantes ou complémentées) ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance, collectées, lavées et mises en contact avec des cellules épithéliales HeLa (MOI = 10). Après 3h d'infection, les cellules sont observées en microscopie optique (grossissement x600). La souche PA103 de *P. aeruginosa* est utilisée comme contrôle positif de mortalité. Dans l'encart en haut à droite, grossissement des cellules épithéliales infectées par PAO1 pendant 5h. wt indique PAO1 sauvage,  $\Delta A$  : PAO1  $\Delta plpA$ , V : pMMB67, +A : pMMB67-*plpA*, +A\* : pMMB67-*plpA*<sub>S40A</sub>, NI : non infecté

#### II.4.2. L'activité patatine serait responsable de cet effet

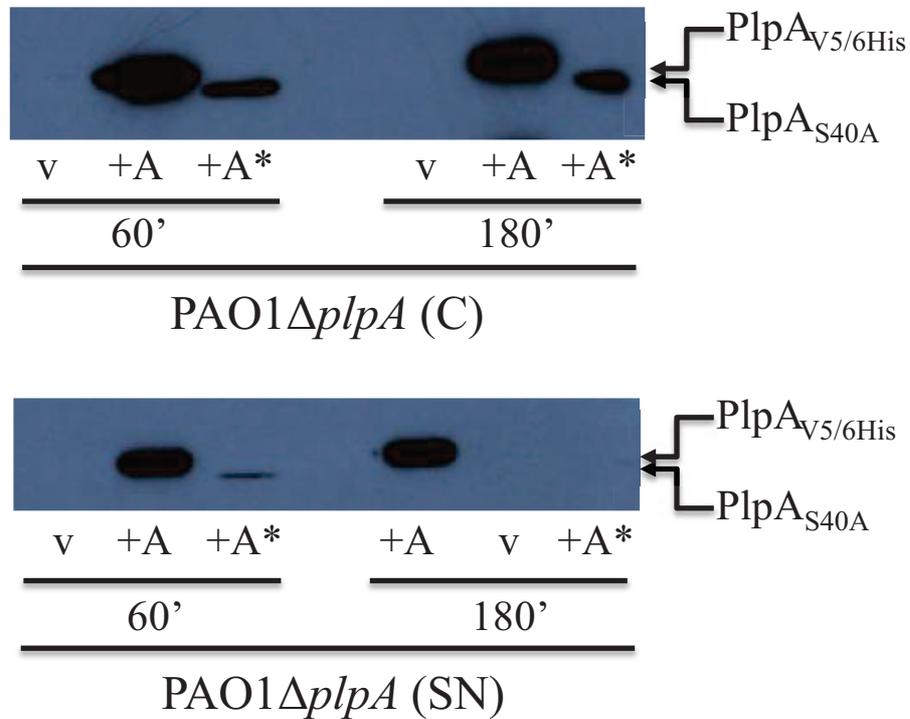
Nous avons voulu déterminer si l'activité PLA<sub>2</sub> putative de PlpA jouait un rôle dans cet effet. Un mutant catalytique a été construit à cet effet en substituant la Sérine 40 de PlpA en Alanine (PlpA<sub>S40A</sub>) par mutagenèse dirigée en PCR chevauchante. Le gène codant *plpA<sub>S40A</sub>* a été cloné sur un vecteur navette (pRS21) et placé sous le contrôle d'un promoteur *lac*, inductible à l'IPTG.

Lors des expériences précédentes d'infection, la mutation  $\Delta plpA$  a été complétée en *trans* par cette forme mutante produite depuis le plasmide pRS21. Les résultats obtenus indiquent que la complémentation par la forme mutée PlpA<sub>S40A</sub> provoque des effets identiques à ceux observés avec la souche PAO1 $\Delta plpA$ , que ce soit au niveau du taux de mortalité (Fig. 87), du phénotype morphologique (Fig. 88), ou de la cytotoxicité (Fig. 89). Là où la complémentation par la forme sauvage de PlpA entraînait toujours une amélioration de l'état/viabilité des cellules, PlpA<sub>S40A</sub> n'est pas capable de restaurer un phénotype sauvage. Cette forme de PlpA est donc inactive. Ceci semble donc indiquer que la substitution de la Sérine catalytique putative en Alanine est critique pour le rôle joué par PlpA, suggérant donc que celle-ci puisse effectivement appartenir au site catalytique, et donc que PlpA possède bien une activité de type PLA<sub>2</sub> requise pour sa fonction.

#### II.4.3. Discussion : PlpA, une « cytoprotectine » ? une « retardine » ?

Nous avons testé le phénotype de PlpA en émettant l'hypothèse qu'elle pourrait se comporter de manière similaire à ExoU. Similaire seulement, et non identique, car la souche PAO1 de *P. aeruginosa* est une souche bien moins cytotoxique (elle est d'ailleurs qualifiée d'invasive (Fleiszig *et al.*, 1997a)) que n'importe quelle souche produisant ExoU. Par conséquent, les résultats obtenus sont surprenants, car il apparaît que PlpA puisse jouer un rôle cytoprotecteur : autant sur le plan de la mortalité, que sur le plan morphologique, la présence de PlpA se traduit par un meilleur état des cellules infectées.

Il est intéressant de noter malgré tout que l'effet entrevu, à savoir une protection de la cellule infectée, n'est pas absolu. En effet, la présence de PlpA (produite à partir de la version chromosomique du gène ou depuis un plasmide) ne bloque pas la mortalité, mais la ralentit.



- Figure 90 -

Production et sécrétion de PlpA<sub>S40A</sub>

La souche PAO1 $\Delta$ *plpA* transformée par le pMMB67 (v), le pRS6 (+A) ou le pRS21 (+A\*), a été cultivée en milieu riche à 37°C. L'expression des gènes a été induite par ajout d'IPTG 1mM pendant 60 et 180 minutes, et les cellules (C) et les surnageants de culture (SN) ont été préparés et analysés comme précédemment décrit. L'immunodétection a été faite avec un anticorps polyclonal  $\alpha$ -PlpA. L'équivalent de 0,1 et 1 UDO<sub>600</sub> a été déposé pour les cellules et les surnageants de culture respectivement

Ainsi, au temps 5h d'infection, la mortalité est plus importante qu'au temps 3h. Au niveau morphologique, il en va de même : en quantité physiologique, la protection de PlpA n'est pas suffisante pour assurer un arrondissement moindre des cellules infectées. Elle n'y parvient que lorsqu'elle est produite depuis un plasmide, vraisemblablement dans des quantités supérieures à celles naturelles. Si on analyse ces résultats dans un sens opposé, on observe que la perte de PlpA n'entraîne pas pour autant une altération supplémentaire de l'état des cellules. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'il est connu que la souche sauvage PAO1 provoque un arrondissement des cellules infectées. Dans ce contexte, l'absence de PlpA ne peut entraîner une gradation dans l'arrondissement des cellules. PlpA semble donc retarder la dégradation de l'état des cellules infectées.

Nous avons également voulu déterminer si l'activité putative de PlpA était impliquée dans ce rôle. La complémentation de la délétion du gène *plpA* par un mutant de la Sérine catalytique putative ne reproduit pas le phénotype observé lors de la complémentation avec une version sauvage de PlpA. Ceci nous apprend donc que PlpA possède à priori une activité, tout comme ExoU ou PlpD, que la Sérine 40 serait donc la Sérine catalytique, mais surtout, que l'activité lipolytique est impliquée dans la fonction de protection que nous avons observée. Cette conclusion est toutefois à pondérer par le fait que nous n'avons observé *in vitro* qu'une faible sécrétion de PlpA<sub>S40A</sub>, associée à une plus faible production par rapport à PlpA<sub>V5/6His</sub> (Fig.90). Bien que les expériences d'infection que nous avons menées fassent intervenir des conditions de sécrétion *in vivo*, et que dans ces conditions, il est possible que PlpA<sub>S40A</sub> soit effectivement sécrétée et injectée (comme il semblerait que ce soit le cas pour PlpA<sub>wt</sub> dont on ne détecte pas la sécrétion *in vitro*), on ne peut écarter que l'absence d'effet de PlpA<sub>S40A</sub> soit liée à un défaut de sécrétion.

Pour résoudre ce problème, deux approches complémentaires sont envisageables (i) tester l'effet des protéines purifiées sur les cellules et (ii) déterminer si ces protéines sont transloquées dans les cellules hôtes lors de l'infection. Dans la première hypothèse, si PlpA a une action depuis l'extérieur de la cellule, on pourra ainsi compléter phénotypiquement la délétion du gène *plpA*, et dans ces conditions, si PlpA<sub>S40A</sub> n'a pas d'effet, cela ne pourra être expliqué que par la substitution du résidu catalytique. Si PlpA n'a pas d'action depuis l'extérieur, on ne pourra conclure. C'est pourquoi la deuxième hypothèse, une action donc depuis l'intérieur de la cellule est à tester. Nous nous proposons d'aborder ce point en ajoutant sur PlpA et PlpA<sub>S40A</sub> une étiquette rapportrice GSK (glycogen synthase kinase) de la



translocation (Garcia *et al.*, 2006). Cette étiquette de 14 résidus est uniquement phosphorylable par une Ser-Thr kinase eucaryote, phosphorylation qui est aisée à détecter par des anticorps anti GSK phospho-spécifiques. Cette approche pourrait nous renseigner sur l'injection de ces protéines dans les cellules hôtes au cours de l'infection.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus ne nous permettent pas de l'affirmer avec une certitude absolue, mais ils suggèrent malgré tout que PlpA agisse de manière opposée à ExoU, en protégeant de manière temporaire les cellules infectées. Quel pourrait bien être l'avantage retiré par *P. aeruginosa* d'un tel processus ? Bien qu'étant considéré comme un pathogène extracellulaire, il semble de plus en plus évident que cette bactérie puisse adopter durant de courtes périodes un mode de vie intracellulaire. Ainsi dans des cellules épithéliales bronchiques infectées par *P. aeruginosa*, des « pod-like » structures de bactéries intracellulaires ont pu être observées en microscopie électronique (Garcia-Medina *et al.*, 2005). En outre, les travaux de l'équipe du Pr. J. Engel ont largement participé à démontrer que *P. aeruginosa* entre par la face baso-latérale des cellules épithéliales lésées, en recrutant et en activant la voie de signalisation des kinases Akt et PI3K (Kierbel *et al.*, 2005) pour promouvoir les réarrangements du cytosquelette d'actine nécessaires à son internalisation. Cette internalisation transitoire interviendrait sans doute dans le but de protéger la bactérie contre les défenses immunitaires de l'hôte ou les antibiotiques. Elle pourrait être un préalable à l'établissement d'un biofilm dans les poumons, ou lui permettrait d'atteindre des tissus plus profonds par transcytose. Dans ces conditions, il devient intéressant pour *P. aeruginosa* de posséder des systèmes permettant de ménager son refuge, la cellule qui l'abrite temporairement, afin d'éviter par exemple qu'elle n'entre en apoptose. Bien évidemment, il ne s'agit que de conjectures, mais cela aurait l'élégance de rappeler le rôle joué par les patatines végétales, à savoir assurer une meilleure protection de l'organisme contre les infections et autres stress.

Cela pourrait aussi être à mettre en relation avec PlpD : bien que nous ne connaissions pas son rôle, nous savons qu'elle devrait en avoir un (puisque'elle est active). Les organismes bactériens dans lesquels elle est retrouvée nous ont conduits à émettre l'hypothèse d'un rôle assurant un avantage sélectif pour ces organismes. En particulier, des homologues de PlpD sont retrouvés dans plusieurs espèces colonisant les tractus intestinaux et pulmonaires. Il est donc possible que les PLPs de la souche PAO1 jouent un rôle nettement différent de celui d'ExoU, et qu'elles aident plus leur organisme à survivre qu'à attaquer.



## III. Les Systèmes de Sécrétion chez *P. aeruginosa*

---

La sécrétion de protéines est un processus permettant le transport de protéines depuis le cytoplasme jusqu'au compartiment extracellulaire. Elle fait intervenir un certain nombre de protéines agencées en différents complexes macromoléculaires, dont le rôle est de permettre aux protéines sécrétées la traversée de chacune des deux membranes bactériennes (pour les bactéries à Gram négatif). Ces complexes sont appelés « Système de Sécrétion de Type X », où X représente le numéro du système de sécrétion. A l'heure actuelle, six systèmes de sécrétion ont été caractérisés chez les bactéries à Gram négatif, du SST1 au SST6.

A l'exception du SST4, toutes ces machineries de sécrétion ont été identifiées et étudiées chez *P. aeruginosa*. Au-delà de la présence de cinq systèmes sur six connus à l'heure actuelle, une autre observation rend cette bactérie particulièrement intéressante pour l'étude de la sécrétion de protéines : ces systèmes sont pour la plupart présents en plusieurs copies. Seul le SST3 est présent en simple copie chez cette bactérie. Il n'y a pas moins de trois SST1, deux SST2 complets et un incomplet (plus un troisième complet dans la souche clinique PA7 (Roy *et al.*, 2010)), trois SST5a et sept SST5b, et trois SST6. La multiplicité de ces systèmes permet d'étudier, entre autres, les signaux permettant la spécificité de sécrétion par un système plutôt qu'un autre, l'interchangeabilité des composants entre deux machineries du même système, les différentes implications des systèmes dans les divers processus de pathogénicité.

Historiquement, depuis plus de vingt ans, notre laboratoire a mené des études sur tous ces systèmes de sécrétion, en découvrant même certains d'entre eux. C'est ainsi que le SST1 Apr, les deux SST2 Xcp et Hxc, et un SST5b atypique ont été identifiés chez *P. aeruginosa*. Ces études portent autant sur la mécanistique de la sécrétion (son fonctionnement, et ses acteurs) que sur les substrats sécrétés (leur activité, leur phénotype, leurs cibles). Nous avons récemment soumis une revue à ce sujet (qui a été acceptée) dans « *International Journal of Medical Microbiology* », dans laquelle les systèmes de sécrétion de *P. aeruginosa* décrits expérimentalement sont abordés, de même que les substrats connus et démontrés.



# REVUE

---

## « **Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons** »

Sophie Bleves, Véronique Viarre, **Richard Salacha**, Gérard P. F. Michel, Alain Filloux,  
and Romé Voulhoux

*International Journal of Medical Microbiology*, Accepté



**Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*:  
A wealth of pathogenic weapons**

**Sophie Bleves<sup>1</sup>, Véronique Viarre<sup>1</sup>, Richard Salacha<sup>1</sup>, Gérard P. F. Michel<sup>1</sup>, Alain Filloux<sup>2</sup> and Romé Voulhoux<sup>1</sup>**

From Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires (LISM-UPR 9027), CNRS and Université de la Méditerranée, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille cedex 20, France<sup>1</sup>. Centre for Molecular Microbiology and Infection (CMMI), Division of Cell and Molecular Biology, Imperial College London, London SW7 2AZ, United Kingdom<sup>2</sup>

Address correspondence to: Romé Voulhoux, LISM-UPR 9027, CNRS, IMM, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France. Tel +33 4 91 16 41 26; Fax +33 4 91 71 21 24; Email: [voulhoux@ifr88.cnrs-mrs.fr](mailto:voulhoux@ifr88.cnrs-mrs.fr). Alain Filloux, CMMI, Imperial College London, London SW72AZ, United Kingdom; Email: [afilloux@imperial.ac.uk](mailto:afilloux@imperial.ac.uk).

## Summary

Pathogenic micro-organisms have to face hostile environments while colonizing and infecting their hosts. Unfortunately, they can cope with it and have evolved a number of complex secretion systems, which direct virulence factors either at the bacterial cell surface, into the environmental extracellular milieu or into the host cell cytosol. Six different classes of secretion systems have been described so far, currently identified as type I secretion system (T1SS) and up to type VI secretion system (T6SS). The Gram-negative opportunistic human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* possesses a broad panel of secretion systems. Five of the six secretion machines characterized in Gram-negative bacteria are at *P. aeruginosa* disposal, sometimes in several copies. All these machines are dedicated to the specific secretion of exoproteins, which display various activities useful for bacterial adaptation to the environment or for bacterial pathogenicity. This review will summarize the functional organization of these different secretion systems, which could constitute potential targets for therapeutic treatment of patients infected by one of the most potent nosocomial pathogen identified nowadays.

## Keywords

*Pseudomonas aeruginosa*; Gram-negative bacteria; Protein secretion systems; secretome; pathogenicity

## Introduction

In the course of an infection, bacterial pathogens are facing the hostile environment of the host. These microorganisms have to fight for their life by seeking out essential nutrients and avoiding eradication by the host immune system. In the game they play with their host, they can also be skilful strategists and manipulate the host cell response for their own benefit. Most of these processes rely on a large number of proteins, which are deliberately released by the bacteria. These proteins could remain bound at the bacterial cell surface, be freed in the extracellular medium or be injected into the host cell cytosol. We quote this protein release mechanism with the term secretion.

In Gram-negative bacteria, protein secretion is achieved after crossing the envelope formed by two hydrophobic barriers, the cytoplasmic, or inner membrane (IM), and the outer membrane (OM) delimiting the peptidoglycan-containing aqueous compartment, the periplasm (P). Molecular microbiologists have revealed over the last few decades the immense diversity of the mechanisms evolved by Gram-negative bacteria to secrete biologically active exoproteins. Six different classes of secretion systems have been described, which are identified as type I secretion system (T1SS) up to type VI secretion system (T6SS) (Economou, et al., 2006). A type VII secretion system has been tentatively quoted in *Mycobacterium* species (Abdallah, et al., 2009), but we wish to keep the “Type” nomenclature for Gram-negative bacteria and will thus not consider this system in our overview.

Secretion via T2SS and T5SS occurs in a two-step process including a stopover in the periplasm. Exoproteins using these pathways are synthesized as precursors, and their cleavable N-terminal signal peptide is used for targeting to the Sec or the Tat export

machineries (Michel and Voulhoux, 2009). These macromolecular complexes, also called translocons, are involved in the passage of the exoproteins across the IM. The Sec system promotes export of unfolded proteins whereas the Tat pathway promotes export of folded proteins, which need to accommodate cytoplasmic co-factors prior to their translocation into the periplasm. Further translocation across the OM is then achieved by the dedicated secretion systems, T2SS or T5SS. Secreted proteins using either one of these two systems are usually released in the extracellular medium or remain bound to the bacterial cell surface. In contrast, T1SS, T3SS, T4SS and likely T6SS are using a one-step mechanism, promoting the direct delivery of exoproteins into the extracellular medium (T1SS), or into the host cell (T3SS, T4SS and T6SS). In all these cases, the proteins are not synthesized with a signal peptide but carry a so-called secretion signal, whose detailed characterization varies from one system to the other. In addition, alternative routes for secretion such as non-classical secretion (secretion without any identified secretion machinery) or outer membrane vesicles (OMVs)-mediated secretion have also been suggested (Bendtsen and Wooldridge, 2009) but these pathways have not been yet studied in molecular details.

The opportunistic Gram-negative pathogen *Pseudomonas aeruginosa* is responsible for a wide range of human diseases, including septicemia, pneumonia and several other kinds of infections. This bacterium is implicated in acute and chronic infections, such as in the respiratory tract of cystic fibrosis (CF) patients. Except for the T4SS, all the other secretion machines described in Gram-negative bacteria have been identified in *P. aeruginosa* (Fig. 1). Thanks to this secretion arsenal, *P. aeruginosa* is able to produce and release a very broad variety of exoproteins. Most of these secreted proteins are toxins and hydrolytic enzymes, making *P. aeruginosa* as an ideal model organism to study protein secretion and as one of the most versatile pathogenic bacterium.

## **Type I secretion system or T1SS**

### **Organization of the machinery**

T1SS is one of the simplest bacterial secretion systems described to date. It requires an OM protein, an ABC (ATP-Binding Cassette)-transporter, which is inserted in the IM and provides energy to the transport process, and an adaptor protein connecting these two components (Delepelaire, 2004) (Holland, et al., 2005). The OM component of the T1SS machinery is exemplified by the trimeric protein TolC. Structural studies on TolC have represented a real breakthrough in the field by revealing an unprecedented organization for an OM protein. Indeed, each subunit contains four  $\beta$ -strands contributing to the formation of a single 12-stranded  $\beta$ -barrel, which resembles other OM  $\beta$ -barrels such as in porins. Moreover, several  $\alpha$ -helices projecting from this  $\beta$ -barrel form a long tunnel of 100 Å into the periplasm (Koronakis, et al., 2000). This observation sheds light on the concept of one-step translocation by explaining the absence of requirement for a periplasmic intermediate.

T1SS substrates are targeted to the secretion machinery by a non-cleavable C-terminal secretion signal (Duong, et al., 1996). These exoproteins are secreted in an unfolded form and interact, at least transiently, with both the ABC-transporter and the adaptor components (Binet, et al., 1997). Interaction of the secretion signal with the nucleotide binding domain (NBD) of the ABC-transporter is thought to induce a conformational

change promoting binding and hydrolysis of ATP at the NBD. The energy-driven conformational changes further move the T1SS substrate through the secretion system (Holland, et al., 2005).

### **Type I secretion in *P. aeruginosa*.**

In *P. aeruginosa*, two T1SS have been studied experimentally. The Apr system consists of AprD (ABC transporter), AprE (adaptor) and AprF (OMF) and is involved in the extracellular secretion of the alkaline protease AprA and of AprX, a protein of unknown function (Table 1) (Guzzo, et al., 1991, Duong, et al., 2001). Like most secreted proteases, AprA is a recognized virulence factor involved in various *Pseudomonas* infections (Matsumoto, 2004). The other characterized T1SS is involved in utilization of iron and requires the *has* genes. The secreted protein HasAp (Table 1) is an hemophore, which binds heme from haemoglobin. The HasAp-heme complex is addressed to the OM receptor, HasR, which further drives heme internalization (Wandersman and Delepelaire, 2004). The T1SS used for HasAp secretion is classically consisting of HasD (ABC transporter), HasE (adaptor) and HasF (OMF) (Letoffe, et al., 1998, Ma, et al., 2003). The very low concentration of iron available to a pathogen within its host could thus be overcome by the secretion of hemophores, which capture heme from hemoglobin. In this context, HasAp is likely a crucial component for *P. aeruginosa* survival in the early stages of infection (Wandersman and Delepelaire, 2004).

Other T1SS have been described in *P. aeruginosa* (Ma, et al., 2003), but in these cases no specific substrate has been reported so far.

## **Type II secretion system or T2SS**

### **Organization of the machinery**

The T2SS or secreton is one of the most versatile systems used by Gram-negative bacteria to secrete extracellular proteins in the surrounding environment (for review see Filloux, 2004 and Michel and Voulhoux, 2009). It is unique in its ability to promote OM translocation of large multimeric exoproteins that are already folded in the periplasm. The T2SS is broadly conserved in Gram-negative bacteria and involves a set of 11–16 different proteins, which are given the generic names GspC-M, GspAB, GspN, GspO, and GspS, in which Gsp stands for “General Secretory Pathway”. Based on homologies with the type IV pili assembly system (Peabody et al., 2003), the T2SS can be viewed as a molecular nanomachine consisting of three parts. First, a protein platform is setting up the basis of the machine at the inner membrane (GspCEFLM components) and is using ATP as fuel for the GspE motor (ATPase). Second, a large channel constituted by a multimeric structure is embedded in the outer membrane (the secretin GspD). Third, a fimbriar structure called the pseudopilus, which is formed by the assembly of the major pseudopilin GspG (Sauvonnnet et al., 2000; Kohler, et al., 2004) and capped with the minor pseudopilins GspI-K (Korotkov and Hol, 2008). The proposed role of the pseudopilus is to function as a piston, whose assembly is driven by the GspE ATPase, and which pushes exoproteins through the secretin channel out of the cell.

### **Type II secretion in *P. aeruginosa*.**

In *P. aeruginosa*, the Xcp (extra<sup>c</sup>ellular protein) T2SS is encoded by a set of 11 genes organized in two divergent operons, *xcpP* to *Q* and *xcpR* to *Z* whereas a twelfth

gene, *xcpA/pilD*, is located outside of the two *xcp* operons (Fig. 1). *xcpA/pilD* encodes a peptidase involved in the maturation of the five T2SS pseudopilins (XcpT-X) and all other known pseudopilins and pilins of *P. aeruginosa* except for the Flp pilin, which is cleaved by FppA, the second prepilin peptidase of *P. aeruginosa* (Ruer, et al., 2007). The ATPase XcpR directly interacts with XcpY and forms an IM complex with XcpZ and XcpS (Robert, et al., 2005a). A fourth inner membrane protein, XcpP (Bleves, et al., 1996), is interacting at least transiently with the outer membrane secretin XcpQ. This interaction between the GspC (XcpP) and the GspD (XcpQ) components seems to be crucial and confers specificity to the secretion system (Gerard-Vincent, et al., 2002). Interestingly, two other genes, *xphA* and *xqhA*, homologous to *xcpP* and *xcpQ*, respectively, have been identified (Michel, et al., 2007). These orphan genes are located at a distant locus from the *xcp* gene cluster encoding components of the classical T2SS (Fig. 1). The *xphA* and *xqhA* gene products form a T2SS subunit that can associate with the XcpR-Z components of the classical T2SS to make a functional hybrid machinery. This machinery has its own specificity and even though it can promote secretion of most of the substrate of the classical Xcp T2SS, it is unable to translocate the aminopeptidase PaAP (Michel, et al., 2007). More generally, it is proposed that the GspC component (XcpP or XphA) is a signal-transducing protein switching on and off the secretion process (Robert, et al., 2005b) by modulating the GspD (XcpQ or XqhA) central channel opening. The OM protein XcpQ is assembled as multimers of 12 subunits forming a ring-shaped structure with a central cavity of 90 Å diameter. The secretin thus constitutes a very large channel through which even folded exoproteins could pass.

Finally, five Xcp proteins (XcpT-X) are called pseudopilins. As for the type IV pilin PilA, pseudopilins possess a cleavable N-terminal sequence of six or seven residues followed by a hydrophobic alpha-helix and a C-terminal soluble domain. Pseudopilins are first targeted and exported across the IM by the Sec/SRP pathway (Arts, et al., 2007). The major pseudopilin XcpT is then assembled into a fimbriar structure called pseudopilus (Durand, et al., 2003; Alphonse et al., 2009). The precise mode of pseudopilus assembly as well as the involvement of the four minor pseudopilins (XcpU-X) in this process remains under debate. It is proposed that the XcpT-containing pseudopilus follows an assembly/disassembly cycle. Together with the four minor pseudopilins, it forms a piston, which pushes out proteins through the secretin channel towards the outside of the bacterial cell (Durand, et al., 2005, Douzi, et al., 2009). It should be noted that type IV pili retraction involves a second traffic ATPase, PilT. No such a component has been found to be required for the pseudopilus function, which suggests that it involves a different retraction process.

In addition to the initially characterized T2SS Xcp, *P. aeruginosa* possesses a second T2SS only functional in phosphate-limiting growth conditions, the Hxc (homologous to *xcp*) system (Ball, et al., 2002). Although *hxc* gene organization is completely different from that of the Xcp system, the structural organization of the Xcp and Hxc machineries is thought to be very similar. In contrast to Xcp, the Hxc system has been shown to secrete only one substrate, the low molecular weight alkaline phosphatase LapA, produced under phosphate-limiting conditions.

## **Type II-dependent exoproteins and their role in virulence.**

*P. aeruginosa* can cause infections in patients compromised by underlying respiratory disease like bronchiectasis, CF and diffuse panbronchiolitis (Kon, et al., 1999). These infections are highly associated with the production of T2SS-dependent exoproteins listed in table 1. These exoproteins are characterized by a broad diversity of activities and include proteolytic enzymes such as the elastase LasB (the major extracellular protease) (Olson and Ohman, 1992), the staphylolysin LasA (Olson and Ohman, 1992), the aminopeptidase PaAP (Cahan, et al., 2001), PrpL or protease IV (Engel, et al., 1998) as well as the predicted metalloprotease PA0572 (Voulhoux and Michel unpublished). T2SS exoproteins do not present any conserved linear motif. They are folded in the periplasm, suggesting that the yet unknown secretion motif recognized by the secreton is likely to be conformational (Voulhoux, et al., 2000).

Elastase encoded by the *lasB* gene degrades elastin, a major component of the lung tissue and critical for its elasticity. It also cleaves surfactant protein D (SP-D), which is involved in several immune functions such as bacterial aggregation, alteration of alveolar macrophage function and regulation of bacterial clearance (Alcorn and Wright, 2004). More generally, although extracellular proteases are known to participate in *P. aeruginosa* keratitis (Matsumoto, 2004), their activity significantly contributes to tissue damages during respiratory infections (reviewed by Kipnis et al., 2006; de Bentzmann et al., 2000). Another family of T2SS-secreted proteins are the enzymes catalyzing lipid metabolism such as LipA and LipC lipases (Stuer, et al., 1986; Martinez, et al., 1999), phospholipases C, PlcH and PlcN (Ostroff et al., 1990), which are targeted to eukaryotic membrane, and PlcB (Barker et al., 2004), a phospholipase specific for phosphatidylethanolamine (Table 1). Two alkaline phosphatases, PhoA and LapA, are respectively secreted by the Xcp and the Hxc T2SSs. The Xcp system also secretes a chitin-binding protein called CbpD that could have a role in pathogenicity as an adhesin mediating colonization of eukaryotic cells (Folders et al., 2000).

Exotoxin A (ToxA) is the only AB toxin with an intracellular target secreted by a T2SS in *P. aeruginosa*. Since it is a T2SS-dependent protein, ToxA is released in the extracellular milieu but this enzyme is then capable of self-targeting to the eukaryotic target cell. The three-dimensional structure of ToxA displays three distinct domains (Allured et al., 1986) characteristic of AB toxins. Domain I is responsible for cell recognition, domain II is involved in translocation of the toxin across the membrane of intracellular compartments and domain III forms the catalytic domain leading to ADP-ribosylation of elongation factor 2, which results in protein synthesis inhibition and cell death.

## **Regulation of *P. aeruginosa* T2SSs**

It has been shown that genes encoding the classical *xcp* machinery are under the control of a global regulatory system known as Quorum-Sensing (QS) (Chapon-Herve et al., 1997). QS systems are complex cell-to-cell signalling systems that enable bacteria to sense cell density and to coordinate gene expression simultaneously within the whole bacterial population. In *P. aeruginosa*, the QS controls many of the virulence factors, and involves at least two pairs of genes (*lasR/I* and *rhlR/I*) that both directly control expression of *xcp* and most exoprotein-encoding genes (Lazdunski et al., 2004). Interestingly, not all the genes encoding Xcp-dependent exoproteins are regulated by QS.

For example, alkaline phosphatase, phospholipases C, PlcH and PlcN, are regulated by a two component regulatory system, PhoB/R, dependent on phosphate-limiting growth condition (Filloux et al., 1988). PhoB/R also controls the Hxc T2SS, and its cognate exoprotein, LapA (Ball et al., 2002; Viarre et Voulhoux unpublished). Recently, it has been reported that *hxc* genes could also be regulated by a cell-surface signaling system designated as PUMA3 (Llamas et al., 2009).

## **Type III Secretion System or T3SS**

### **Organization of the machinery**

A wide range of pathogens and symbionts are equipped with a T3SS that allows the injection of toxic proteins, called effectors, directly into the cytosol of host cells (Figure 2). The contact between bacteria and eukaryotic cells leads to the translocation of the type III effectors both across the bacterial envelope and the eukaryotic plasma membrane in a one-step mechanism. The activity of these effectors, which are often eukaryotic-like proteins, may modify the host response by mimicking the activity of the endogenous proteins, which results in host subversion.

The T3SS apparatus, also called the injectisome, is related to the flagellum assembly machine, both in term of similarities between the components but also in term of overall of architecture. Indeed, injectisomes of *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica*, or *Shigella flexneri* have been purified and visualized by electron microscopy as small syringes called also the needle complex, composed of an extracellular needle and a transmembrane cylindrical body (for review, see Cornelis, 2006).

### **Type III secretion in *P. aeruginosa***

In the *P. aeruginosa* PAO1 strain, five distinct operons located within a single genetic locus are involved in the biogenesis and the control of the type III secretion-translocation machinery (Fig. 1). In contrast, the genes encoding the effectors and their cognate chaperones are scattered around the chromosome. The *P. aeruginosa* needle-like filament is a straight hollow tube 60-80 nm long and 7 nm wide, made of PscF subunits (*Pseudomonas* secretion component) (Pastor et al., 2005, Soscia et al., 2007). The cytoplasmic PscE and PscG chaperones prevent PscF from premature polymerization in the cytoplasm (Quinaud et al., 2005). Furthermore, the PscP protein could serve as a molecular ruler controlling the PscF-needle length (Journet et al., 2003). Much less is known about the Psc proteins constituting the base of the needle-complex, although some functions can be inferred from the closely related *Y. enterocolitica* T3SS. PscN is likely to be the putative energizer since it displays similarity with the bacterial F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase (Woestyn et al., 1994). PscJ is thought to be the major component of the inner base of the needle-complex (Cornelis, 2006). PscC is a secretin that polymerizes, with the help of the PscW pilotin, to form a channel through the outer membrane (Koster et al., 1997), allowing the passage of the needle-like structure. One could note that secretins are found in two different secretion pathways, the T2SS and the T3SS.

Once the needle is assembled, the various exoproteins are transported through this conduit. Obviously, this is performed in a kinetic and ordered manner. The translocators PopB, PopD and PcrV may be the first proteins transported to form a pore within the eukaryotic cell membrane, in the continuity of the PscF needle. PopB and PopD have hydrophobic domains, which allow their insertion into the eukaryotic cell membranes.

PopB and PopD have been shown to polymerize *in vitro* and to form oligomeric rings, which confirm that they may form pores (Schoehn et al., 2003). The size of these pores inserted in erythrocytes membranes after infection with *P. aeruginosa* was estimated between 2.8-3.0 nm (Dacheux, et al., 2001). Both translocators share a cytosolic chaperone, PcrH that prevents premature interaction with the membranes. PcrV is necessary for the functional assembly of the PopB/D translocon but does not seem to be a structural component of the pore, as it does not interact with the pore-forming proteins (Goure et al., 2004). PcrV is localized at the tip of the needle, where this scaffold protein may facilitate the assembly of the translocation pore (Mueller et al., 2005). Interestingly, specific antibodies directed against PcrV mediated protection against *P. aeruginosa* infections by presumably inhibiting effector injection (Sawa et al., 1999).

### **The four *P. aeruginosa* T3SS effectors and their chaperones**

Once the translocon is inserted into the eukaryotic cell membrane, the T3SS effectors could then be transported through the needle, and injected into the host cell by going through the PoB/PopD pore. The T3SS effectors are targeted to the secretion machinery in an unfolded-state *via* a non-cleavable N-terminal secretion signal (Cornelis, 2006). *In vivo*, T3SS functioning is triggered by the contact with the eukaryotic cell, which leads to effector injection. *In vitro*, T3SS activity could be triggered by  $Ca^{2+}$  ions chelation in the culture medium leading to effector release in the surrounding medium (Hornef et al., 2000). Strains of *P. aeruginosa* have different combinations of genes encoding T3SS effectors and can be divided into two groups. The so-called cytotoxic strains possess *exoU*, *exoT* and sometimes *exoY* (e.g. strain PA103 or PA14), whereas invasive isolates possess *exoS*, *exoT* and often *exoY* (e.g. strain PAO1 or PAK) (Wolfgang et al., 2003). The basis for the incompatibility in *exoU* and *exoS* occurrence within the same *P. aeruginosa* strain is not known, but the carriage of *exoS* is more prevalent among *P. aeruginosa* clinical isolates (Kulasekara et al., 2006). Moreover, the available set of T3SS effectors defines the potential phenotype of the strain during infection. ExoU-producing strains cause a rapid necrotic cell death, while ExoS- producing strains are rather internalized, which results in a delayed cell death resembling apoptosis (For reviews see Engel and Balachandran, 2009 and Hauser, 2009).

ExoS and ExoT are bifunctional enzymes that include a GTPase-activating (GAP) function within the N-terminal domain and an ADP-ribosyltransferase activity within the C-terminal domain (Barbieri and Sun, 2004). They confer anti-phagocytotic capacities to *P. aeruginosa* mainly through their action on the actin cytoskeleton. ExoY is an adenylate cyclase that leads to cyclic AMP (cAMP) accumulation in the host cell (Yahr et al., 1998). ExoU is a potent phospholipase A<sub>2</sub> harbouring a patatin-like active site responsible for acute cytotoxicity and lung tissue damages (for review see Sato and Frank, 2004). ExoU and ExoS prevent interleukin production by alveolar macrophages and modulate the early inflammatory response. Remarkably, all *P. aeruginosa* T3SS effectors require an eukaryotic cofactor for their activity, which highlights their specific function in the host.

In addition ExoS and ExoT share the same cytoplasmic chaperone, SpcS (specific *Pseudomonas* chaperone) (Shen et al., 2008), and the ExoU chaperone is called SpcU (Finck-Barbancon et al., 1998). The essential function of T3SS chaperones remains a matter of debate. Among the various roles one can mention (i) keeping the effector in an

unfolded state competent for secretion, (ii) targeting to the T3SS apparatus, (iii) conferring kinetic and hierarchy to the secretion process, (iv) preventing membrane localization during the secretion process (Cornelis, 2006; Letzelter et al., 2006).

### **Transcriptional regulation**

The T3SS regulon consists of about 40 regulated genes, which are co-regulated and under the control of ExsA, a member of the AraC family of transcriptional activators (Frank, 1997). ExsA binds to a defined nucleotide sequence upstream of the RNA polymerase binding site of *T3SS* gene promoters. Transcription of the *T3SS* genes is induced under calcium-limited growth conditions or following intimate contact of *P. aeruginosa* with host cells. This mechanism requires a cascade of interactions involving four proteins: (i) ExsA is the master regulator, (ii) ExsD is an anti-activator, which directly binds to ExsA and inhibits its activity (McCaw et al., 2002), (iii) ExsC is an anti-anti-activator, which binds to and inhibits ExsD (Dasgupta et al., 2004), but is also an ExsE-chaperone, (iv) ExsE is a secreted anti-anti-antiactivator (Rietsch et al., 2005; Urbanowski et al., 2005). Under conditions that prevent secretion, ExsE remains intracellular, which favours formation of ExsE-ExsC and ExsA-ExsD complexes, thereby preventing ExsA-dependent transcription. Under low  $Ca^{2+}$  conditions or upon cell contact, ExsE is secreted or injected into host cells (Urbanowski et al., 2007). In the absence of ExsE, ExsC thus sequesters Exs D thereby making ExsA available to activate transcription of the *T3SS* genes.

Besides this dedicated pathway, the T3SS regulon is under the control of global regulatory systems involving cAMP biosynthesis (Wolfgang et al., 2003), two-component systems RetS/LadS/Gac-Rsm (Goodman et al., 2004; Ventre et al., 2006; Mulcahy et al., 2006), and a variety of stresses (For a review see Yahr and Wolfgang, 2006). The T3SS is co-regulated with the virulence factors required during the acute phase of infections, and its repression by QS suggests a requirement of T3SS functions before the establishment of a high cell density population thus at the early stage of an acute infection (Hogardt et al., 2004; Blevess, et al., 2005). Conversely, active repression of the T3SS might contribute to the persistence of chronic infections.

## **Type V secretion system or T5SS**

### **Organization of the machinery**

T5SS is the simplest secretion pathway described so far and it is widely represented in Gram-negative bacteria. It allows secretion through the bacterial envelope of large proteins associated with microbial adhesion and virulence. As for T2SS, T5SS is a two-step process. First, proteins cross the IM via the Sec export machinery, second, they are transported through an outer membrane (OM) channel formed by a  $\beta$ -barrel protein/module. Finally, exoproteins either remain associated with the outer face of the OM, or are released in the extracellular medium after a proteolytic cleavage. Two subtypes of T5SS exist in Gram-negative bacteria: the Autotransporters (AT, or T5aSS and T5cSS) and the Two-Partner Secretion (TPS, or T5bSS) (Fig.2).

### **Autotransporters (AT or T5aSS and T5cSS)**

ATs are capable of “autosecretion” (Dautin and Bernstein, 2007; Henderson et al., 2004; Linke et al., 2006). Those proteins are modular proteins consisting of a signal peptide at the extreme N-terminus, a  $\beta$ -domain of 12  $\beta$ -strands at the C terminus, and in

between, a “passenger” domain that harbours the catalytic domain of the protein. The signal peptide enables the export through the IM, and is then cleaved. Once in the periplasm, the C-terminus domain is inserted into the OM and forms a  $\beta$ -barrel leading either to the exposition of the passenger domain at the surface of the bacteria or to its release in the extracellular medium after cleavage by autoproteolysis or by a dedicated protease (Coutte et al., 2003; Hendrixson et al., 1997; Shere et al., 1997; van Ulsen et al., 2003). While  $\beta$ -barrels of T5aSS are formed by one single monomer,  $\beta$ -barrels of T5cSS are formed by a homo-trimer, in which each monomer contributes to 4 strands of the final  $\beta$ -barrel (Yeo et al., 2004; Surana et al., 2004; Nummelin, et al., 2004)

EstA is the only characterized AT in *P. aeruginosa* (Wilhelm et al., 1999). Its passenger domain possesses an esterase activity, *i.e.* EstA can hydrolyze glycerol esters with short- or long-chain fatty acid. Its catalytic site corresponds to the consensus motif GDSL, in which the serine residue is one of the three amino acids of the catalytic triad (Serine-Aspartate-Histidine). The EstA passenger domain is not cleaved and therefore remains anchored at the bacterial surface. It was demonstrated that EstA is involved in the production of rhamnolipids, and an *estA* defective mutant was shown to be deficient in twitching, swarming and swimming motilities, and thus in biofilm formation (Wilhelm et al., 2007).

Two other ATs, PA0328, and PA3535, have been predicted from the genome of the *P. aeruginosa* PAO1 strain (Stover et al., 2000; Filloux et al., 2003) (Fig. 1). These proteins may encode a putative aminopeptidase and a serine protease, respectively (<http://v2.pseudomonas.com/>).

### **Two-Partner Secretion (T5bSS)**

The TPS mechanism is very similar to the AT, except that the passenger domain and the  $\beta$ -domain are independent proteins, named TpsA and TpsB, respectively (Hodak and Jacob-Dubuisson, 2007; Mazar and Cotter, 2007). TpsA contains a TPS secretion motif and a functional/catalytic domain, whereas in TpsB, the  $\beta$ -domain is preceded by one or several POTRA domains (Polypeptide Transport-Associated). POTRA domains are proposed to be involved in protein-protein interaction, and in the case of TpsB, in the recruitment of the TpsA protein. They are found among members of the Omp85/BamA protein superfamily to which the TpsBs belong. The Omp85/BamA members are more generally involved in the assembly and proper localization of OM proteins (Voulhoux and Tommassen, 2004).

TpsA and TpsB proteins cross the IM via the Sec export pathway. The TpsA, synthesized as a pre-pro-protein, is converted into a pro-protein after maturation of its signal peptide. The TpsB inserted into the OM recruits the TpsA via one of its POTRA domains that interacts with the TPS motif of the TpsA (Clantin et al., 2004; Hodak and Jacob-Dubuisson, 2007). Once in the OM, the pro-protein TpsA undergoes an additional cleavage, leading to the mature TpsA protein (Jacob-Dubuisson et al., 2001), which remains either anchored at the bacterial surface or is released into the extracellular milieu. TpsB and AT  $\beta$ -barrels display different but typical features. In addition to the presence of the POTRA domain, TpsB  $\beta$ -barrels are composed of 16  $\beta$ -strands (Clantin et al., 2007; Hodak and Jacob-Dubuisson, 2007) whereas ATs are 12-stranded  $\beta$ -barrels (Oomen et al., 2004). Even if the primary sequence of all TpsB translocators is quite different, the structural conformation of those proteins is very well conserved (Yen et al., 2002).

Six TPS clusters have been annotated on the genome of the PAO1 strain of *P. aeruginosa*. Five are complete: *tps1*: PA0040-PA0041; *tps2*: PA0690-PA0692; *tps3*: PA2462-PA2463; *tps4*: PA4540-PA4541; *tps5*: PA4624-PA4625; and one of them is composed of an orphan *tpsA* gene: *tpsA6* (PA4082). Only two, TPS4 and TPS6, have been characterized (Fig. 1). The TpsB4 transporter (PA4540) named LepB is required for the secretion of the TpsA4 (PA4541) protein, LepA. LepA is a protease that activates the critical transcription factor NF- $\kappa$ B for host inflammatory and immune responses through digestion of human specific receptors (PAR-1, -2, or -4) (Kida et al., 2008). It should be pointed out that LepA was detected in the extracellular medium of clinical isolates, but not of the laboratory strain PAO1.

The *tpsA6* gene, also called *cupB5*, is located within the *cupB* gene cluster encoding chaperone usher pathway components involved in the assembly of CupB fimbriae. The CupB3 usher makes a pore in the OM through which pilin subunits transit to form fimbriae at the cell surface. Interestingly the CupB3 usher is also required for the secretion of the TpsA6/CupB5 protein that lacks a cognate TpsB transporter (Ruer et al., 2008). Since CupB3 is an usher protein carrying a POTRA domain, it has been called a P-Usher (for POTRA-containing Usher). In contrast to what is proposed for TpsB POTRAs, the POTRA of the P-Usher (CupB3) is more specifically required for proper folding of the TpsA (CupB5). If the P-usher/CupB3 lacks its POTRA, TpsA/CupB5 is misfolded. The misfolded TpsA/CupB5 blocks the CupB3 channel and prevents further assembly of CupB fimbriae. Thus, the CupB3 POTRA domain is crucial to properly coordinate fimbriae assembly and TpsA6/CupB5 secretion (Ruer et al., 2008). The TpsA6/CupB5 protein is a hemagglutinin-like protein that may be interwoven with the CupB fimbriae (Ruer et al., 2008).

## **Type VI secretion system or T6SS**

### **Organization of the machinery**

The most recently discovered secretion pathway in *P. aeruginosa* is the Type VI Secretion System (T6SS), which is widely spread in Gram-negative bacteria. Substrates for this secretion system were first described in *Vibrio cholerae* by Pukatzki and colleagues (Pukatzki et al., 2006) who demonstrated that proteins lacking a signal peptide, called Hcp (hemolysin coregulated protein) and VgrG (Valine-Glycine repeat), require a functional T6SS for their release in the extracellular medium.

However, several lines of evidence suggest that secreted Hcp- and VgrG-like proteins can also be considered as extracellular components, which are part of the T6SS machinery. On the one hand, the crystal structure of the *P. aeruginosa* Hcp1 protein reveals a hexameric-ring structure (Mougous et al., 2006), homologous to the tube domain of the T4 phage tail, the protein gp19 (Leiman et al., 2009). Moreover, Hcp1 rings readily polymerize in solution and form nanotubes with an internal diameter of 9 nm (Ballister et al., 2008, Leiman et al., 2009). On the other hand, the conserved N-terminal region of VgrGs shares similarities with the gp5 and gp27 T4 phage proteins. gp5 and gp27 multimers constitute the bacteriophage tail spike used for puncturing the bacterial envelope and to inject DNA into the cytoplasm (Kanamaru et al., 2002). The available crystal structure of the *Escherichia coli* CFT073 VgrG confirms the structural similarity between VgrGs and the gp5-gp27 complex (Leiman et al., 2009). It has been proposed that this VgrG domain is sitting at the tip of the Hcp-nanotubes, and may contribute to the

perforation of the bacterial cell envelope and/or the host cell membrane (Filloux et al., 2008; Pukatzki et al., 2007; Pukatzki et al., 2009). Interestingly, besides this peculiar function, VgrGs may also act as genuine effectors thanks to an additional C-terminal extension found in only some VgrGs, and called “evolved VgrGs”, (Pukatzki et al., 2007; Filloux et al., 2008; Pukatzki et al., 2009). For example, the C terminus of the VgrG-1 protein of *V. cholerae* resembles the actin cross-linking domain of the RtxA toxin (Pukatzki et al., 2007) and was shown to be delivered into macrophages after phagocytosis of the bacteria (Ma et al., 2009).

Other characterized T6SS components are: a ClpV ATPase belonging to the AAA<sup>+</sup> family, a regulatory FHA (Forkhead-associated) domain protein that is the target of a couple of Ser/Thr kinase and phosphatase, DotU- and IcmF-like proteins homologous to Type IV Secretion System (T4SS) components, and an outer membrane lipoprotein (Filloux et al., 2008; Aschtgen et al., 2008). Strikingly most of the other T6SS components are predicted to have a cytoplasmic localization.

### **T6SS in *P. aeruginosa***

The genome of the *P. aeruginosa* PAO1 strain contains three loci encoding T6SS components, called *HSI-I*, *HSI-II* and *HSI-III*, with about 15 to 20 genes each (Fig. 1). The post-translational control of the *P. aeruginosa* HSI-I machinery by threonine phosphorylation has been well documented (Mougous et al., 2007; Hsu, et al., 2009). Upon phosphorylation of the Fha1 protein by the Ser/Thr kinase PpkA, the cytoplasmic complex formed by Fha1 and the ATPase ClpV1 is directed to the membrane site of the HSI-I apparatus (Hsu et al., 2009). This activation may be coupled to the ClpV1-dependent disassembly of tubule-like structures, constituted by two T6SS components of unknown function, as shown in *V. cholerae* (Bonemann et al., 2009; Filloux, 2009).

The secretion of Hcp1 is so far the only example of a T6SS substrate in *P. aeruginosa* and the Hcp1 protein can be detected in the sputum of cystic fibrosis patients (Mougous et al., 2006). The secretion of this putative structural component cannot account for the role of the HSI-I machinery in *P. aeruginosa* virulence and persistence within the host (Potvin et al., 2003) and VgrGs or other HSI-I-dependent exoproteins are currently under study. Moreover, animal and plant infection studies reveal that both HSI-II and -III play important roles in *P. aeruginosa* virulence (Lesic et al., 2009). Furthermore, the phenotype of a double mutant affected in the two systems suggests that these machineries may functionally compensate for each other in the pathogenesis process.

### **Transcriptional regulation**

The three *P. aeruginosa* T6SS loci appear to have distinct evolutionary origins (Bingle et al., 2008). In agreement with this, they are differently regulated, which suggests that they act in different context and may perform different roles. The *HSI-I* gene cluster is regulated by two-component systems and sRNAs, (Goodman et al., 2004; Mougous et al., 2006), while *HSI-II* and *-III* are not. Moreover, QS represses *HSI-I*, while it activates *HSI-II* and *-III* as many other virulence such T1SS and T2SS (Lesic et al., 2009).

## Conclusion

*P. aeruginosa* secretion systems are diverse and complex. Such systems can be as simple as the T5aSS/T5cSS (one single accessory protein supporting the secretion of one exoprotein), or the T1SS (three different accessory proteins for one or two substrates). They can also involve much more complex machineries such as the T2SS (11 proteins assembled in a supramolecular structure with three functional units dedicated to the secretion of at least 13 exoproteins), or the T3SS (coordinated production of about 40 accessory proteins needed for the injection of three effectors into target cells). The T6SS is also of high complexity, with 12 to 25 accessory proteins constituting the machinery. In contrast to other systems the identity of the T6SS-dependent secreted proteins is not yet obvious, since Hcp1 is mostly considered as a component of the machinery rather than a real T6SS substrate. Hcp1 forms nanotubes and in this respect it may be compared to the T3SS needle or the T2SS pseudopilus.

The various degrees of complexity observed between the secretion machines are likely a matter of evolutionary origin rather than a deliberate choice of making things complex or not. Interestingly, some of these complex apparatuses are similar to machines involved in assembly of cell surface appendages like type IV pili (T2SS) or flagella (T3SS). It is thus tempting to speculate that at some points, these open gates to the external medium have been hijacked and used to release proteins extracellularly. The most simple ones, like the T5SS (AT or TPS), might have taken advantage of the  $\beta$ -barrel structure of porins or other OM proteins, to accommodate the release of larger substrates.

The different secretion machineries are dedicated to specific exoproteins, with all kind of activities useful for bacterial adaptation to the environment or to the host. All these systems differ by their mode of action. This diversity allows the secretion of either folded (T2SS) or unfolded proteins (T1SS, T3SS). The diversity also fine-tunes the final localization of the exoproteins, which is either at the bacterial cell surface, into the extracellular milieu or into target host cells. Among the five secretion systems present in *P. aeruginosa*, at least two, the T3SS and the T6SS, are believed to require a direct contact between the bacteria and the eukaryotic target cells in order to be effective.

We have shown along this review the great wealth of secretion machines and secreted proteins found in the model bacterium *P. aeruginosa*. This organism is originally an environmental strain that can be found in a broad diversity of niches such as on plants, in soil or humid environment for example. Such versatility may explain why *P. aeruginosa* has so many systems allowing growth and survival in so much distinct environments. Not only *P. aeruginosa* has evolved hydrolytic and scavenging systems to acquire nutriment and compete with other microorganisms, but it may have needed defence mechanisms against other organisms such as amoeba or nematodes, which are also found in those environments. The complexity and the variety of the regulatory mechanisms involved in controlling and coordinating the production of all these secretion systems in a timely manner is also a reflect of this environmental diversity.

Once *P. aeruginosa* entered in contact with immunocompromised human hosts, especially at the hospital, it is easy to imagine that, because of the availability of such an impressive secretion arsenal, it became one of the most dangerous opportunistic pathogens and is highly ranked in the classification of nosocomial agents. However, the potent guns that constitute secretion machineries may also represent its Achille's heel. Indeed, several research lines are using these molecular weapons as targets for the

development of antibacterials in order to block their functioning and avoid dissemination of virulence factors.

## Acknowledgement

We thank all members of the “protein secretion and pathogenicity in *P. aeruginosa*” group. Research in Romé Voulhoux laboratory is supported by the “3D-Pilus” young researcher ANR grant (ANR-JC 07-183230), the “Pathomics” Era-net PATHO grant (ANR-08-PATH-004-01) and the “EuroPathoGenomics” REX (LSHB-CT-2005512061-EPG) grant. Véronique Viarre and Richard Salacha are supported by grants from the French Ministry of Research and Technology (MRT). Alain Filloux is supported by the Royal Society and the MRC grant G0800171/ID86344.

## References

- Abdallah, A.M., Verboom, T., Weerdenburg, E.M., Gey van Pittius, N.C., Mahasha, P.W., Jimenez, C., Parra, M., Cadieux, N., Brennan, M.J., Appelmelk, B.J., Bitter, W., 2009. PPE and PE\_PGRS proteins of *Mycobacterium marinum* are transported via the type VII secretion system ESX-5. *Mol. Microbiol.* 73, 329-340.
- Alcorn, J.F., Wright, J.R., 2004. Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *J. Biol. Chem.* 279, 30871-30879.
- Allured, V.S., Collier, R.J., Carroll, S.F., McKay, D.B., 1986. Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0-Angstrom resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 1320-1324.
- Alphonse, S., Durand, E., Douzi, B., Waegelé, B., Darbon, H., Filloux, A., Voulhoux, R., Bernard, C., 2009. Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* XcpT pseudopilin, a major component of the type II secretion system. *J. Struct. Biol.* *In press*
- Arts, J., van Boxtel, R., Filloux, A., Tommassen, J., Koster, M., 2007. Export of the pseudopilin XcpT of the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion system via the signal recognition particle-Sec pathway. *J. Bacteriol.* 189, 2069-2076.
- Aschtgen, M.S., Bernard, C. S., De Bentzmann, S., Lloubes, R., Cascales, E., 2008. *J. Bacteriol.* 190, 7523-7531.
- Ball, G., Durand, E., Lazdunski, A., Filloux, A., 2002. A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 43, 475-485.
- Ballister, E.R., Lai, A.H., Zuckermann, R.N., Cheng, Y., Mougous, J.D., 2008. In vitro self-assembly of tailorable nanotubes from a simple protein building block. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 3733-3738.
- Barbieri, J.T., Sun, J., 2004. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 152, 79-92.
- Barker, A.P., Vasil, A.I., Filloux, A., Ball, G., Wilderman, P.J., Vasil, M.L., 2004. A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Mol. Microbiol.* 53, 1089-1098.
- Bendtsen, J.D., Wooldridge, K.G. . 2009. Non-classical secretion. In : Wooldridge, K.G. (ed), *Bacterial secreted proteins : Secretory Mechanisms and Role in Pathogenesis*. Caister Academic Press, Norfolk, pp 225-235.

- Binet, R., Letoffe, S., Ghigo, J.M., Delepelaire, P., Wandersman, C., 1997. Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters -a review. *Gene* 192, 7-11.
- Bingle, L.E., Bailey, C.M., Pallen, M.J., 2008. Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 3-8.
- Bleves, S., Lazdunski, A., Filloux, A., 1996. Membrane topology of three Xcp proteins involved in exoprotein transport by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 178, 4297-4300.
- Bleves, S., Soscia, C., Nogueira-Orlandi, P., Lazdunski, A., Filloux, A., 2005. Quorum sensing negatively controls type III secretion regulon expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 187, 3898-3902.
- Bonemann, G., Pietrosiuk, A., Diemand, A., Zentgraf, H., Mogk, A., 2009. Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for type VI protein secretion. *EMBO J.* 28, 315-325.
- Cahan, R., Axelrad, I., Safrin, M., Ohman, D.E., Kessler, E., 2001. A secreted aminopeptidase of *Pseudomonas aeruginosa*. Identification, primary structure, and relationship to other aminopeptidases. *J. Biol. Chem.* 276, 43645-43652.
- Chapon-Herve, V., Akrim, M., Latifi, A., Williams, P., Lazdunski, A., Bally, M., 1997. Regulation of the xcp secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 24, 1169-1178.
- Cornelis, G.R., 2006. The type III secretion injectisome. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 811-825.
- Dacheux, D., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y., Attree, I., 2001. Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol. Microbiol.* 40, 76-85.
- Dasgupta, N., Lykken, G.L., Wolfgang, M.C., Yahr, T.L., 2004. A novel anti-anti-activator mechanism regulates expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol. Microbiol.* 53, 297-308.
- De Bentzmann, S., Polette, M., Zahm, J.M., Hinnrasky, J., Kileztky, C., Bajolet, O., Klossek, J. M., Filloux, A., Lazdunski, A., Puchelle, E., 2000. *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors delay airway epithelial wound repair by altering the actin cytoskeleton and inducing overactivation of epithelial matrix metalloproteinase-2. *Lab. Invest.* 80, 209-219.
- Delepelaire, P., 2004. Type I secretion in Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1694, 149-161.
- Douzi, B., Durand, E., Bernard, C., Alphonse, S., Cambillau, C., Filloux, A., Tegoni, M., Voulhoux, R., 2009. The XcpV/GspI pseudopilin has a central role in the assembly of a quaternary complex within the T2SS pseudopilus. *J. Biol. Chem.* *In press*
- Duong, F., Bonnet, E., Geli, V., Lazdunski, A., Murgier, M., Filloux, A., 2001. The AprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: a new substrate for the Apr type I secretion system. *Gene* 262, 147-153.
- Duong, F., Lazdunski, A., Murgier, M., 1996. Protein secretion by heterologous bacterial ABC-transporters: the C-terminus secretion signal of the secreted protein confers high recognition specificity. *Mol. Microbiol.* 21, 459-470.
- Durand, E., Bernadac, A., Ball, G., Lazdunski, A., Sturgis, J.N., Filloux, A., 2003. Type II protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the pseudopilus is a multifibrillar and adhesive structure. *J. Bacteriol.* 185, 2749-2758.

- Durand, E., Michel, G., Voulhoux, R., Kurner, J., Bernadac, A., Filloux, A., 2005. XcpX controls biogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* XcpT-containing pseudopilus. *J. Biol. Chem.* 280, 31378-31389.
- Economou, A., Christie, P.J., Fernandez, R.C., Palmer, T., Plano, G.V., Pugsley, A.P., 2006. Secretion by numbers : Protein traffic in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 62, 308-19.
- Engel, L.S., Hill, J.M., Caballero, A.R., Green, L.C., O'Callaghan, R.J., 1998. Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 273, 16792-16797.
- Engel, J., Balachandran, P., 2009. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 61-66.
- Filloux, A., Bally, M., Soscia, C., Murgier, M., Lazdunski, A., 1988. Phosphate regulation in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning of the alkaline phosphatase gene and identification of *phoB*- and *phoR*-like genes. *Mol. Gen. Genet.* 212, 510-513.
- Filloux, A., Bleves, S., van Ulsen, P. and Tommassen, J., 2003. "Protein secretion mechanisms in *Pseudomonas*". In Ramos, J-L (ed) "*Pseudomonas* Vol I Genomics, life style and molecular architecture", Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp 749-792
- Filloux, A., 2004. The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim. Biophys. Acta.* 1694, 163-179.
- Filloux, A., Hachani, A., Bleves, S., 2008. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* 154, 1570-1583.
- Filloux, A., 2009. The type VI secretion system: a tubular story. *EMBO J.* 28, 309-310.
- Finck-Barbancon, V., Yahr, T.L., Frank, D.W., 1998. Identification and characterization of SpcU, a chaperone required for efficient secretion of the ExoU cytotoxin. *J. Bacteriol.* 180, 6224-6231.
- Folders, J., Tommassen, J., van Loon, L.C., Bitter, W., 2000. Identification of a chitin-binding protein secreted by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182, 1257-1263.
- Fox, A., Haas, D., Reimmann, C., Heeb, S., Filloux, A., Voulhoux, R., 2008. Emergence of secretion-defective sublines of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 resulting from spontaneous mutations in the *vfr* global regulatory gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1902-1908
- Frank, D.W., 1997. The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 26, 621-629.
- Gerard-Vincent, M., Robert, V., Ball, G., Bleves, S., Michel, G.P., Lazdunski, A., Filloux, A., 2002. Identification of XcpP domains that confer functionality and specificity to the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion apparatus. *Mol. Microbiol.* 44, 1651-1665.
- Goodman, A.L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R.S., Lory, S., 2004. A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev. Cell.* 7, 745-754.
- Goure, J., Pastor, A., Faudry, E., Chabert, J., Dessen, A., Attree, I., 2004. The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infect. Immun.* 72, 4741-4750.

- Guzzo, J., Pages, J.M., Duong, F., Lazdunski, A., Murgier, M., 1991. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J. Bacteriol.* 173, 5290-5297.
- Hauser, A.R., 2009. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 654-665.
- Hogardt, M., Roeder, M., Schreff, A. M., Eberl, L., Heesemann, J., 2004. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *exoS* is controlled by quorum sensing and RpoS. *Microbiology* 150, 843-851.
- Holland, I.B., Schmitt, L., Young, J., 2005. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway. *Mol. Membr. Biol.* 22, 29-39.
- Hornef, M.W., Roggenkamp, A., Geiger, A. M., Hogardt, M., Jacobi, C. A., Heesemann, J., 2000. Triggering the ExoS regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: A GFP-reporter analysis of exoenzyme (Exo) S, ExoT and ExoU synthesis. *Microb. Pathog.* 29, 329-343.
- Hsu, F., Schwarz, S., Mougous, J.D., 2009. TagR promotes PpkA-catalysed type VI secretion activation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 72, 1111-1125.
- Jacob-Dubuisson, F., Loch, C., Antoine, R., 2001. Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol. Microbiol.* 40, 306-313.
- Journet, L., Agrain, C., Broz, P., Cornelis, G.R., 2003. The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* 302, 1757-1760.
- Kanamaru, S., Leiman, P.G., Kostyuchenko, V.A., Chipman, P.R., Mesyanzhinov, V.V., Arisaka, F., Rossmann, M.G., 2002. Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4. *Nature* 415, 553-557.
- Kida, Y., Higashimoto, Y., Inoue, H., Shimizu, T., Kuwano, K., 2008. A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF-kappaB through protease-activated receptors. *Cell. Microbiol.* 10, 1491-1504.
- Kipnis, E., Sawa, T., Wiener-Kronish, J., 2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med. Mal. Infect.* 36, 78-91.
- Kohler, R., Schafer, K., Muller, S., Vignon, G., Diederichs, K., Philippsen, A., Ringler, P., Pugsley, A.P., Engel, A., Welte, W., 2004. Structure and assembly of the pseudopilin PulG. *Mol. Microbiol.* 54, 647-664.
- Kon, Y., Tsukada, H., Hasegawa, T., Igarashi, K., Wada, K., Suzuki, E., Arakawa, M., Gejyo, F., 1999. The role of *Pseudomonas aeruginosa* elastase as a potent inflammatory factor in a rat air pouch inflammation model. *FEMS Immunol Med. Microbiol.* 25, 313-321.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., Hughes, C., 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405, 914-919.
- Korotkov, K.V., Hol, W.G., 2008. Structure of the GspK-GspI-GspJ complex from the enterotoxigenic *Escherichia coli* type 2 secretion system. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 462-468.
- Koster, M., Bitter, W., de Cock, H., Allaoui, A., Cornelis, G.R., Tommassen, J., 1997. The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol. Microbiol.* 26, 789-797.

- Kulasekara, B.R., Kulasekara, H.D., Wolfgang, M.C., Stevens, L., Frank, D.W., Lory, S., 2006. Acquisition and evolution of the *exoU* locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188, 4037-4050.
- Lazdunski, A.M., Ventre, I., Sturgis, J.N., 2004. Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 581-592.
- Leiman, P.G., Basler, M., Ramagopal, U.A., Bonanno, J.B., Sauder, J.M., Pukatzki, S., Burley, S.K., Almo, S.C., Mekalanos, J.J., 2009. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 4154-4159.
- Lesic, B., Starkey, M., He, J., Hazan, R., Rahme, L.G., 2009. Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis. *Microbiology* 155, 2845-2855.
- Letoffe, S., Redeker, V., Wandersman, C., 1998. Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. *Mol. Microbiol.* 28, 1223-1234.
- Letzelter, M., Sorg, I., Mota, L.J., Meyer, S., Stalder, J., Feldman, M., Kuhn, M., Callebaut, I., Cornelis, G.R., 2006. The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones. *EMBO J.* 25, 3223-3233.
- Llamas, M.A., van der Sar, A., Chu, B.C., Sparrius, M., Vogel, H.J., Bitter, W., 2009. A Novel extracytoplasmic function (ECF) sigma factor regulates virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* *In press.*
- Ma, A.T., McAuley, S., Pukatzki, S., Mekalanos, J.J., 2009. Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell Host Microbe* 5, 234-243.
- Ma, Q., Zhai, Y., Schneider, J.C., Ramseier, T.M., Saier, M.H., Jr., 2003. Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1611, 223-233.
- Martinez, A., Ostrovsky, P., Nunn, D.N., 1999. LipC, a second lipase of *Pseudomonas aeruginosa*, is LipB and Xcp dependent and is transcriptionally regulated by pilus biogenesis components. *Mol. Microbiol.* 34, 317-326.
- Matsumoto, K., 2004. Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis. *Biol. Chem.* 385, 1007-1016.
- McCaw, M.L., Lykken, G.L., Singh, P.K., Yahr, T.L., 2002. ExsD is a negative regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion regulon. *Mol. Microbiol.* 46, 1123-1133.
- Michel, G.P., Durand, E., Filloux, A., 2007. XphA/XqhA, a novel GspCD subunit for type II secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 189, 3776-3783.
- Michel, G.P., Voulhoux, R., 2009. The type II secretory system (T2SS) in Gram negative bacteria: a molecular nanomachine for secretion of Sec and Tat-dependent extracellular proteins. In : Wooldridge, K.G. (ed), *Bacterial secreted proteins : Secretory Mechanisms and Role in Pathogenesis*, Caister Academic Press, Norfolk, pp. 67-92.
- Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., Goodman, A.L., Joachimiak, G., Ordonez, C.L., Lory, S., Walz, T., Joachimiak, A., Mekalanos,

- J.J., 2006. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* 312, 1526-1530.
- Mougous, J.D., Gifford, C.A., Ramsdell, T.L., Mekalanos, J.J., 2007. Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Cell. Biol.* 9, 797-803.
- Mueller, C.A., Broz, P., Muller, S.A., Ringler, P., Erne-Brand, F., Sorg, I., Kuhn, M., Engel, A., Cornelis, G.R., 2005. The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science* 310, 674-676.
- Mulcahy, H., O'Callaghan, J., O'Grady, E.P., Adams, C., O'Gara, F., 2006. The posttranscriptional regulator RsmA plays a role in the interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and human airway epithelial cells by positively regulating the type III secretion system. *Infect. Immun.* 74, 3012-3015.
- Nummelin, H., Merckel, M.C., Leo, J.C., Lankinen, H., Skurnik, M., Goldman, A., 2004. The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. *EMBO J.* 23, 701-711.
- Olson, J.C., Ohman, D.E., 1992. Efficient production and processing of elastase and LasA by *Pseudomonas aeruginosa* require zinc and calcium ions. *J. Bacteriol.* 174, 4140-4147.
- Ostroff, R.M., Vasil, A.I., Vasil, M.L., 1990. Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 172, 5915-5923.
- Pastor, A., Chabert, J., Louwagie, M., Garin, J., Attree, I., 2005. PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS Microbiol. Lett.* 253, 95-101.
- Potvin, E., Lehoux, D.E., Kukavica-Ibrulj, I., Richard, K.L., Sanschagrin, F., Lau, G.W., Levesque, R.C., 2003. In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. *Environ. Microbiol.* 5, 1294-1308.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Revel, A.T., Sturtevant, D., Mekalanos, J.J., 2007. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 15508-15513.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F., Mekalanos, J.J., 2006. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 1528-1533.
- Pukatzki, S., McAuley, S.B., Miyata, S.T., 2009. The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 11-17.
- Quinaud, M., Chabert, J., Faudry, E., Neumann, E., Lemaire, D., Pastor, A., Elsen, S., Dessen, A., Attree, I., 2005. The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 280, 36293-36300.
- Rietsch, A., Vallet-Gely, I., Dove, S.L., Mekalanos, J.J., 2005. ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 8006-8011.
- Robert, V., Filloux, A., Michel, G.P., 2005a. Subcomplexes from the Xcp secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 252, 43-50.

- Robert, V., Filloux, A., Michel, G.P., 2005b. Role of XcpP in the functionality of the *Pseudomonas aeruginosa* secretion. Res. Microbiol. 156, 880-886.
- Ruer, S., Ball, G., Filloux, A., de Bentzmann, S., 2008. The 'P-usher', a novel protein transporter involved in fimbrial assembly and TpsA secretion. EMBO J. 27, 2669-2680.
- Ruer, S., Stender, S., Filloux, A., de Bentzmann, S., 2007. Assembly of fimbrial structures in *Pseudomonas aeruginosa*: functionality and specificity of chaperone-usher machineries. J. Bacteriol. 189, 3547-3555.
- Sato, H., Frank, D.W., 2004. ExoU is a potent intracellular phospholipase. Mol. Microbiol. 53, 1279-1290.
- Sauvonnet, N., Vignon, G., Pugsley, A.P., Gounon, P., 2000. Pilus formation and protein secretion by the same machinery in *Escherichia coli*. EMBO J. 19, 2221-2228.
- Sawa, T., Yahr, T.L., Ohara, M., Kurahashi, K., Gropper, M.A., Wiener-Kronish, J.P., Frank, D.W., 1999. Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. Nat. Med. 5, 392-398.
- Schoehn, G., Di Guilmi, A.M., Lemaire, D., Attree, I., Weissenhorn, W., Dessen, A., 2003. Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. EMBO J. 22, 4957-4967.
- Shen, D.K., Quenee, L., Bonnet, M., Kuhn, L., Derouazi, M., Lamotte, D., Toussaint, B., Polack, B., 2008. Orf1/SpcS chaperones ExoS for type three secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. Biomed. Environ. Sci. 21, 103-109.
- Soscia, C., Hachani, A., Bernadac, A., Filloux, A., Bleves, S., 2007. Cross talk between type III secretion and flagellar assembly systems in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 189, 3124-3132.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S., Olson, M.V., 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 406, 959-964.
- Stuer, W., Jaeger, K.E., Winkler, U.K., 1986. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 168, 1070-1074.
- Surana, N.K., Cutter, D., Barenkamp, S.J., St Geme, J.W., 3rd. 2004. The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter contains an unusually short trimeric translocator domain. J. Biol. Chem. 279, 14679-14685.
- Urbanowski, M.L., Brutinel, E.D., Yahr, T.L., 2007. Translocation of ExsE into Chinese hamster ovary cells is required for transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. Infect. Immun. 75, 4432-9.
- Urbanowski, M.L., Lykken, G.L., Yahr, T.L., 2005. A secreted regulatory protein couples transcription to the secretory activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. Proc. Natl. Acad. Sci. 102, 9930-9935.
- Ventre, I., Goodman, A.L., Vallet-Gely, I., Vasseur, P., Soscia, C., Molin, S., Bleves, S., Lazdunski, A., Lory, S., Filloux, A., 2006. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. Proc. Natl. Acad. Sci. 103, 171-176.

- Voulhoux, R., Taupiac, M.P., Czjzek, M., Beaumelle, B., Filloux, A., 2000. Influence of deletions within domain II of exotoxin A on its extracellular secretion from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182, 4051-4058.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M. L., Lazdunski, A., Wu, L. F., Filloux, A., 2001. Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J.* 20, 6735-6741.
- Voulhoux, R., Tommassen, J., 2004. Omp85, an evolutionarily conserved bacterial protein involved in outer-membrane-protein assembly. *Res. Microbiol.* 155, 129-135.
- Wandersman, C., Delepelaire, P., 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 611-647.
- Wilhelm, S., Gdynia, A., Tielen, P., Rosenau, F., Jaeger, K.E., 2007. The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *J. Bacteriol.* 189, 6695-6703.
- Wilhelm, S., Tommassen, J., Jaeger, K.E., 1999. A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181, 6977-6986.
- Woestyn, S., Allaoui, A., Wattiau, P., Cornelis, G.R., 1994. YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. *J. Bacteriol.* 176, 1561-1569.
- Wolfgang, M.C., Kulasekara, B.R., Liang, X., Boyd, D., Wu, K., Yang, Q., Miyada, C.G., Lory, S., 2003. Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 8484-8489.
- Yahr, T.L., Vallis, A.J., Hancock, M.K., Barbieri, J.T., Frank, D.W., 1998. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 13899-13904.
- Yahr, T.L., Wolfgang, M.C., 2006. Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol. Microbiol.* 62, 631-640.
- Yen, M.R., Peabody, C.R., Partovi, S.M., Zhai, Y., Tseng, Y.H., Saier, M.H., 2002. Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1562, 6-31.
- Yeo, H.J., Cotter, S.E., Laarmann, S., Juehne, T., St Geme, J.W., 3rd, Waksman, G., 2004. Structural basis for host recognition by the *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter. *EMBO J.* 23, 1245-1256.

## Legends to illustration

Figure 1. Chromosomal localization of the various secretion machines found in *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. Only experimentally studied secretion machines are represented accordingly with the colour code used figure 2. Names of genes and /or locus tags (PA numbers) encoding the secretion machines as well as their genomic location are also represented according to the nomenclature used on the *Pseudomonas* web site (<http://v2.pseudomonas.com/>).

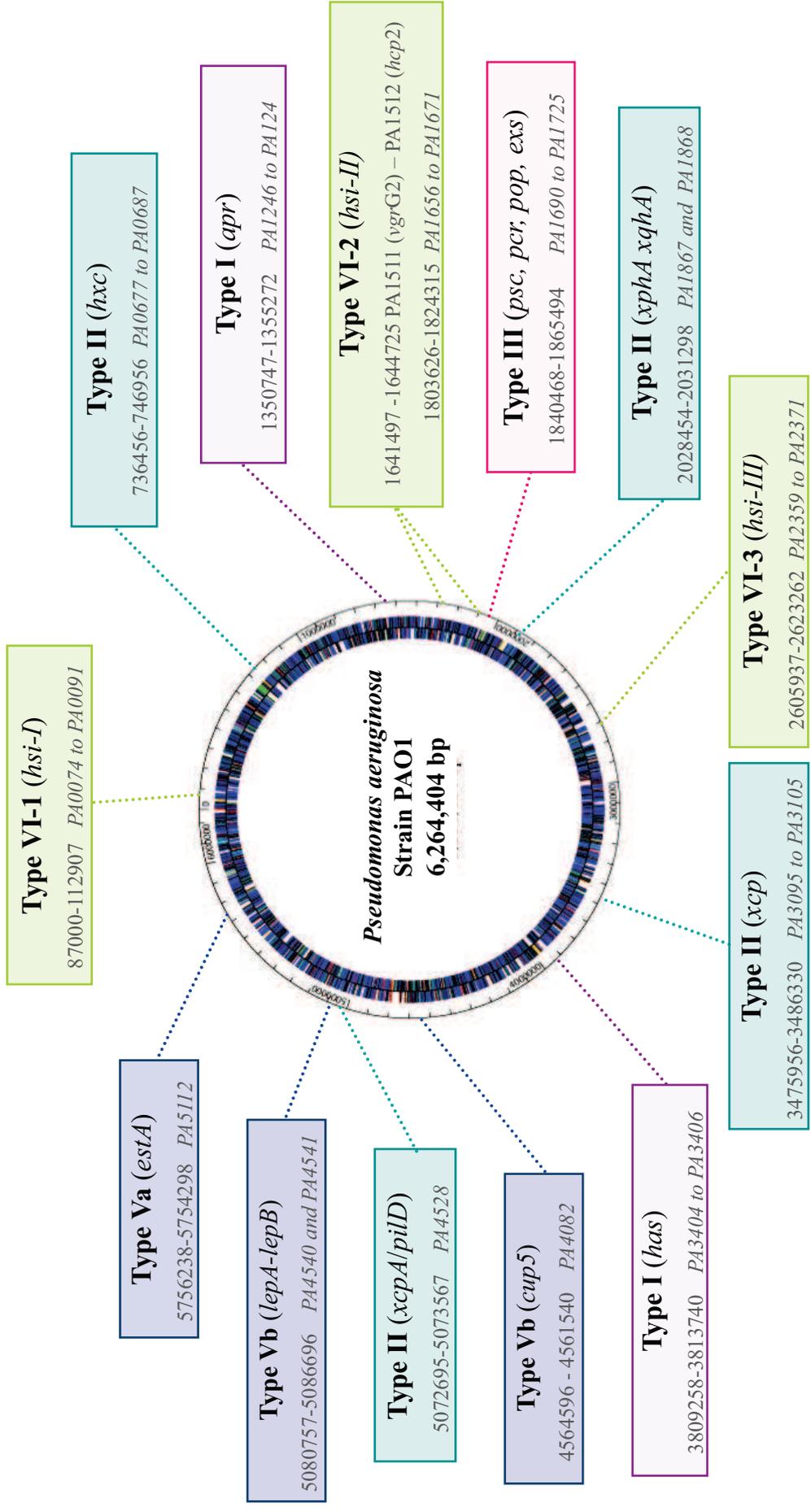
Figure 2. Schematic representation of the different secretion systems found in *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. Five of the six secretion pathways found in Gram-negative bacteria are present in *P. aeruginosa*. Protein transport across the bacterial envelope can be subdivided into Sec-independent and Sec/Tat-dependent

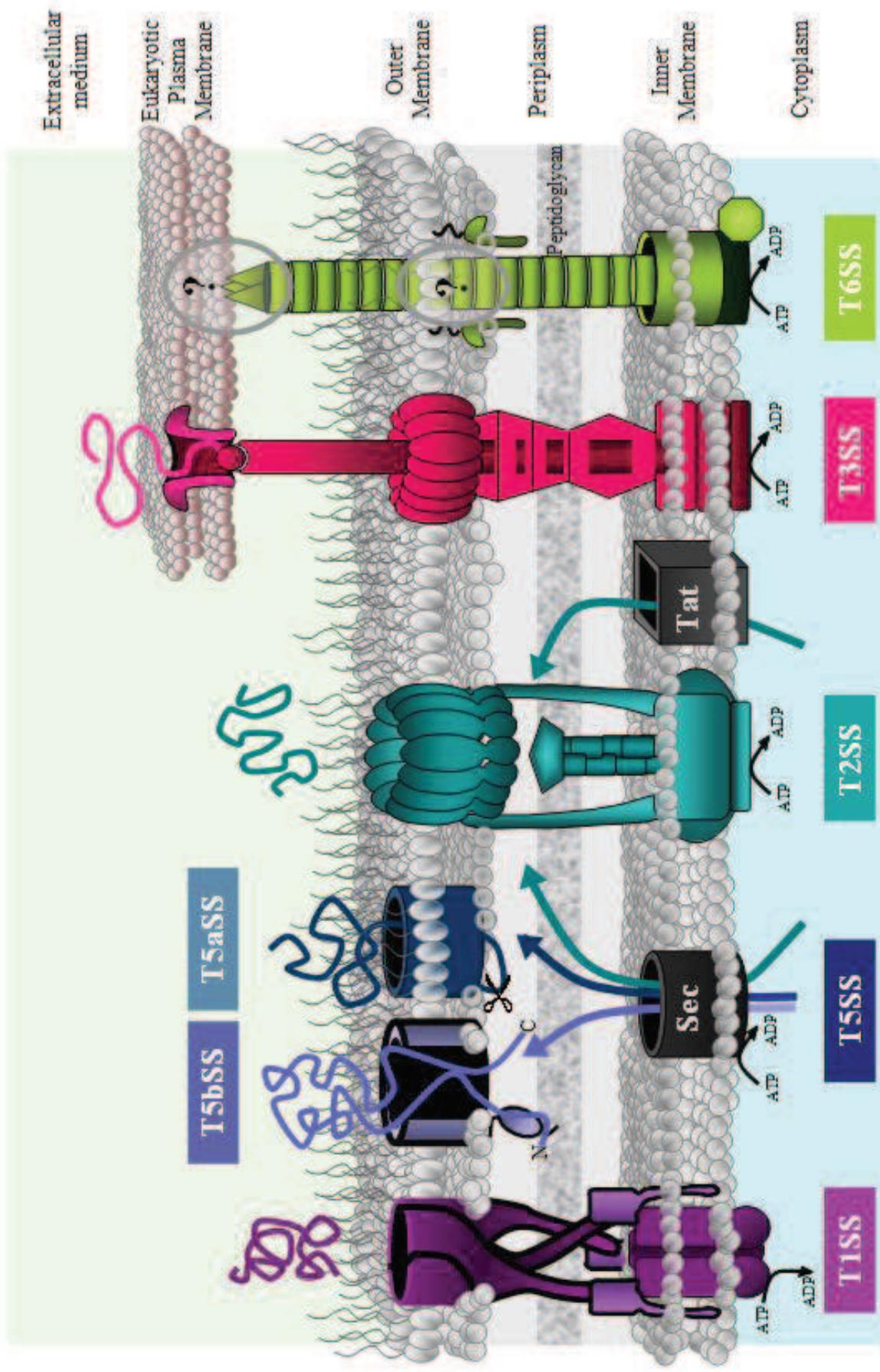
pathways. Type II (T2SS) and type V (T5SS)-secreted exoproteins are firstly exported to the periplasm by the Sec or the Tat system before crossing the outer membrane by their dedicated secretion pathway. In contrast, type I, type III and type VI (T1SS, T3SS, T6SS) exoproteins are directly taken over in the cytoplasm by their cognate secretion machinery.

**Table 1.** Exoproteins secreted by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain.

<b>Secretion System</b>	<b>Secreted protein</b>	<b>Characteristics</b>	<b>Reference*</b>
<b>T1SS (Apr)</b>	AprA (PA1249)	Alkaline protease	(Guzzo, et al., 1991)
	AprX (PA1245)	Unknown	(Duong, et al., 2001).
	HasAp (PA3407)	Heme acquisition protein	(Letoffe, et al., 1998)
<b>T2SS (Xcp)</b>	LasB (PA3724)	Metalloproteinase (Elastase)	(Braun, et al., 1998)
	LasA (PA1871)	Staphylolytic and elastolytic	(Braun, et al., 1998)
	PlcH (PA0844)	Hemolytic phospholipase C	(Voulhoux, et al., 2001)
	PlcN (PA3319)	Non hemolytic phospholipase C	(Voulhoux, et al., 2001)
	PlcB (PA0026)	Phospholipase C specific of phosphatidylethanolamine	(Barker, et al., 2004)
	CbpD (PA0852)	Chitin binding protein	(Folders, et al., 2000)
	ToxA (PA1948)	AB Toxin, ADP-ribosyl transferase	(Lu, et al., 1993)
	PmpA (PA0572)	Putative metalloprotease	Voulhoux and Michel Unpublished
	PrpL (PA4175)	Lysine specific endopeptidase (Protease IV)	(Fox, et al., 2008)
	LipA (PA2862)	Triacyl glycerol acyl hydrolase	(Jaeger, et al., 1994)
	LipC (PA4813)	Lipase	(Martinez, et al., 1999)
	PhoA (PA3296)	Alkaline phosphatase	(Lazdunski, et al., 1990)
	PaAP (PA2939)	Aminopeptidase	(Braun, et al., 1998)
<b>T2SS (Hxc)</b>	LapA (PA0688)	Alkaline phosphatase	(Ball, et al., 2002)
<b>T3SS</b>	ExoS (PA3841)	ADP-ribosyl transferase and Rho GTPase-activating protein (GAP)	(Yahr, et al., 1997)
	ExoT (PA0044)	ADP-ribosyl transferase and Rho GTPase-activating protein (GAP)	(Yahr, et al., 1997)
	ExoY (PA2191)	Adenylate cyclase	(Yahr, et al., 1998)
<b>T5aSS</b>	EstA (PA5112)	Esterase	(Wilhelm, et al., 1999)
<b>T5bSS</b>	LepA (PA4540)	Exoprotease	(Kida, et al., 2008)
	CupB5 (PA4082)	Hemagglutinin-like	(Ruer, et al., 2008)
<b>T6SS (HSI-I)</b>	Hcp1 (PA0085)	Nanotubes formation	(Mougous, et al., 2006)

\*As referred, only secreted proteins experimentally demonstrated to use a defined secretory system are presented.







*CONCLUSIONS*  
&  
*PERSPECTIVES*



# I. Conclusions Générales

---

Les travaux que j'ai accomplis au cours de ma thèse ont porté sur l'étude et la sécrétion de protéines de la famille des patatin-like proteins (PLPs) chez *P. aeruginosa*. La protéine ExoU, présente dans environ 30% des souches de cette espèce (Feltman *et al.*, 2001), est la première PLP bactérienne identifiée et caractérisée (Finck-Barbancon *et al.*, 1997; Hauser *et al.*, 1998). Il s'agit d'une très puissante cytotoxine (Finck-Barbancon *et al.*, 1997; Hauser *et al.*, 1998), possédant une activité phospholipase A2 (Phillips *et al.*, 2003; Saliba *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2003). Absente du protéome de la souche modèle d'étude PAO1, nous avons identifié quatre protéines homologues à ExoU, que nous avons appelées PlpA, PlpB, PlpC et PlpD. Nos études *in silico* ont permis de mettre en évidence que ces quatre protéines possédaient bel et bien les quatre blocs « patatines », motifs caractéristiques des protéines de la famille des PLPs (Banerji & Flieger, 2004). La souche PAO1 possède donc non pas une, mais quatre PLPs, malgré qu'ExoU ne soit pas l'une de ces protéines.

Nous avons réalisé des prédictions de structures secondaires et tertiaires de PlpA et PlpD, et dans les deux cas, le repliement serait de nature globulaire, les quatre blocs patatines étant agencés dans l'espace de manière à former une poche catalytique (Fig.80 et Fig.66 respectivement).

## II. PlpD

---

Ces prédictions nous ont par ailleurs permis d'observer que chez PlpD, en plus du domaine patatine localisé en N-terminal, se trouvait un large domaine C-terminal correspondant à un transporteur de type TpsB, *i.e.* composé d'un tonneau  $\beta$  formés par 16 brins  $\beta$  antiparallèles, relié à un domaine POTRA (polypeptide transport association) (Fig.68). Nos analyses sur gel de polyacrylamide en conditions natives ou dénaturantes ont par la suite confirmé ces prédictions (Fig.72). Nous avons ainsi démontré que le domaine C-terminal de



PlpD forme un tonneau  $\beta$ , et nous nous sommes également intéressés à la localisation cellulaire de cette protéine. Il s'avère qu'elle subit un clivage entre le domaine patatine et le domaine transporteur. Ce dernier est localisé dans la ME de *P. aeruginosa* (Fig.71), ce qui est typique des transporteurs de type TpsB. Le domaine patatine quant à lui est sécrété dans le milieu extracellulaire (Fig.70). La sécrétion du domaine patatine de PlpD, son organisation modulaire, son peptide signal qui lui permet de franchir la MI par la machinerie Sec, la structure et la localisation de son domaine C-terminal sont autant d'éléments qui nous permettent d'affirmer que PlpD est une protéine qui est sécrétée selon un mécanisme similaire au SST5.

Cependant, une analyse plus approfondie conduit à la conclusion que malgré que les principes de sécrétion de PlpD soient semblables à ceux du SST5, des différences avec les données de la littérature existent, rendant PlpD unique en son genre. En effet, l'association sur un seul et même polypeptide d'un domaine à sécréter, un domaine passager, et d'un domaine transporteur renvoie aux ATs. S'il ne s'agit pas ici des TAAAs (ATs trimériques ou SST5c), puisque PlpD ne trimérise pas et n'est pas une adhésine, il ne s'agit pas non plus des ATs classiques (SST5a), puisque le domaine transporteur de cette catégorie de protéine possède une structure en tonneau  $\beta$  de 12 brins. De même, malgré que le domaine C-terminal de PlpD soit de type TpsB, il ne s'agit pas non plus d'un cas de TPS, puisque les protéines d'un couple de TPS sont deux polypeptides indépendants. De plus, le domaine patatine de PlpD ne possède pas de domaine TPS, classiquement retrouvé sur les TpsA. De ce fait, il est moins probable que ce domaine patatine soit en fait un ancien TpsA qui aurait fusionné avec son TpsB. L'ensemble de ces observations nous permet de conclure que PlpD est sécrétée par une nouvelle branche du SST5, que nous proposons d'appeler POTRAnporteur (en raison de la présence du domaine POTRA), ou SST5d.

Cette nouvelle branche soulève plusieurs questions intéressantes. A l'heure actuelle, il est décrit que le SST5c est un système dédié : toutes les protéines de cette famille sont des adhésines. Les études phylogénétiques que nous avons réalisées laissent envisager que les seules protéines sécrétées par cette nouvelle branche soient des protéines avec un domaine patatine (Fig.75). Il semblerait donc que le SST5d soit lui aussi dédié. Il constituerait, qui plus est, une voie originale au sein du SST5, puisque la grande majorité des substrats du SST5 possède une structure de type hélice  $\beta$ . Or, il est très probable que les PLPs possèdent une structure de type globulaire, comme nous le prédisons pour PlpD (Fig. 66) ou comme cela a



été démontré pour la patatine végétale Pat17 (Rydel *et al.*, 2003). Afin de confirmer que PlpD possède réellement un repliement de ce type, nous avons initié une collaboration avec l'équipe de Dr Han Remaut, de l'Université Libre de Bruxelles (VIB/VUB) afin de déterminer par cristallographie la structure de la protéine PlpD, avant clivage. J'ai présenté dans ce manuscrit les premiers résultats obtenus pour purifier PlpD en vue des tests de cristallisation afin de résoudre la structure de la protéine PlpD en entier.

Une des grandes questions que pose cette nouvelle branche est celle du mécanisme de repliement, et de son « timing ». En effet, il n'est pas particulièrement évident d'établir des règles sur la dynamique de repliement des substrats du SST5. De nombreuses expériences donnent des résultats différents, voire contradictoires. Cependant, il semble clair que certains ATs commencent leur repliement dans le périplasma. Il est légitime de se demander alors : *Quid* de PlpD ? Il pourrait être intéressant d'obtenir des informations à ce sujet. Pour ce faire, deux approches sont envisageables. La première serait de remplacer le domaine PLP par un domaine rapporteur dont on pourrait suivre le repliement (telles les protéines CtxB, MBP, ou la calmoduline). Néanmoins, cette approche pourrait s'avérer infructueuse dans la mesure où nous ne connaissons pas le site exact de clivage, et dans la mesure où nos tentatives de produire séparément le domaine C-terminal ou certaines formes tronquées de PlpD se sont soldées par un échec. Il est donc possible que PlpD soit une protéine qui soit facilement déstabilisable, et dans ce cas, il serait alors impératif de connaître le site exact de clivage pour faire une substitution de domaines efficace. La deuxième approche consisterait à insérer une paire de Cystéines en différents endroits du domaine patatine de PlpD afin d'observer si un pont disulfure se forme, et dans l'affirmative, s'il est autorisé ou non la sécrétion. En effet, PlpD ne possédant pas de Cystéine, seule l'ingénierie permettrait de réaliser cette expérience. Les prédictions de structures tertiaires que nous avons obtenues permettraient de choisir où insérer ces Cystéines, mais ici aussi, la résolution de la structure de PlpD constituerait un avantage extrêmement intéressant pour la réussite de cette approche expérimentale.

La grande originalité de PlpD est la présence du domaine POTRA au sein de cette protéine. Ce domaine sert traditionnellement à recruter d'autres protéines : le TpsB recrute son TpsA (Clantin *et al.*, 2007; Hodak *et al.*, 2006), BamA recrute les OMPs pour les insérer dans la ME par l'intermédiaire de ce domaine POTRA (Kim *et al.*, 2007; Robert *et al.*, 2006). Or, le domaine passager de PlpD n'a pas besoin d'être recruté. Quelle peut donc être la fonction de ce domaine POTRA ? C'est pour répondre à cette question que nous avons



construit un variant de PlpD dans lequel nous avons supprimé le domaine POTRA. Il apparaît que dans ces conditions la sécrétion soit empêchée, et que la stabilité de la protéine soit fortement perturbée (Fig.77). Il est possible qu'ici, le domaine POTRA joue plus un rôle de chaperon intramoléculaire. Il est envisageable de faire des expériences de « pulse chase » afin de comparer la stabilité des protéines PlpD et PlpD $\Delta$ POTRA (voire d'un mutant catalytique). Une autre possibilité est que le domaine POTRA recrute une protéase de ME, permettant ainsi la maturation de PlpD, ce qui pourrait avoir un sens puisque les OMPs sont recrutées par les domaines POTRA de BamA. Pour confirmer nos résultats, et déterminer précisément le rôle joué par ce domaine, et dans la mesure où nous n'avons pas réussi à construire un mutant de délétion de PlpD, nous allons ajouter une étiquette V5/6His à l'extrémité C-terminale du variant PlpD $\Delta$ POTRA pour suivre son comportement avec des anticorps spécifiques anti-V5.

Comme je l'ai indiqué dans la discussion relative à PlpD, une des perspectives possibles dans l'étude du domaine POTRA pourrait être de muter certains de ses résidus « clés », et observer alors le comportement de PlpD, sans déléter le domaine POTRA. Cela permettrait peut-être de moins perturber le repliement de PlpD. Cependant, cette approche pourrait se révéler très délicate à mettre en oeuvre, dans la mesure où les domaines POTRA sont très dégénérés, celui de PlpD ne possédant aucune des deux Glycines classiquement conservées.

Nous avons également émis l'hypothèse que PlpD puisse recruter un TpsA conventionnel orphelin et assurer sa sécrétion, une fois le domaine patatine sécrété. Le domaine POTRA pourrait se charger de recruter ce TpsA. Si nous arrivons à obtenir le mutant de délétion PAO1 $\Delta$ plpD, cela nous offrirait la possibilité de comparer en gel bidimensionnel les surnageants de culture de cette souche avec ceux de la souche sauvage, et peut-être identifier le défaut de sécrétion d'une protéine dans la souche mutante.

Je parlais précédemment de notre ignorance concernant le site précis de clivage de PlpD. Déterminer avec précision entre quels résidus a lieu la protéolyse est aussi une des perspectives à ce travail. Mais ici aussi, il ne sera pas aisé d'obtenir cette information. PlpD est une protéine qui est faiblement produite par *P. aeruginosa*, même en condition de surproduction depuis un gène placé sur un plasmide en *trans*. Il nous a ainsi été impossible d'observer sur des gels colorés au bleu de coomassie ou au nitrate d'argent l'un ou l'autre des domaines de PlpD. Ces quantités sont donc en l'état insuffisantes pour utiliser les techniques



de spectrométrie de masse afin d'identifier le site de clivage. Nous envisageons de tenter une immunoprécipitation de PlpD étiquetée V5/6His (à l'aide soit des anticorps spécifiques que nous avons générés, soit des anticorps anti-V5), ou une immobilisation sur une colonne de nickel, affine pour l'étiquette 6His. Ainsi, nous arriverons peut-être à concentrer suffisamment le domaine C-terminal de PlpD pour réaliser un séquençage N-terminal, ce qui nous indiquerait alors le site de clivage.

Nous ne connaissons toujours pas la protéase responsable de cette maturation. Nous avons testé deux candidats (OprD et SprS) qui se sont avérés ne pas être impliqués dans ce processus. Nous n'excluons pas la possibilité que PlpD subisse un clivage autoprotéolytique : l'activité des protéases à Sérine repose sur une triade Sérine-Aspartate-Histidine, or, la dyade catalytique putative de PlpD est composée d'une Sérine et d'un Aspartate. Il est envisageable qu'une activité protéase résiduelle, de très faible niveau puisse avoir lieu et assurer la maturation de PlpD. Pour tester cette hypothèse, un variant de PlpD dans lequel la Sérine 60 a été substituée en Alanine a été construit. Il faut maintenant cloner le gène dans un vecteur navette et observer l'éventuelle modification de sécrétion.

Nous avons par ailleurs mesuré l'activité lipase de PlpD. Nous sommes donc certains que cette protéine possède une activité, et il est naturel de penser que la dyade Ser60/Asp207 soit la dyade catalytique. Le variant que nous avons construit permettra ainsi également de tester cette hypothèse. Nous pourrions aussi essayer d'affiner les tests enzymatiques pour voir si comme ExoU, PlpD possède une activité de type PLA<sub>2</sub>, LPLA, une préférence pour un substrat ou un acide gras en particulier.

Il sera aussi intéressant de tester le phénotype de PlpD au cours d'infection de cellules eucaryotes, et notamment de suivre un éventuel phénotype toxique (ou protecteur) conféré par cette protéine. Nous pourrions aussi vérifier si PlpD peut avoir une action intracellulaire et être donc transloquée dans les cellules eucaryotes, ceci en lui ajoutant une étiquette GSK, uniquement phosphorylable chez l'hôte. L'utilisation d'un anticorps phosphospécifique, qui ne reconnaît cette étiquette que sous sa forme phosphorylée nous indiquerait alors si PlpD est transloquée ou non.

Nous ne disposons pas de données de régulation concernant cette protéine, si ce n'est qu'elle semble plutôt être produite en phase stationnaire de croissance qu'en phase



exponentielle. Nous avons cloné la région promotrice de *plpD* en amont d'un gène rapporteur (*lacZ*, codant la  $\beta$ -galactosidase) afin de déterminer les conditions optimales d'expression et donc de production de cette protéine.

Enfin, il pourrait être intéressant de développer de nouvelles études phylogénétiques sur PlpD et les protéines du SST5d. Il serait intéressant d'essayer de retrouver l'apparition de cette catégorie de protéine. S'agit-il de TPS qui ont fusionné ? ou d'un TpsB qui a fusionné avec une protéine au hasard ? le domaine passager de PlpD ne possède pas de domaine TPS. Pourrait-on retrouver une trace de ce domaine chez de lointains parents de PlpD ? Il en va de même pour un éventuel deuxième domaine POTRA de PlpD.

### III. PlpA

---

Nous nous sommes intéressés à la sécrétion de PlpA. Homologue à la protéine ExoU, ne possédant pas de peptide signal, nous avons émis l'hypothèse que PlpA pourrait être sécrétée par le SST3. Nous avons déterminé qu'une forme étiquetée V5/6His de PlpA était produite et sécrétée par la souche sauvage PAO1 et des souches mutantes pour les SST1, SST3 et du système d'export flagellaire (Fig.82-85). Cependant, l'analyse approfondie des résultats obtenus dans une souche mutante pour le SST3, le système d'export flagellaire, ou même dans la souche sauvage en condition d'induction *in vitro* de la machinerie de type III (*i.e.* en chélation de  $\text{Ca}^{2+}$ ) ne permet pas d'éliminer définitivement une dépendance vis-à-vis de l'un de ces systèmes. En effet, il est connu que des protéines peuvent emprunter l'un ou l'autre de ces systèmes, dans certaines conditions (notamment en absence du domaine de liaison à sa chaperonne ou en l'absence du dit système) (Lee & Galan, 2004; Young & Young, 2002). Ainsi, il est envisageable que dans des conditions de surproduction, PlpA soit sécrétée par le flagelle lorsque le SST3 est muté, ou inversement. Afin de statuer sans équivoque sur la véracité de notre hypothèse, nous devons construire une souche mutante à la fois pour le SST3 et pour le système d'export flagellaire (en délétant successivement les gènes *pscN* et *flhA* du génome de la souche PAO1 par exemple).



Si d'aventure cette hypothèse s'avérait ne pas être la bonne, il est toujours envisageable de tester la dépendance vis-à-vis du deuxième SST6 (H2-T6SS), localisé à proximité de *plpA* (*PA1640* pour *plpA*, *PA1656-PA1671* pour *H2-T6SS*).

Nous avons pu tester le phénotype de PlpA au cours d'infections de lignées cellulaires de type macrophages murins RAW 264.7, ou cellules épithéliales HeLa. Nous avons suivi la mortalité, la cytotoxicité et les changements morphologiques subis par ces cellules au cours d'infections avec différentes souches de *P. aeruginosa*. A notre grande surprise, contrairement au phénotype cytotoxique bien connu d'ExoU, PlpA semble conférer une protection aux cellules infectées par les souches de *P. aeruginosa* produisant cette protéine, bien que cet effet s'amenuise au cours du temps (Fig.87-89). Il est important de confirmer ce résultat, et pour ce faire, plusieurs expériences peuvent être envisagées. Nous pourrions procéder à un marquage de l'ADN au BEt ou à l'iodure de propidium (deux intercalants de l'ADN), afin d'observer une éventuelle perméabilité de la membrane plasmique, ce qui signifierait que PlpA serait active et prendrait ces membranes comme substrat.

Nous pourrions également essayer de réitérer les mêmes expériences de suivi phénotypique, mais en ajoutant seulement un surnageant de culture d'une souche de *P. aeruginosa* qui sécrète PlpA. Ainsi, nous pourrions observer si PlpA est active depuis l'extérieur de la cellule. Une réponse négative suggérerait alors un mécanisme survenant depuis l'intérieur de la cellule, et donc une injection de PlpA, ce qui redonnerait du poids à une sécrétion par le SST3 ou le SST6. Il serait alors possible de penser à démontrer l'injection de PlpA (au moyen de l'étiquette GSK), comme nous imaginons de le faire pour PlpD.

Dans la mesure où PlpA ralentit l'arrondissement subi par les cellules épithéliales au cours de l'infection par *P. aeruginosa*, il serait intéressant d'évaluer l'intégrité du cytosquelette au cours de cette infection, en marquant l'actine à la phalloïdine. Ainsi, nous pourrions observer plus en détail le retard des remaniements d'actine, voire d'autres réarrangements, qui expliqueraient alors le phénotype observé. Il est aussi envisageable de tester si PlpA, à l'image d'ExoU, peut avoir un effet (opposé ou pas !) sur la réponse inflammatoire de la cellule hôte, à l'aide de kits de détection de la libération de cytokines pro-inflammatoires ou d'activation de NF- $\kappa$ B.



Nous souhaitons aussi nous pencher sur l'activité de PlpA en utilisant la même approche que celle que nous avons suivie pour PlpD en collaboration avec le Dr. Susanne Whilhem (Jülich, Allemagne). Nous avons d'ailleurs déjà construit le mutant de substitution PlpA<sub>S40A</sub> qui pourra lui aussi être testé.

## IV. PlpB & PlpC

---

Il y a énormément de perspectives à ce travail concernant PlpA et PlpD, mais il y en a tout autant, voire plus, pour PlpB et PlpC. Dans la mesure où nous n'avons pas encore eu le temps de plus développer les tests de sécrétion ou d'activité, tout reste à faire pour ces deux protéines. L'ensemble des expériences déjà réalisées ou programmées pour PlpA et/ou PlpD peuvent être envisagées pour PlpB et PlpC : sécrétion, dépendance vis-à-vis d'un système de sécrétion, maturation, activité, phénotype. En fonction des réponses à ces questions, bien évidemment, il sera alors temps d'orienter avec précision les approches expérimentales à mettre en place.



*MATERIELS*

*&*

*METHODES*



Cette partie présente les matériels et méthodes que nous avons utilisés pour réaliser nos expériences complémentaires aux travaux décrits dans notre article. Les techniques ayant été préalablement présentées dans le « Matériels & Méthodes » de cet article ne sont pas reprises ici.

## **I. Souches bactériennes, plasmides et conditions de croissance**

Cf « Matériels et Méthodes » de l'article.

## **II. Techniques de biologie moléculaire**

### **II.1. Préparation des ADN plasmidiques**

Les ADN plasmidiques sont extraits par « lyse alcaline » en utilisant les kits « QIAprep Spin Miniprep » (QIAGEN). Les plasmides dérivés du pMMB67 (notre vecteur navette) sont préparés par « semi-boiling » (Sambrook, 1989). Les méthodes classiques de clonage (digestion, ligation) et d'analyse d'ADN (électrophorèse sur gel d'agarose), sont réalisées selon les protocoles décrits par Sambrook et *al.* Les enzymes de restriction sont utilisées selon les conditions recommandées par le fournisseur (ROCHE, PROMEGA). Les fragments d'ADN digérés, destinés au clonage, sont purifiés des gels d'agarose par le « QIAquick Gel Extraction ». Les vecteurs digérés sont précipités avec 3 volumes d'éthanol absolu et 0,1 volume d'acétate de Sodium pH5,5 5M, pendant 30 minutes à -80°C, centrifugés 15 minutes à 13000g, puis lavés à l'éthanol 70% pour éliminer l'excès de sel, et enfin repris dans de l'eau pure. Les clonages sont ensuite vérifiés par carte de restriction et par PCR (Polymerase Chain Reaction), et séquencés (GATC).

### **II.2. Le système GATEWAY**

Le système Gateway (Invitrogen) est une technique de clonage dont le principe repose sur une recombinaison site spécifique basée sur les propriétés du bactériophage Lambda. La



méthode choisie pour la réalisation de cette étude est issue de la réaction LR. Cette réaction consiste en la recombinaison entre un vecteur d'entrée (pDONR) et un vecteur de destination (pET-DEST) grâce au mélange « Gateway LR Clonase » constitué d'enzymes impliqués dans la recombinaison. Ainsi le gène porté par le vecteur d'entrée est transféré au vecteur de destination créant un vecteur d'expression. Il est possible de choisir un promoteur donné, d'insérer un épitope donné, en extrémité N- ou C-terminale, en choisissant le vecteur de destination adéquat. Nous possédons au laboratoire l'ORFéome (Labaer *et al.*, 2004), la collection des 5570 gènes annotés de la souche PAO1, chacun étant cloné dans un vecteur d'entrée.

### II.3. Délétion du gène *plpA*

Le gène *plpA* a été délété du chromosome de la souche PAO1 de *P. aeruginosa* par recombinaison homologue à l'aide du vecteur suicide pEX18 (Hoang *et al.*, 1998). Les régions amont et aval du gène *plpA* ont été amplifiées PCR en utilisant comme matrice l'ADN chromosomique de la souche PAO1, à l'aide des couples d'oligonucléotides RSO1/RSO2P et RSO3P/RSO29 respectivement :

RSO1 : CCCAAGCTTAGCGAGCGGATCGGCTGGTCG,

RSO2P : AAAACTGCAGGCCTGAGCCTCAGCGGCTGAA,

RSO3P : AAAACTGCAGGCTCATCTGCAACCCCTTGCC,

RSO29 : CGGGATCCCTGATGGCGTTGGTCGCGGC.

Ces ADN ont été clonés dans un vecteur pCR2.1 (Invitrogen), puis ont été sous-clonés dans le pEX18 en utilisant les sites de restriction HindIII et PstI pour la région amont, et PstI et BamHI pour la région aval (le site PstI a été ajouté sur les oligos RSO2P et RSO3P). Le plasmide recombinant (pRS17) a été conjugué dans la souche sauvage PAO1, et le premier événement de recombinaison a été sélectionné sur boîtes PIA (*Pseudomonas* Isolating Agar) supplémenté en Carbéniciline 200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , et les mutants ont été sélectionnés après plusieurs repiquages sur boîte LB sucrose 5%.

### II.4. Construction du mutant ponctuel PlpA<sub>S40A</sub>

La Sérine 40 de la protéine PlpA a été substituée en Alanine en utilisant la technique de PCR chevauchante. Les ADN codants les régions 5' et 3' du gène *plpA* ont été amplifiés à



partir de l'ADN chromosomique de la souche PAO1 à l'aide des couples d'oligos RSO18/RSO31 et RSO30/RSO34 respectivement :

RSO18 : CCGGAATTCATGAGCAAACAGGTCGCCCT,

RSO30 : CGCCGGTTGTGCCATGGGCTCGGT,

RSO31 : ACCGAGCCCATGGCACAACCGGCG,

RSO34 : TCAGGCGTTGTCTTCCTCGTAGCG.

Ils ont été utilisés comme matrice pour une deuxième PCR réalisée avec les oligos RSO18 et RSO34. Le fragment d'ADN ainsi amplifié a été cloné dans le pCR2.1 (Invitrogen) et sous-cloné dans le pMMB67 (pRS21) en utilisant les enzymes de restriction HindIII et XbaI.

## II.5. Construction du variant PlpD $\Delta$ POTRA

La région comprise entre la Proline 333 et la Glycine 404 de la protéine PlpD a été déléetée, de sorte à générer le variant PlpD $\Delta$ POTRA, en utilisant la technique de PCR chevauchante. Les ADN codants les régions allant des nucléotides 1 à 996 et des nucléotides 1213 à 2187 du gène *plpD* ont été amplifiés à partir de l'ADN chromosomique de la souche PAO1 à l'aide des couples d'oligos RSO46/RSO48 et RSO 47/RSO40 respectivement :

RSO40 : TCAGAAGTTCTGCCCGAGGT,

RSO46 : TGATGACGATTTTCGGGCTTGGCGGT,

RSO47 : CCGAACCAGCGCAAGAAAGGCGGCACCGAC,

RSO48 : GTCGGTGCCGCCTTTCTTGCGCTGGTTCGG).

Ces ADN ont été utilisés comme matrice pour réaliser une deuxième PCR avec les oligos RSO46 et RSO40. Le fragment généré a été cloné dans le pCR2.1 (Invitrogen) et sous-cloné dans le pMM67 (pRS30) en utilisant les enzymes de restriction EcoRI et SphI.

## II.6. Construction des variants de PlpD utilisés pour la purification

Cinq constructions de PlpD ont été réalisées. Pour chacune d'entre elles, la séquence codant le peptide signal a été remplacée par celle codant le peptide signal de la protéine DsbA. Une étiquette streptavidine a été ajoutée à l'extrémité N-terminale, après le peptide signal, ainsi qu'un site de clivage à la thrombine. Les oligos utilisés pour générer par PCR les



fragments d'ADN codant les variants PlpD<sub>wt</sub>, PlpD<sub>223</sub>, PlpD<sub>234</sub>, PlpD<sub>271</sub>, PlpD<sub>280</sub> sont les suivants :

PlpD<sub>wt</sub>-Iba12-f : ATGGTAGGTCTCACTCCGCGGAGGCCCGGCCGAAGATC,

PlpD<sub>223</sub>-Iba12-f : ATGGTAGGTCTCACTCCGGCGTGGACGTGGTGATCGTG,

PlpD<sub>234</sub>-Iba12-f : ATGGTAGGTCTCACTCCAACCCGCTGCGCGACCGCAAG,

PlpD<sub>271</sub>-Iba12-f : ATGGTAGGTCTCACTCCGGCGACGTGCTGATCCAGCCG,

PlpD<sub>280</sub>-Iba12-f : ATGGTAGGTCTCACTCCTCCGGCTACGGCACCACCGAC,

PlpD-Iba12-r : GTCGTAGGTCTCATATCATCAGAAGTTCTGCCCGAGGTTC.

Ces fragments d'ADN ont ensuite été clonés dans le pASK (IBA).

### **III. Techniques de biochimie**

#### III.1. Electrophorèse sur gels de polyacrylamide (PAGE) en condition semi-native ou dénaturante (SDS)

*Cf* « Matériels et Méthodes » de l'article.

#### III.2. Immunodétection

*Cf* « Matériels et Méthodes » de l'article.

#### III.3. Fractionnement cellulaire

*Cf* « Matériels et Méthodes » de l'article.

#### III.4. Préparation des antiséras

*Cf* « Matériels et Méthodes » de l'article.



### III.5. Détermination de l'activité lipase

Cf « Matériels et Méthodes » de l'article.

### III.6. Purification de PlpD par chromatographie d'affinité à la streptavidine

#### III.6.1. Préparation des fractions d'*E. coli* C43

Les bactéries transformées avec le vecteur pASK ont été cultivées en milieu LB, à 37°C, puis lavées et reprises à 10 UDO<sub>600</sub>.ml<sup>-1</sup> dans du tampon A (Tris 20 mM, pH 8, NaCl 150 mM) supplémentés avec un cocktail d'inhibiteurs. Elles ont été lysées par presse de French, les protéines membranaires ont été séparées des protéines cytoplasmiques et périplasmiques par ultracentrifugation à 100 000g durant 60 minutes à 4°C. Les protéines de membrane interne ont été solubilisées dans du tampon A, SLS (sodium lauroyl sarcosinate) 2% à 4°C, récupérées par ultracentrifugation à 100 000g durant 60 minutes à 4°C, et les protéines de membrane externe ont été solubilisées dans du tampon A, DDM (dodécyl maltoside) 1% à 4°C et récupérées par ultracentrifugation à 100 000g durant 60 minutes à 4°C.

#### III.6.2. Purification de PlpD

Toutes les étapes se font à 4°C. La fraction membrane externe de la préparation précédente est passée sur une colonne Strep-tag (IBA) de 5 ml, préalablement équilibrée avec le tampon A, affine pour PlpD<sub>Strep</sub> grâce à son épitope streptthiobiotine. La colonne est ensuite lavée avec du tampon A (Wash) pour éliminer les protéines aspécifiques. Les protéines toujours retenues sur la colonne sont alors éluées à l'aide de desthiobiotine 1mg.ml<sup>-1</sup> solubilisée en tampon A, DDM 1%. Les fractions d'éluion ont été poolées. PlpD est éluee sous forme d'un seul pic d'éluion.



## IV. Techniques de biologie cellulaire

### IV.1. Entretien de lignées cellulaires

Deux lignées cellulaires ont été utilisées : les cellules épithéliales humaines HeLa, isolées à partir d'un adénocarcinome, et les macrophages RAW 264.7, isolés chez la souris (*Mus musculus*) (Raschke *et al.*, 1978). Les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub>, et respectivement entretenues en milieu MEM (Minimum Essential Medium) avec sels de Earle, L-Glutamine et rouge phénol (GIBCO), et en D-MEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) avec GlutaMAX™ I, D-Glucose, pyruvate de sodium et rouge phénol (GIBCO). Les 2 milieux sont supplémentés en sérum de veau foetal 10% (FCS) (GIBCO), en acides aminés non essentiels (GIBCO), antibiotiques (streptomycine et pénicilline 100U.ml<sup>-1</sup>, SIGMA), et fongizone (100U.ml<sup>-1</sup>, SIGMA) et sont alors dits complets.

### IV.2. Infections cellulaires

La veille des infections, les cellules sont ensemencées en milieu complet à 5.10<sup>4</sup> cellules par puits en plaque 96 puits. Le matin, les cellules sont lavées au PBS stérile, et placées dans 100µl de milieu RPMI 1640 dépourvu de sérum de veau, d'antibiotique, de fongizone et de rouge phénol. Les bactéries sont ensemencées le matin à 0,1 UDO<sub>600nm</sub>.ml<sup>-1</sup> de LB à partir d'un inoculum de nuit. 1UDO<sub>600nm</sub> est prélevée lorsque la DO<sub>600nm</sub> désirée est atteinte (milieu de phase exponentielle de croissance, DO<sub>600nm</sub> ≈ 0,5). Les bactéries sont lavées au PBS stérile, resuspendues dans le même milieu RPMI 1640 à 4°C. 100µl de solution bactérienne diluée sont ajoutés à chacun des puits de façon à obtenir une MOI (Multiplicity Of Infection) de 10. Le contact cellule-bactérie est réalisé par une centrifugation de 5 minutes à 190g, et les plaques sont incubées sans agitation à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

### IV.3. Mesure de la mortalité

Le bleu trypan est une substance qui pénètre dans les cellules mortes qu'elle colore. Une coloration au bleu trypan permet donc de suivre la mortalité des cellules après les infections, en établissant le ratio cellules mortes (bleues) sur la totalité des cellules. A la fin de l'infection, une solution de bleu trypan 10% est ajoutée dans les puits pendant 2 minutes, le



surnageant est ensuite éliminé, et les puits sont observés à l'aide d'un microscope (Olympus). Chaque condition est testée en triplicat.

#### IV.4. Mesures de la cytotoxicité

La LDH est une enzyme cytoplasmique, qui est relarguée dans le milieu extérieur lors de la lyse cellulaire, il est un marqueur classique pour mesurer l'intégrité cellulaire. A la fin de l'infection, les plaques sont centrifugées 5 minutes à 190g, et 100µl de surnageant sont prélevés pour dosage à 492nm de la LDH. Le taux de cytotoxicité est calculé en soustrayant la valeur de  $DO_{492nm}$  des cellules non infectées à la valeur de  $DO_{492nm}$  du puits d'intérêt, et en rapportant cette différence au 100% de LDH, le tout exprimé en pourcentage. Le 100% de LDH est obtenu par lyse au Triton X100 1% final des cellules non infectées. Les surnageants des cellules non infectées sont aussi dosés pour obtenir le relargage naturel de la LDH. Le dosage est réalisé avec le kit « Cytotoxicity Detection Kit LDH » (ROCHE). Chaque condition est testée en triplicat.

#### IV.5. Observations morphologiques

A la fin de l'infection, le milieu des puits est retiré et les cellules sont observées sous un microscope optique (grossissement x600) et les cellules sont prises en photo avec un appareil photo numérique à travers le microscope. Chaque condition est observée en duplicat.

## **V. Techniques bioinformatiques**

### V.1. Analyses de séquences

*Cf* « Matériels et Méthodes » de l'article.

### V.2. Analyses phylogénétiques

*Cf* « Matériels et Méthodes » de l'article.



# Glossaire

---

## Abréviations utiles

AA => Acide Arachidonique

ADPRT => ADP Ribosyl Transferase

AI => Autoinducteur

AMPc => AMP cyclique

AT => Autotransporteur

BEt => Bromure d'Ethydium

CF => Cystic Fibrosis

CHO => Chinese Hamster Ovary

DDM => Dodécyl Maltoside

EPS => Exopolysaccharide

GAP => GTPase Activating Protein

GSP => General Secretion Pathway

Hpt => Histidine Phospho Transfer

HSL => Homosérine Lactone

LCV => Legionella Containing Vacuole

LPLA => Lysophospholipase A

LPS => Lipopolysaccharide

ME => Membrane Externe

MI => Membrane Interne

OMP => Outer Membrane Protein (Protéine de Membrane Externe)

ORF => Open Reading Frame

*p*NP => *para*-nitrophényl

PC => Phosphydylcholine

PLA<sub>1</sub> => Phospholipase A<sub>1</sub>

PLA<sub>2</sub> => Phospholipase A<sub>2</sub>

PLP => Patatin-Like Protein



POTRA => Polypeptide Transport Associated

QS => *Q*uorum *s*ensing

RR => Régulateur de Réponse

SLS => Sodium Lauroyl Sacosinate

SOD => Superoxyste Dismutase

SRP => Signal Recognition Particle

SST1 => Système de Sécrétion du Type I

SST2 => Système de Sécrétion du Type II

SST3 => Système de Sécrétion du Type III

SST4 => Système de Sécrétion du Type IV

SST5 => Système de Sécrétion du Type V

SST6 => Système de Sécrétion du Type VI

TAA => Trimeric Autorporteur Adhesin

TCS => Two-Component System

TPS => Two-Partner Secretion

### **Définitions**

Gliding motility => Il s'agit du mouvement sur des surfaces solides de bactéries dépourvues de flagelle selon une direction déterminée par le grand axe de la bactérie.

Homologues : deux gènes sont homologues s'ils sont parents. Ils codent pour des protéines parentes, qui généralement ont des fonctions, des activités, des séquences, des structures proches.

Orthologues : deux gènes sont orthologues lorsqu'ils sont homologues, et qu'ils appartiennent à des organismes différents.

Paralogues : deux gènes sont paralogues lorsqu'ils sont homologues, et qu'ils appartiennent au même organisme



Swimming motility => Cette mobilité correspond à la nage de la bactérie en milieu liquide ou semi-solide (type agar 0,3%). Elle requiert le flagelle, et le sens du déplacement fait intervenir le chimiotactisme (afin de sentir l'environnement).

Swarming motility => La mobilité par swarming est une migration complexe coordonnant plusieurs systèmes. Chez *P. aeruginosa*, elle ne dépend pas seulement du flagelle comme chez d'autres microorganismes mais aussi des *pili* de type IVa et des rhamnolipides qui semblent agir comme des agents modifiant la surface.

Twitching motility => Ce type de déplacement fait intervenir les *pili* de type IVa. Leurs extensions et rétractations successives permettent à la bactérie de se hisser sur différents types de supports solides, biotiques ou abiotiques. Ce mode de déplacement nécessite un contact entre bactéries.



*REFERENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*



- Abdi-Ali, A., Mohammadi-Mehr, M. & Agha Alaei, Y. (2006).** Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 27, 196-200.
- Akoh, C. C., Lee, G. C., Liaw, Y. C., Huang, T. H. & Shaw, J. F. (2004).** GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog Lipid Res* 43, 534-552.
- Allen, L., Dockrell, D. H., Pattery, T., Lee, D. G., Cornelis, P., Hellewell, P. G. & Whyte, M. K. (2005).** Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *J Immunol* 174, 3643-3649.
- Allewelt, M., Coleman, F. T., Grout, M., Priebe, G. P. & Pier, G. B. (2000).** Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect Immun* 68, 3998-4004.
- Andrews, D. L., Beames, B., Summers, M. D. & Park, W. D. (1988).** Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. *Biochem J* 252, 199-206.
- Arora, S. K., Bangera, M., Lory, S. & Ramphal, R. (2001).** A genomic island in *Pseudomonas aeruginosa* carries the determinants of flagellin glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9342-9347.
- Arpigny, J. L. & Jaeger, K. E. (1999).** Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* 343 Pt 1, 177-183.
- Backhed, F., Normark, S., Schweda, E. K., Oscarson, S. & Richter-Dahlfors, A. (2003).** Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. *Microbes Infect* 5, 1057-1063.
- Ball, G., Durand, E., Lazdunski, A. & Filloux, A. (2002).** A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 43, 475-485.
- Balsinde, J. & Dennis, E. A. (1996).** The incorporation of arachidonic acid into triacylglycerol in P388D1 macrophage-like cells. *Eur J Biochem* 235, 480-485.
- Banerji, S. & Flieger, A. (2004).** Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria? *Microbiology* 150, 522-525.
- Barbieri, J. T. & Sun, J. (2004).** *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 152, 79-92.
- Barnard, T. J., Dautin, N., Lukacik, P., Bernstein, H. D. & Buchanan, S. K. (2007).** Autotransporter structure reveals intra-barrel cleavage followed by conformational changes. *Nat Struct Mol Biol* 14, 1214-1220.
- Becker, S., Theile, S., Heppeler, N., Michalczyk, A., Wentzel, A., Wilhelm, S., Jaeger, K. E. & Kolmar, H. (2005).** A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes. *FEBS Lett* 579, 1177-1182.
- Benz, I. & Schmidt, M. A. (1992).** AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol Microbiol* 6, 1539-1546.

- Benz, R. & Hancock, R. E. (1981).** Properties of the large ion-permeable pores formed from protein F of *Pseudomonas aeruginosa* in lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* 646, 298-308.
- Bernstein, H. D. (2007).** Are bacterial 'autotransporters' really transporters? *Trends Microbiol* 15, 441-447.
- Bleves, S., Soscia, C., Nogueira-Orlandi, P., Lazdunski, A. & Filloux, A. (2005).** Quorum sensing negatively controls type III secretion regulon expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 187, 3898-3902.
- Bodelon, G., Marin, E. & Fernandez, L. A. (2009).** Role of periplasmic chaperones and BamA (YaeT/Omp85) in folding and secretion of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol* 191, 5169-5179.
- Bos, M. P., Robert, V. & Tommassen, J. (2007a).** Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annu Rev Microbiol* 61, 191-214.
- Bos, M. P., Robert, V. & Tommassen, J. (2007b).** Functioning of outer membrane protein assembly factor Omp85 requires a single POTRA domain. *EMBO Rep* 8, 1149-1154.
- Brandon, L. D. & Goldberg, M. B. (2001).** Periplasmic transit and disulfide bond formation of the autotransported *Shigella* protein IcsA. *J Bacteriol* 183, 951-958.
- Brandon, L. D., Goehring, N., Janakiraman, A., Yan, A. W., Wu, T., Beckwith, J. & Goldberg, M. B. (2003).** IcsA, a polarly localized autotransporter with an atypical signal peptide, uses the Sec apparatus for secretion, although the Sec apparatus is circumferentially distributed. *Mol Microbiol* 50, 45-60.
- Braun, V., Hobbie, S. & Ondracek, R. (1992).** *Serratia marcescens* forms a new type of cytolysin. *FEMS Microbiol Lett* 79, 299-305.
- Brunder, W., Schmidt, H. & Karch, H. (1997).** EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol Microbiol* 24, 767-778.
- Burke, J. E. & Dennis, E. A. (2009).** Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res* 50 Suppl, S237-242.
- Buscher, A. Z., Grass, S., Heuser, J., Roth, R. & St Geme, J. W., 3rd (2006).** Surface anchoring of a bacterial adhesin secreted by the two-partner secretion pathway. *Mol Microbiol* 61, 470-483.
- Charles, I., Fairweather, N., Pickard, D., Beesley, J., Anderson, R., Dougan, G. & Roberts, M. (1994).** Expression of the *Bordetella pertussis* P.69 pertactin adhesin in *Escherichia coli*: fate of the carboxy-terminal domain. *Microbiology* 140 ( Pt 12), 3301-3308.
- Cheng, K., Smyth, R. L., Govan, J. R., Doherty, C., Winstanley, C., Denning, N., Heaf, D. P., van Saene, H. & Hart, C. A. (1996).** Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet* 348, 639-642.
- Chevalier, N., Moser, M., Koch, H. G., Schimz, K. L., Willery, E., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F. & Muller, M. (2004).** Membrane targeting of a bacterial virulence factor harbouring an extended signal peptide. *J Mol Microbiol Biotechnol* 8, 7-18.

- Choi, P. S., & Bernstein, H. D. (2010).** Sequential translocation of an *Escherichia coli* two-partner secretion pathway exoprotein across the inner and outer membranes. *Mol Microbiol* 75, 440-451.
- Christie, P. J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S. & Cascales, E. (2005).** Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol* 59, 451-485.
- Chugani, S. A., Whiteley, M., Lee, K. M., D'Argenio, D., Manoil, C. & Greenberg, E. P. (2001).** QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2752-2757.
- Clantin, B., Hodak, H., Willery, E., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F. & Villeret, V. (2004).** The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6194-6199.
- Clantin, B., Delattre, A. S., Rucktooa, P., Saint, N., Meli, A. C., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F. & Villeret, V. (2007).** Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily. *Science* 317, 957-961.
- Clark, J. D., Lin, L. L., Kriz, R. W., Ramesha, C. S., Sultzman, L. A., Lin, A. Y., Milona, N. & Knopf, J. L. (1991).** A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca<sup>2+</sup>-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell* 65, 1043-1051.
- Coburn, J., Kane, A. V., Feig, L. & Gill, D. M. (1991).** *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S requires a eukaryotic protein for ADP-ribosyltransferase activity. *J Biol Chem* 266, 6438-6446.
- Coburn, J. & Frank, D. W. (1999).** Macrophages and epithelial cells respond differently to the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Infect Immun* 67, 3151-3154.
- Coleman, F. T., Mueschenborn, S., Meluleni, G., Ray, C., Carey, V. J., Vargas, S. O., Cannon, C. L., Ausubel, F. M. & Pier, G. B. (2003).** Hypersusceptibility of cystic fibrosis mice to chronic *Pseudomonas aeruginosa* oropharyngeal colonization and lung infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1949-1954.
- Cornelis, G. R. (2006).** The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4, 811-825.
- Cosson, P., Zulianello, L., Join-Lambert, O., Faurisson, F., Gebbie, L., Benghezal, M., Van Delden, C., Curty, L. K. & Kohler, T. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *J Bacteriol* 184, 3027-3033.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322.
- Cotter, S. E., Surana, N. K. & St Geme, J. W., 3rd (2005).** Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. *Trends Microbiol* 13, 199-205.
- Cotter, S. E., Surana, N. K., Grass, S. & St Geme, J. W., 3rd (2006).** Trimeric autotransporters require trimerization of the passenger domain for stability and adhesive activity. *J Bacteriol* 188, 5400-5407.
- Coutte, L., Antoine, R., Drobecq, H., Locht, C. & Jacob-Dubuisson, F. (2001).** Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO J* 20, 5040-5048.

- Coutte, L., Willery, E., Antoine, R., Drobecq, H., Locht, C. & Jacob-Dubuisson, F. (2003).** Surface anchoring of bacterial subtilisin important for maturation function. *Mol Microbiol* 49, 529-539.
- Cover, T. L. & Blaser, M. J. (1992).** Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 267, 10570-10575.
- Cover, T. L. & Blanke, S. R. (2005).** *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* 3, 320-332.
- Cowell, B. A., Evans, D. J. & Fleiszig, S. M. (2005).** Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on *Pseudomonas aeruginosa* invasion. *FEMS Microbiol Lett* 250, 71-76.
- Craig, L. & Li, J. (2008).** Type IV pili: paradoxes in form and function. *Curr Opin Struct Biol* 18, 267-277.
- Cuzick, A., Stirling, F. R., Lindsay, S. L. & Evans, T. J. (2006).** The type III pseudomonas exotoxin U activates the c-Jun NH2-terminal kinase pathway and increases human epithelial interleukin-8 production. *Infect Immun* 74, 4104-4113.
- Czajkowsky, D. M., Iwamoto, H., Cover, T. L. & Shao, Z. (1999).** The vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2001-2006.
- Dautin, N., Barnard, T. J., Anderson, D. E. & Bernstein, H. D. (2007).** Cleavage of a bacterial autotransporter by an evolutionarily convergent autocatalytic mechanism. *EMBO J* 26, 1942-1952.
- Dautin, N. & Bernstein, H. D. (2007).** Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol* 61, 89-112.
- Davis, J., Smith, A. L., Hughes, W. R. & Golomb, M. (2001).** Evolution of an autotransporter: domain shuffling and lateral transfer from pathogenic *Haemophilus* to *Neisseria*. *J Bacteriol* 183, 4626-4635.
- de Bernard, M., Cappon, A., Del Giudice, G., Rappuoli, R. & Montecucco, C. (2004).** The multiple cellular activities of the VacA cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 293, 589-597.
- de Kievit, T., Seed, P. C., Nezezon, J., Passador, L. & Iglewski, B. H. (1999).** RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 181, 2175-2184.
- de Rosier, D. J. (1998).** The turn of the screw: the bacterial flagellar motor. *Cell* 93, 17-20.
- de Rosier, D. (2006).** Bacterium flagellum: visualizing the complete machine *in situ*. *Curr Biol* 21, R928-930.
- Dekker, N., Merck, K., Tommassen, J. & Verheij, H. M. (1995).** In vitro folding of *Escherichia coli* outer-membrane phospholipase A. *Eur J Biochem* 232, 214-219.
- Dessen, A., Tang, J., Schmidt, H., Stahl, M., Clark, J. D., Seehra, J. & Somers, W. S. (1999).** Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell* 97, 349-360.

- Desvaux, M., Scott-Tucker, A., Turner, S. M., Cooper, L. M., Huber, D., Nataro, J. P. & Henderson, I. R. (2007).** A conserved extended signal peptide region directs posttranslational protein translocation via a novel mechanism. *Microbiology* 153, 59-70.
- Deziel, E., Lepine, F., Milot, S. & Villemur, R. (2003).** rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149, 2005-2013.
- Dhondt, S., Geoffroy, P., Stelmach, B. A., Legrand, M. & Heitz, T. (2000).** Soluble phospholipase A2 activity is induced before oxylipin accumulation in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves and is contributed by patatin-like enzymes. *Plant J* 23, 431-440.
- Dhondt, S., Gouzerh, G., Muller, A., Legrand, M. & Heitz, T. (2002).** Spatio-temporal expression of patatin-like lipid acyl hydrolases and accumulation of jasmonates in elicitor-treated tobacco leaves are not affected by endogenous levels of salicylic acid. *Plant J* 32, 749-762.
- Diggle, S. P., Stacey, R. E., Dodd, C., Camara, M., Williams, P. & Winzer, K. (2006).** The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 8, 1095-1104.
- Driessen, A. J. & Nouwen, N. (2008).** Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem* 77, 643-667.
- Durand, E., Verger, E., Rego, A. T., Chandran, V., Meng, G., Fronzes, R., Waksman, G. (2009).** Structural biology of bacterial secretion systems in gram-negative pathogens-potential for new drug targets. *Infect Disord Drug Targets* 9, 518-547.
- Dworkin, M. (1996).** Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol Rev* 60, 70-102.
- Economou, A., Christie, P. J., Fernandez, R. C., Palmer, T., Plano, G. V. & Pugsley, A. P. (2006).** Secretion by numbers: Protein traffic in prokaryotes. *Mol Microbiol* 62, 308-319.
- Egile, C., d'Hauteville, H., Parsot, C. & Sansonetti, P. J. (1997).** SopA, the outer membrane protease responsible for polar localization of IcsA in *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 23, 1063-1073.
- El-Bez, C., Adrian, M., Dubochet, J. & Cover, T. L. (2005).** High resolution structural analysis of *Helicobacter pylori* VacA toxin oligomers by cryo-negative staining electron microscopy. *J Struct Biol* 151, 215-228.
- Emsley, P., Charles, I. G., Fairweather, N. F. & Isaacs, N. W. (1996).** Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature* 381, 90-92.
- Engel, J., Balachandran, P. (2009).** Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* 12, 61-66.
- Feltman, H., Schulert, G., Khan, S., Jain, M., Peterson, L. & Hauser, A. R. (2001).** Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 147, 2659-2669.
- Filloux, A., Bally, M., Murgier, M., Wretling, B. & Lazdunski, A. (1989).** Cloning of xcp genes located at the 55 min region of the chromosome and involved in protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 3, 261-265.

- Filloux, A., Bleves, S., Van Ulsen, P. & Tommassen, J. (2004).** Protein secretion mechanisms in *Pseudomonas*. . In *Pseudomonas: genomics, life style and molecular architecture*, pp. 749-793. Edited by J.-L. Ramos: Kluwer Academic/Plenum Publisher.
- Filloux, A. (2004).** The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochem Biophys Acta* 1694, 163-179.
- Filloux, A., Hachani, A., Bleves, S. (2008).** The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* 154, 1570-1583.
- Finck-Barbancon, V., Goranson, J., Zhu, L., Sawa, T., Wiener-Kronish, J. P., Fleiszig, S. M., Wu, C., Mende-Mueller, L. & Frank, D. W. (1997).** ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol Microbiol* 25, 547-557.
- Finck-Barbancon, V., Yahr, T. L. & Frank, D. W. (1998).** Identification and characterization of SpcU, a chaperone required for efficient secretion of the ExoU cytotoxin. *J Bacteriol* 180, 6224-6231.
- Finck-Barbancon, V. & Frank, D. W. (2001).** Multiple domains are required for the toxic activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. *J Bacteriol* 183, 4330-4344.
- Fink, D. L., Cope, L. D., Hansen, E. J. & Geme, J. W., 3rd (2001).** The *Hemophilus influenzae* Hap autotransporter is a chymotrypsin clan serine protease and undergoes autoproteolysis via an intermolecular mechanism. *J Biol Chem* 276, 39492-39500.
- Fleiszig, S. M., Evans, D. J., Do, N., Vallas, V., Shin, S. & Mostov, K. E. (1997a).** Epithelial cell polarity affects susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* invasion and cytotoxicity. *Infect Immun* 65, 2861-2867.
- Fleiszig, S. M., Wiener-Kronish, J. P., Miyazaki, H., Vallas, V., Mostov, K. E., Kanada, D., Sawa, T., Yen, T. S. & Frank, D. W. (1997b).** *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. *Infect Immun* 65, 579-586.
- Fleiszig, S. M., Arora, S. K., Van, R. & Ramphal, R. (2001).** FlhA, a component of the flagellum assembly apparatus of *Pseudomonas aeruginosa*, plays a role in internalization by corneal epithelial cells. *Infect Immun* 69, 4931-4937.
- Franco, I. S., Shuman, H. A. & Charpentier, X. (2009).** The perplexing functions and surprising origins of *Legionella pneumophila* type IV secretion effectors. *Cell Microbiol* 11, 1435-1443.
- Friedman, L. & Kolter, R. (2004a).** Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol Microbiol* 51, 675-690.
- Friedman, L. & Kolter, R. (2004b).** Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J Bacteriol* 186, 4457-4465.
- Fu, H., Coburn, J. & Collier, R. J. (1993).** The eukaryotic host factor that activates exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is a member of the 14-3-3 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2320-2324.
- Fuqua, C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1996).** Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* 50, 727-751.
- Galliard, T. (1971).** The enzymic deacylation of phospholipids and galactolipids in plants. Purification and properties of a lipolytic acyl-hydrolase from potato tubers. *Biochem J* 121, 379-390.

- Gambello, M. J. & Iglewski, B. H. (1991).** Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol* 173, 3000-3009.
- Gangwer, K. A., Mushrush, D. J., Stauff, D. L., Spiller, B., McClain, M. S., Cover, T. L. & Lacy, D. B. (2007).** Crystal structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin p55 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16293-16298.
- Garcia-Medina, R., Dunne, W. M., Singh, P. K. & Brody, S. L. (2005).** *Pseudomonas aeruginosa* acquires biofilm-like properties within airway epithelial cells. *Infect Immun* 73, 8298-8305.
- Garcia, J. T., Ferracci, F., Jackson, M. W., Joseph, S. S., Pattis, I., Plano, L. R., Fischer, W. & Plano, G. V. (2006).** Measurement of effector protein injection by type III and type IV secretion systems by using a 13-residue phosphorylatable glycogen synthase kinase tag. *Infect Immun* 74, 5645-5657.
- Gentle, I., Gabriel, K., Beech, P., Waller, R. & Lithgow, T. (2004).** The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *J Cell Biol* 164, 19-24.
- Givskov, M. & Molin, S. (1993).** Secretion of *Serratia liquefaciens* phospholipase from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 8, 229-242.
- Glover, S., de Carvalho, M. S., Bayburt, T., Jonas, M., Chi, E., Leslie, C. C. & Gelb, M. H. (1995).** Translocation of the 85-kDa phospholipase A2 from cytosol to the nuclear envelope in rat basophilic leukemia cells stimulated with calcium ionophore or IgE/antigen. *J Biol Chem* 270, 15359-15367.
- Goldman, B. S., Nierman, W. C., Kaiser, D. & other authors (2006).** Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15200-15205.
- Gooderham, W. J. & Hancock, R. E. (2009).** Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* 33, 279-294.
- Goodman, A. L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R. S. & Lory, S. (2004).** A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev Cell* 7, 745-754.
- Goodman, A. L., Merighi, M., Hyodo, M., Ventre, I., Filloux, A. & Lory, S. (2009).** Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes Dev* 23, 249-259.
- Grass, S. & St Geme, J. W., 3rd (2000).** Maturation and secretion of the non-typable *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin: roles of the N-terminal and C-terminal domains. *Mol Microbiol* 36, 55-67.
- Guedin, S., Willery, E., Loch, C. & Jacob-Dubuisson, F. (1998).** Evidence that a globular conformation is not compatible with FhaC-mediated secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol* 29, 763-774.
- Guedin, S., Willery, E., Tommassen, J., Fort, E., Drobecq, H., Loch, C. & Jacob-Dubuisson, F. (2000).** Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Biol Chem* 275, 30202-30210.
- Guzzo, J., Pages, J. M., Duong, F., Lazdunski, A. & Murgier, M. (1991).** *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J Bacteriol* 173, 5290-5297.

- Habib, S. J., Waizenegger, T., Niewianda, A., Paschen, S. A., Neupert, W. & Rapaport, D. (2007).** The N-terminal domain of Tob55 has a receptor-like function in the biogenesis of mitochondrial beta-barrel proteins. *J Cell Biol* 176, 77-88.
- Hanel, A. M., Schuttel, S. & Gelb, M. H. (1993).** Processive interfacial catalysis by mammalian 85-kilodalton phospholipase A2 enzymes on product-containing vesicles: application to the determination of substrate preferences. *Biochemistry* 32, 5949-5958.
- Hardie, K. R., Pommier, S. & Wilhelm, S. (2009).** The secreted proteins of *Pseudomonas aeruginosa*: their export machineries and how they contribute to pathogenesis. In *Bacterial Secreted Proteins, Secretory Mechanisms and Role in Pathogenesis*, pp. 451-478. Edited by K. Wooldridge: Caister Academic Press.
- Hauser, A. R., Kang, P. J. & Engel, J. N. (1998).** PepA, a secreted protein of *Pseudomonas aeruginosa*, is necessary for cytotoxicity and virulence. *Mol Microbiol* 27, 807-818.
- Hauser, A. R. & Engel, J. N. (1999).** *Pseudomonas aeruginosa* induces type-III-secretion-mediated apoptosis of macrophages and epithelial cells. *Infect Immun* 67, 5530-5537.
- Hauser, A. R., Cobb, E., Bodi, M., Mariscal, D., Valles, J., Engel, J. N. & Rello, J. (2002).** Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Med* 30, 521-528.
- Hauser, A. R. (2009).** The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 7, 654-665.
- Hazlett, L. D. & Rudner, X. L. (1994).** Investigations on the role of flagella in adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to mouse and human corneal epithelial proteins. *Ophthalmic Res* 26, 375-379.
- He, J., Baldini, R. L., Deziel, E. & other authors (2004).** The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2530-2535.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F. & Nataro, J. P. (1998).** The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* 6, 370-378.
- Henderson, I. R., Cappello, R. & Nataro, J. P. (2000).** Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion. *Trends Microbiol* 8, 529-532.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. & Ala'Aldeen, D. (2004).** Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 692-744.
- Hendrixson, D. R., de la Morena, M. L., Stathopoulos, C. & St Geme, J. W., 3rd (1997).** Structural determinants of processing and secretion of the *Haemophilus influenzae* hap protein. *Mol Microbiol* 26, 505-518.
- Hentzer, M., Teitzel, G. M., Balzer, G. J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M. & Parsek, M. R. (2001).** Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol* 183, 5395-5401.
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B. & other authors (2003).** Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J* 22, 3803-3815.

- Herbst, U., Toborek, M., Kaiser, S., Mattson, M. P. & Hennig, B. (1999).** 4-Hydroxynonenal induces dysfunction and apoptosis of cultured endothelial cells. *J Cell Physiol* 181, 295-303.
- Hertle, R., Brutsche, S., Groeger, W., Hobbie, S., Koch, W., Konninger, U. & Braun, V. (1997).** Specific phosphatidylethanolamine dependence of *Serratia marcescens* cytotoxin activity. *Mol Microbiol* 26, 853-865.
- Hirschberg, H. J., Simons, J. W., Dekker, N. & Egmond, M. R. (2001).** Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A. *Eur J Biochem* 268, 5037-5044.
- Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J. & Schweizer, H. P. (1998).** A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212, 77-86.
- Hodak, H., Clantin, B., Willery, E., Villeret, V., Locht, C. & Jacob-Dubuisson, F. (2006).** Secretion signal of the filamentous haemagglutinin, a model two-partner secretion substrate. *Mol Microbiol* 61, 368-382.
- Hodak, H. & Jacob-Dubuisson, F. (2007).** Current challenges in autotransport and two-partner protein secretion pathways. *Res Microbiol* 158, 631-637.
- Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H. & Kracht, M. (2002).** Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 72, 847-855.
- Hogardt, M., Schubert, S., Adler, K., Gotzfried, M. & Heesemann, J. (2006).** Sequence variability and functional analysis of MutS of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Int J Med Microbiol* 296, 313-320.
- Hoiczky, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A. & Heesemann, J. (2000).** Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J* 19, 5989-5999.
- Hong, Y. Q. & Ghebrehiwet, B. (1992).** Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clin Immunol Immunopathol* 62, 133-138.
- Horvat, R. T. & Parmely, M. J. (1988).** *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease degrades human gamma interferon and inhibits its bioactivity. *Infect Immun* 56, 2925-2932.
- Hsu, F., Schwarz, S., Mougous, J. D. (2009).** TagR promotes PpkA-catalysed type VI secretion activation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 72, 1111-1125.
- Ieva, R. & Bernstein, H. D. (2009).** Interaction of an autotransporter passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19120-19125.
- Iglewski, B. H. & Kabat, D. (1975).** NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 2284-2288.
- Iwamoto, H., Czajkowsky, D. M., Cover, T. L., Szabo, G. & Shao, Z. (1999).** VacA from *Helicobacter pylori*: a hexameric chloride channel. *FEBS Lett* 450, 101-104.
- Jackson, K. D., Starkey, M., Kremer, S., Parsek, M. R. & Wozniak, D. J. (2004).** Identification of psl, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. *J Bacteriol* 186, 4466-4475.

- Jacob-Dubuisson, F., Buisine, C., Mielcarek, N., Clement, E., Menozzi, F. D. & Locht, C. (1996).** Amino-terminal maturation of the Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol* 19, 65-78.
- Jacob-Dubuisson, F., Buisine, C., Willery, E., Renauld-Mongenie, G. & Locht, C. (1997).** Lack of functional complementation between Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin and Proteus mirabilis HpmA hemolysin secretion machineries. *J Bacteriol* 179, 775-783.
- Jacob-Dubuisson, F., El-Hamel, C., Saint, N., Guedin, S., Willery, E., Molle, G. & Locht, C. (1999).** Channel formation by FhaC, the outer membrane protein involved in the secretion of the Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin. *J Biol Chem* 274, 37731-37735.
- Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R. & Coutte, L. (2004).** Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochim Biophys Acta* 1694, 235-257.
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M. & Misset, O. (1994).** Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* 15, 29-63.
- Jain, S. & Goldberg, M. B. (2007).** Requirement for YaeT in the outer membrane assembly of autotransporter proteins. *J Bacteriol* 189, 5393-5398.
- Jong, W. S., ten Hagen-Jongman, C. M., den Blaauwen, T., Slotboom, D. J., Tame, J. R., Wickstrom, D., de Gier, J. W., Otto, B. R. & Luirink, J. (2007).** Limited tolerance towards folded elements during secretion of the autotransporter Hbp. *Mol Microbiol* 63, 1524-1536.
- Jose, J., Jahnig, F. & Meyer, T. F. (1995).** Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol Microbiol* 18, 378-380.
- Juhas, M., Wiehlmann, L., Huber, B. & other authors (2004).** Global regulation of quorum sensing and virulence by VqsR in Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology* 150, 831-841.
- Junker, M., Schuster, C. C., McDonnell, A. V., Sorg, K. A., Finn, M. C., Berger, B. & Clark, P. L. (2006).** Pertactin beta-helix folding mechanism suggests common themes for the secretion and folding of autotransporter proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4918-4923.
- Junker, M., Besingi, R. N. & Clark, P. L. (2009).** Vectorial transport and folding of an autotransporter virulence protein during outer membrane secretion. *Mol Microbiol* 71, 1323-1332.
- Kajava, A. V., Cheng, N., Cleaver, R., Kessel, M., Simon, M. N., Willery, E., Jacob-Dubuisson, F., Locht, C. & Steven, A. C. (2001).** Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of Bordetella pertussis and related bacterial secretory proteins. *Mol Microbiol* 42, 279-292.
- Kajava, A. V. & Steven, A. C. (2006).** The turn of the screw: variations of the abundant beta-solenoid motif in passenger domains of Type V secretory proteins. *J Struct Biol* 155, 306-315.
- Khalid, S. & Sansom, M. S. (2006).** Molecular dynamics simulations of a bacterial autotransporter: NalP from Neisseria meningitidis. *Mol Membr Biol* 23, 499-508.
- Kida, Y., Higashimoto, Y., Inoue, H., Shimizu, T. & Kuwano, K. (2008).** A novel secreted protease from Pseudomonas aeruginosa activates NF-kappaB through protease-activated receptors. *Cell Microbiol* 10, 1491-1504.

- Kienesberger, P. C., Oberer, M., Lass, A. & Zechner, R. (2009).** Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J Lipid Res* 50 Suppl, S63-68.
- Kierbel, A., Gassama-Diagne, A., Mostov, K. & Engel, J. N. (2005).** The phosphoinositol-3-kinase-protein kinase B/Akt pathway is critical for *Pseudomonas aeruginosa* strain PAK internalization. *Mol Biol Cell* 16, 2577-2585.
- Kim, S., Malinverni, J. C., Sliz, P., Silhavy, T. J., Harrison, S. C. & Kahne, D. (2007).** Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. *Science* 317, 961-964.
- Kimura, Y., Saiga, H., Hamanaka, H. & Matoba, H. (2006).** *Myxococcus xanthus* twin-arginine translocation system is important for growth and development. *Arch Microbiol* 184, 387-396.
- Kipnis, E., Sawa, T. & Wiener-Kronish, J. (2006).** Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* 36, 78-91.
- Klauser, T., Pohlner, J. & Meyer, T. F. (1990).** Extracellular transport of cholera toxin B subunit using *Neisseria* IgA protease beta-domain: conformation-dependent outer membrane translocation. *EMBO J* 9, 1991-1999.
- Klauser, T., Pohlner, J. & Meyer, T. F. (1992).** Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of *Neisseria* Iga beta-mediated outer membrane transport. *EMBO J* 11, 2327-2335.
- Klockgether, J., Reva, O., Larbig, K. & Tummler, B. (2004).** Sequence analysis of the mobile genome island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa* C. *J Bacteriol* 186, 518-534.
- Kohler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C. & Pechere, J. C. (2000).** Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* 182, 5990-5996.
- Konninger, U. W., Hobbie, S., Benz, R. & Braun, V. (1999).** The haemolysin-secreting ShlB protein of the outer membrane of *Serratia marcescens*: determination of surface-exposed residues and formation of ion-permeable pores by ShlB mutants in artificial lipid bilayer membranes. *Mol Microbiol* 32, 1212-1225.
- Konovalova, A., Petters, T., Sogaard-Andersen, L. (2010).** Extracellular biology of *Myxococcus xanthus*. *FEMS Microbiol Rev* 34(2), 89-106.
- Kozjak, V., Wiedemann, N., Milenkovic, D., Lohaus, C., Meyer, H. E., Guiard, B., Meisinger, C. & Pfanner, N. (2003).** An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 278, 48520-48523.
- Kulasekara, B. R., Kulasekara, H. D., Wolfgang, M. C., Stevens, L., Frank, D. W. & Lory, S. (2006).** Acquisition and evolution of the *exoU* locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188, 4037-4050.
- La Camera, S., Geoffroy, P., Samaha, H., Ndiaye, A., Rahim, G., Legrand, M. & Heitz, T. (2005).** A pathogen-inducible patatin-like lipid acyl hydrolase facilitates fungal and bacterial host colonization in *Arabidopsis*. *Plant J* 44, 810-825.
- La Camera, S., Balague, C., Gobel, C., Geoffroy, P., Legrand, M., Feussner, I., Roby, D. & Heitz, T. (2009).** The *Arabidopsis* patatin-like protein 2 (PLP2) plays an essential role in cell death

- execution and differentially affects biosynthesis of oxylipins and resistance to pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* 22, 469-481.
- Laarmann, S. & Schmidt, M. A. (2003).** The Escherichia coli AIDA autotransporter adhesin recognizes an integral membrane glycoprotein as receptor. *Microbiology* 149, 1871-1882.
- Labaer, J., Qiu, Q., Anumanthan, A. & other authors (2004).** The Pseudomonas aeruginosa PAO1 gene collection. *Genome Res* 14, 2190-2200.
- Lamont, I. L., Beare, P. A., Ochsner, U., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (2002).** Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in Pseudomonasaeruginosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7072-7077.
- Larbig, K. D., Christmann, A., Johann, A., Klockgether, J., Hartsch, T., Merkl, R., Wiehlmann, L., Fritz, H. J. & Tummler, B. (2002).** Gene islands integrated into tRNA(Gly) genes confer genome diversity on a Pseudomonas aeruginosa clone. *J Bacteriol* 184, 6665-6680.
- Lasa, I., Del Pozo, J. L., Penades, J. R. & Leiva, J. (2005).** [Bacterial biofilms and infection]. *An Sist Sanit Navar* 28, 163-175.
- Latifi, A., Winson, M. K., Foglino, M., Bycroft, B. W., Stewart, G. S., Lazdunski, A. & Williams, P. (1995).** Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa PAO1. *Mol Microbiol* 17, 333-343.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P. & Lazdunski, A. (1996).** A hierarchical quorum-sensing cascade in Pseudomonas aeruginosa links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* 21, 1137-1146.
- Ledgham, F., Ventre, I., Soscia, C., Foglino, M., Sturgis, J. N. & Lazdunski, A. (2003).** Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of Pseudomonas aeruginosa LasR and RhIR. *Mol Microbiol* 48, 199-210.
- Lee, D. G., Urbach, J. M., Wu, G. & other authors (2006a).** Genomic analysis reveals that Pseudomonas aeruginosa virulence is combinatorial. *Genome Biol* 7, R90.
- Lee, J. H., Lequette, Y. & Greenberg, E. P. (2006b).** Activity of purified QscR, a Pseudomonas aeruginosa orphan quorum-sensing transcription factor. *Mol Microbiol* 59, 602-609.
- Lee, S. H. & Galan, J. E. (2004).** Salmonella type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol Microbiol* 51, 483-495.
- Leidal, K. G., Munson, K. L. & Denning, G. M. (2001).** Small molecular weight secretory factors from Pseudomonas aeruginosa have opposite effects on IL-8 and RANTES expression by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25, 186-195.
- Leidich, S. D., Ibrahim, A. S., Fu, Y. & other authors (1998).** Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of Candida albicans. *J Biol Chem* 273, 26078-26086.
- Lequette, Y., Lee, J. H., Ledgham, F., Lazdunski, A. & Greenberg, E. P. (2006).** A distinct QscR regulon in the Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing circuit. *J Bacteriol* 188, 3365-3370.

- Letoffe, S., Redeker, V. & Wandersman, C. (1998).** Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. *Mol Microbiol* 28, 1223-1234.
- Liang, X., Pham, X. Q., Olson, M. V. & Lory, S. (2001).** Identification of a genomic island present in the majority of pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183, 843-853.
- Liberati, N. T., Urbach, J. M., Miyata, S., Lee, D. G., Drenkard, E., Wu, G., Villanueva, J., Wei, T. & Ausubel, F. M. (2006).** An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2833-2838.
- Lin, L. L., Wartmann, M., Lin, A. Y., Knopf, J. L., Seth, A. & Davis, R. J. (1993).** cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72, 269-278.
- Linke, D., Riess, T., Autenrieth, I. B., Lupas, A. & Kempf, V. A. (2006).** Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends Microbiol* 14, 264-270.
- Locht, C., Antoine, R. & Jacob-Dubuisson, F. (2001).** *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr Opin Microbiol* 4, 82-89.
- Loveless, B. J. & Saier, M. H., Jr. (1997).** A novel family of channel-forming, autotransporting, bacterial virulence factors. *Mol Membr Biol* 14, 113-123.
- Lupetti, P., Heuser, J. E., Manetti, R., Massari, P., Lanzavecchia, S., Bellon, P. L., Dallai, R., Rappuoli, R. & Telford, J. L. (1996).** Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Cell Biol* 133, 801-807.
- Ma, L., Jackson, K. D., Landry, R. M., Parsek, M. R. & Wozniak, D. J. (2006).** Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *J Bacteriol* 188, 8213-8221.
- Ma, L., Lu, H., Sprinkle, A., Parsek, M. R. & Wozniak, D. J. (2007).** *Pseudomonas aeruginosa* Psl is a galactose- and mannose-rich exopolysaccharide. *J Bacteriol* 189, 8353-8356.
- Ma, Q., Zhai, Y., Schneider, J. C., Ramseier, T. M. & Saier, M. H., Jr. (2003).** Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Biochim Biophys Acta* 1611, 223-233.
- Macia, M. D., Blanquer, D., Togores, B., Sauleda, J., Perez, J. L. & Oliver, A. (2005).** Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 3382-3386.
- Makhov, A. M., Hannah, J. H., Brennan, M. J., Trus, B. L., Kocsis, E., Conway, J. F., Wingfield, P. T., Simon, M. N. & Steven, A. C. (1994).** Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. A bacterial adhesin formed as a 50-nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in beta strands and turns. *J Mol Biol* 241, 110-124.
- Maresso, A. W., Deng, Q., Pereckas, M. S., Wakim, B. T. & Barbieri, J. T. (2007).** *Pseudomonas aeruginosa* ExoS ADP-ribosyltransferase inhibits ERM phosphorylation. *Cell Microbiol* 9, 97-105.
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D. R., Galan, J. E., Unger, V. M. (2004).** Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* 306, 1040-1042.
- Martin, D. W., Schurr, M. J., Mudd, M. H., Govan, J. R., Holloway, B. W. & Deretic, V. (1993).** Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8377-8381.

- Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C. & other authors (2008).** Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3100-3105.
- Matos, A. R., d'Arcy-Lameta, A., Franca, M., Petres, S., Edelman, L., Kader, J., Zuily-Fodil, Y. & Pham-Thi, A. T. (2001).** A novel patatin-like gene stimulated by drought stress encodes a galactolipid acyl hydrolase. *FEBS Lett* 491, 188-192.
- Matsukawa, M. & Greenberg, E. P. (2004).** Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* 186, 4449-4456.
- Matsumoto, K. (2004).** Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis. *Biol Chem* 385, 1007-1016.
- Mattick, J. S. (2002).** Type IV *pili* and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* 56, 289-314.
- Maurer, J., Jose, J. & Meyer, T. F. (1999).** Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *J Bacteriol* 181, 7014-7020.
- Mazar, J. & Cotter, P. A. (2006).** Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol Microbiol* 62, 641-654.
- Mazar, J. & Cotter, P. A. (2007).** New insight into the molecular mechanisms of two-partner secretion. *Trends Microbiol* 15, 508-515.
- Meli, A. C., Hodak, H., Clantin, B., Loch, C., Molle, G., Jacob-Dubuisson, F. & Saint, N. (2006).** Channel properties of TpsB transporter FhaC point to two functional domains with a C-terminal protein-conducting pore. *J Biol Chem* 281, 158-166.
- Meng, G., Surana, N. K., St Geme, J. W., 3rd & Waksman, G. (2006).** Structure of the outer membrane translocator domain of the *Haemophilus influenzae* Hia trimeric autotransporter. *EMBO J* 25, 2297-2304.
- Michel, G. P., Durand, E. & Filloux, A. (2007).** XphA/XqhA, a novel GspCD subunit for type II secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189, 3776-3783.
- Minamino, T., Imada, K., Namba, K. (2008).** Molecular motors of the bacterial flagella. *Curr Opin Struct Biol* 18, 693-701.
- Mitra, K., Frank, J. & Driessen, A. (2006).** Co- and post-translational translocation through the protein-conducting channel: analogous mechanisms at work? *Nat Struct Mol Biol* 13, 957-964.
- Montie, T. C., Doyle-Huntzinger, D., Craven, R. C. & Holder, I. A. (1982).** Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of *Pseudomonas aeruginosa* in the burned-mouse model. *Infect Immun* 38, 1296-1298.
- Moraleda-Munoz, A. & Shimkets, L. J. (2007).** Lipolytic enzymes in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 189, 3072-3080.
- Mordue, D. G., Scott-Weathers, C. F., Tobin, C. M. & Knoll, L. J. (2007).** A patatin-like protein protects *Toxoplasma gondii* from degradation in activated macrophages. *Mol Microbiol* 63, 482-496.
- Moslavac, S., Mirus, O., Bredemeier, R., Soll, J., von Haeseler, A. & Schleiff, E. (2005).** Conserved pore-forming regions in polypeptide-transporting proteins. *FEBS J* 272, 1367-1378.

- Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S. & other authors (2006).** A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* 312, 1526-1530.
- Narusaka, Y., Narusaka, M., Seki, M. & other authors (2003a).** Expression profiles of Arabidopsis phospholipase A IIA gene in response to biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Physiol* 44, 1246-1252.
- Narusaka, Y., Narusaka, M., Seki, M. & other authors (2003b).** The cDNA microarray analysis using an Arabidopsis pad3 mutant reveals the expression profiles and classification of genes induced by *Alternaria brassicicola* attack. *Plant Cell Physiol* 44, 377-387.
- Newman, C. L. & Stathopoulos, C. (2004).** Autotransporter and two-partner secretion: delivery of large-size virulence factors by gram-negative bacterial pathogens. *Crit Rev Microbiol* 30, 275-286.
- Nummelin, H., Merckel, M. C., Leo, J. C., Lankinen, H., Skurnik, M. & Goldman, A. (2004).** The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. *EMBO J* 23, 701-711.
- O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Rasmussen, G. T., Abdalla, M. Y., Denning, G. M. & Britigan, B. E. (2003).** The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285, L1077-1086.
- O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Spitz, D. R., Denning, G. M. & Britigan, B. E. (2004).** *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287, L94-103.
- Ochoa, T. J., Barletta, F., Contreras, C. & Mercado, E. (2008).** New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102, 852-856.
- Ochsner, U. A., Koch, A. K., Fiechter, A. & Reiser, J. (1994).** Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 176, 2044-2054.
- Odenbreit, S., Till, M., Hofreuter, D., Faller, G. & Haas, R. (1999).** Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol Microbiol* 31, 1537-1548.
- Oliver, A., Canton, R., Campo, P., Baquero, F. & Blazquez, J. (2000).** High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288, 1251-1254.
- Oliver, D. C., Huang, G., Nodel, E., Pleasance, S. & Fernandez, R. C. (2003).** A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain. *Mol Microbiol* 47, 1367-1383.
- Oomen, C. J., van Ulsen, P., van Gelder, P., Feijen, M., Tommassen, J. & Gros, P. (2004).** Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *EMBO J* 23, 1257-1266.
- Otto, B. R., Sijbrandi, R., Luirink, J., Oudega, B., Heddle, J. G., Mizutani, K., Park, S. Y. & Tame, J. R. (2005).** Crystal structure of hemoglobin protease, a heme binding autotransporter protein from pathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 280, 17339-17345.
- Paiva, E., Lister, R. M. & Park, W. D. (1983).** Induction and Accumulation of Major Tuber Proteins of Potato in Stems and Petioles. *Plant Physiol* 71, 161-168.

- Pankhaniya, R. R., Tamura, M., Allmond, L. R., Moriyama, K., Ajayi, T., Wiener-Kronish, J. P. & Sawa, T. (2004).** Pseudomonas aeruginosa causes acute lung injury via the catalytic activity of the patatin-like phospholipase domain of ExoU. *Crit Care Med* 32, 2293-2299.
- Parkins, M. D., Ceri, H. & Storey, D. G. (2001).** Pseudomonas aeruginosa GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol Microbiol* 40, 1215-1226.
- Pessi, G., Williams, F., Hindle, Z., Heurlier, K., Holden, M. T., Camara, M., Haas, D. & Williams, P. (2001).** The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* 183, 6676-6683.
- Peterson, J. H., Szabady, R. L. & Bernstein, H. D. (2006).** An unusual signal peptide extension inhibits the binding of bacterial presecretory proteins to the signal recognition particle, trigger factor, and the SecYEG complex. *J Biol Chem* 281, 9038-9048.
- Phillips, R. M., Six, D. A., Dennis, E. A. & Ghosh, P. (2003).** In vivo phospholipase activity of the Pseudomonas aeruginosa cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors. *J Biol Chem* 278, 41326-41332.
- Pier, G. B. (2007).** Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Int J Med Microbiol* 297, 277-295.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. & Meyer, T. F. (1987).** Gene structure and extracellular secretion of Neisseria gonorrhoeae IgA protease. *Nature* 325, 458-462.
- Pompeia, C., Freitas, J. J., Kim, J. S., Zyngier, S. B. & Curi, R. (2002).** Arachidonic acid cytotoxicity in leukocytes: implications of oxidative stress and eicosanoid synthesis. *Biol Cell* 94, 251-265.
- Potvin, E., Lehoux, D. E., Kukavica-Ibrulj, I., Richard, K. L., Sanschagrín, F., Lau, G. W. & Levesque, R. C. (2003).** In vivo functional genomics of Pseudomonas aeruginosa for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. *Environ Microbiol* 5, 1294-1308.
- Pukatzki, S., Kessin, R. H. & Mekalanos, J. J. (2002).** The human pathogen Pseudomonas aeruginosa utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba Dictyostelium discoideum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3159-3164.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., Heidelberg, J. F. & Mekalanos, J. J. (2006).** Identification of a conserved bacterial protein secretion system in Vibrio cholerae using the Dictyostelium host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1528-1533.
- Qi, H. Y., Hyndman, J. B. & Bernstein, H. D. (2002).** DnaK promotes the selective export of outer membrane protein precursors in SecA-deficient Escherichia coli. *J Biol Chem* 277, 51077-51083.
- Qiu, X., Gurkar, A. U. & Lory, S. (2006).** Interstrain transfer of the large pathogenicity island (PAPI-1) of Pseudomonas aeruginosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19830-19835.
- Qiu, Z. H., Gijon, M. A., de Carvalho, M. S., Spencer, D. M. & Leslie, C. C. (1998).** The role of calcium and phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in regulating arachidonic acid release in macrophages. *J Biol Chem* 273, 8203-8211.
- Rabin, S. D. & Hauser, A. R. (2003).** Pseudomonas aeruginosa ExoU, a toxin transported by the type III secretion system, kills Saccharomyces cerevisiae. *Infect Immun* 71, 4144-4150.

- Rabin, S. D. & Hauser, A. R. (2005).** Functional regions of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU. *Infect Immun* 73, 573-582.
- Rabin, S. D., Veesenmeyer, J. L., Bieging, K. T. & Hauser, A. R. (2006).** A C-terminal domain targets the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU to the plasma membrane of host cells. *Infect Immun* 74, 2552-2561.
- Racusen, D. & Foote, M. (1980).** A major soluble glycoprotein of potato tubers. *Journal of Food Biochemistry* 4, 43-52.
- Racusen, D. (1984).** Lipid acyl hydrolase of patatin. *Canadian Journal of Botany* 62, 1640-1644.
- Racusen, D. (1986).** Esterase Specificity of patatin from two potato cultivars. *Canadian Journal of Botany* 64, 2104-2106.
- Rahme, L. G., Stevens, E. J., Wolfort, S. F., Shao, J., Tompkins, R. G. & Ausubel, F. M. (1995).** Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268, 1899-1902.
- Ramsey, D. M. & Wozniak, D. J. (2005).** Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol Microbiol* 56, 309-322.
- Rampioni, G., Bertani, I., Zennaro, E., Polticelli, F., Venturi, V. & Leoni, L. (2006).** The quorum-sensing negative regulator RsaL of *Pseudomonas aeruginosa* binds to the lasI promoter. *J Bacteriol* 188, 815-819.
- Raschke, W. C., Baird, S., Ralph, P. & Nakoinz, I. (1978).** Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 15, 261-267.
- Reimmann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A. & Haas, D. (1997).** The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol Microbiol* 24, 309-319.
- Remaut, H., Tang, C., Henderson, N. S., Pinkner, J. S., Wang, T., Hultgren, S. J., Thanassi, D. G., Waksman, G. & Li, H. (2008).** Fiber formation across the bacterial outer membrane by the chaperone/usher pathway. *Cell* 133, 640-652.
- Remminghorst, U. & Rehm, B. H. (2006).** Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnol Lett* 28, 1701-1712.
- Reumann, S., Inoue, K. & Keegstra, K. (2005).** Evolution of the general protein import pathway of plastids (review). *Mol Membr Biol* 22, 73-86.
- Robert, V., Volokhina, E. B., Senf, F., Bos, M. P., Van Gelder, P. & Tommassen, J. (2006).** Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif. *PLoS Biol* 4, e377.
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Mejean, V. & Foglino, M. (2000).** Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol* 8, 498-504.
- Roggkamp, A., Ackermann, N., Jacobi, C. A., Truelzsch, K., Hoffmann, H. & Heesemann, J. (2003).** Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J Bacteriol* 185, 3735-3744.

- Roy, P. H., Tetu, S. G., Larouche, A., Elbourne, L., Tremblay, S., Ren, Q., Dodson, R., Harkins, D., Shay, R., Watkins, K., Mahamoud, Y., Paulsen, I. T. (2010). Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7.
- Ruer, S., Stender, S., Filloux, A. & de Bentzmann, S. (2007). Assembly of fimbrial structures in *Pseudomonas aeruginosa*: functionality and specificity of chaperone-usher machineries. *J Bacteriol* 189, 3547-3555.
- Ruer, S., Ball, G., Filloux, A. & de Bentzmann, S. (2008). The 'P-usher', a novel protein transporter involved in fimbrial assembly and TpsA secretion. *EMBO J* 27, 2669-2680.
- Rutherford, N., Charbonneau, M. E., Berthiaume, F., Betton, J. M. & Mourez, M. (2006). The periplasmic folding of a cysteineless autotransporter passenger domain interferes with its outer membrane translocation. *J Bacteriol* 188, 4111-4116.
- Rydel, T. J., Williams, J. M., Krieger, E., Moshiri, F., Stallings, W. C., Brown, S. M., Pershing, J. C., Purcell, J. P. & Alibhai, M. F. (2003). The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad. *Biochemistry* 42, 6696-6708.
- Saliba, A. M., de Assis, M. C., Nishi, R., Raymond, B., Marques Ede, A., Lopes, U. G., Touqui, L. & Plotkowski, M. C. (2006). Implications of oxidative stress in the cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. *Microbes Infect* 8, 450-459.
- Sambrook, J. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual: Cold Spring Harbor University Press*.
- Sanchez-Pulido, L., Devos, D., Genevrois, S., Vicente, M. & Valencia, A. (2003). POTRA: a conserved domain in the FtsQ family and a class of beta-barrel outer membrane proteins. *Trends Biochem Sci* 28, 523-526.
- Sato, H., Frank, D. W., Hillard, C. J. & other authors (2003). The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J* 22, 2959-2969.
- Sato, H. & Frank, D. W. (2004). ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Mol Microbiol* 53, 1279-1290.
- Sato, H., Feix, J. B. & Frank, D. W. (2006). Identification of superoxide dismutase as a cofactor for the *pseudomonas* type III toxin, ExoU. *Biochemistry* 45, 10368-10375.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 184, 1140-1154.
- Sauri, A., Soprova, Z., Wickstrom, D., de Gier, J. W., Van der Schors, R. C., Smit, A. B., Jong, W. S. & Luirink, J. (2009). The Bam (Omp85) complex is involved in secretion of the autotransporter haemoglobin protease. *Microbiology* 155, 3982-3991.
- Schievella, A. R., Regier, M. K., Smith, W. L. & Lin, L. L. (1995). Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 270, 30749-30754.
- Schmalzer, K. M., Benson, M. A., Frank, D. W. (2010). Activation of ExoU phospholipase activity requires specific C-terminal regions. *J Bacteriol* 192, 1801-1812.

- Schonherr, R., Tsolis, R., Focareta, T. & Braun, V. (1993).** Amino acid replacements in the *Serratia marcescens* haemolysin ShIA define sites involved in activation and secretion. *Mol Microbiol* 9, 1229-1237.
- Schuster, M., Lostroh, C. P., Ogi, T. & Greenberg, E. P. (2003).** Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* 185, 2066-2079.
- Schuster, M. & Greenberg, E. P. (2006).** A network of networks: *quorum-sensing* gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol* 296, 73-81.
- Senda, K., Yoshioka, H., Doke, N. & Kawakita, K. (1996).** A cytosolic phospholipase A2 from potato tissues appears to be patatin. *Plant Cell Physiol* 37, 347-353.
- Seveau, S., Pizarro-Cerda, J. & Cossart, P. (2007).** Molecular mechanisms exploited by *Listeria monocytogenes* during host cell invasion. *Microbes Infect* 9, 1167-1175.
- Shafikhani, S. H. & Engel, J. (2006).** *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted toxin ExoT inhibits host-cell division by targeting cytokinesis at multiple steps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15605-15610.
- Shankar, S., Ye, R. W., Schlichtman, D. & Chakrabarty, A. M. (1995).** Exopolysaccharide alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: enzymology and regulation of gene expression. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 70, 221-255.
- Shen, D. K., Quenee, L., Bonnet, M., Kuhn, L., Derouazi, M., Lamotte, D., Toussaint, B. & Polack, B. (2008).** Orf1/SpcS chaperones ExoS for type three secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomed Environ Sci* 21, 103-109.
- Shere, K. D., Sallustio, S., Manassis, A., D'Aversa, T. G. & Goldberg, M. B. (1997).** Disruption of IcsP, the major *Shigella* protease that cleaves IcsA, accelerates actin-based motility. *Mol Microbiol* 25, 451-462.
- Shewry, P. R. (2003).** Tuber storage proteins. *Ann Bot* 91, 755-769.
- Shohdy, N., Efe, J. A., Emr, S. D. & Shuman, H. A. (2005).** Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4866-4871.
- Sijbrandi, R., Urbanus, M. L., ten Hagen-Jongman, C. M., Bernstein, H. D., Oudega, B., Otto, B. R. & Luirink, J. (2003).** Signal recognition particle (SRP)-mediated targeting and Sec-dependent translocation of an extracellular *Escherichia coli* protein. *J Biol Chem* 278, 4654-4659.
- Simpson, D. A., Ramphal, R. & Lory, S. (1995).** Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* fliO, a gene involved in flagellar biosynthesis and adherence. *Infect Immun* 63, 2950-2957.
- Skillman, K. M., Barnard, T. J., Peterson, J. H., Ghirlando, R. & Bernstein, H. D. (2005).** Efficient secretion of a folded protein domain by a monomeric bacterial autotransporter. *Mol Microbiol* 58, 945-958.
- Songer, J. G. (1997).** Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol* 5, 156-161.
- Sonnewald, U., Chrispeels, M. & Willmitzer, L. (1989a).** Targeting and glycosylation of patatin, the major tuber protein in leaves of transgenic tobacco. *Planta* 179, 171-180.

- Sonnewald, U., Studer, D., Rocha-Sosa, M. & Willmitzer, L. (1989b).** Immunocytochemical localization of patatin, the major glycoprotein in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Planta* 178, 176-183.
- Soscia, C., Hachani, A., Bernadac, A., Filloux, A. & Bleves, S. (2007).** Cross talk between type III secretion and flagellar assembly systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189, 3124-3132.
- Spencer, D. H., Kas, A., Smith, E. E., Raymond, C. K., Sims, E. H., Hastings, M., Burns, J. L., Kaul, R. & Olson, M. V. (2003).** Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 185, 1316-1325.
- St Geme, J. W., 3rd & Grass, S. (1998).** Secretion of the *Haemophilus influenzae* HMW1 and HMW2 adhesins involves a periplasmic intermediate and requires the HMWB and HMWC proteins. *Mol Microbiol* 27, 617-630.
- Stegmeier, J. F. & Andersen, C. (2006).** Characterization of pores formed by YaeT (Omp85) from *Escherichia coli*. *J Biochem* 140, 275-283.
- Stirling, F. R., Cuzick, A., Kelly, S. M., Oxley, D. & Evans, T. J. (2006).** Eukaryotic localization, activation and ubiquitinylation of a bacterial type III secreted toxin. *Cell Microbiol* 8, 1294-1309.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., Costerton, J., W. (2002).** Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56, 187-209.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L. & other authors (2000).** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959-964.
- Strickland, J. A., Orr, G. L. & Walsh, T. A. (1995).** Inhibition of *Diabrotica* Larval Growth by Patatin, the Lipid Acyl Hydrolase from Potato Tubers. *Plant Physiol* 109, 667-674.
- Struyve, M., Moons, M. & Tommassen, J. (1991).** Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J Mol Biol* 218, 141-148.
- Suhr, M., Benz, I. & Schmidt, M. A. (1996).** Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDA<sub>c</sub> and evidence for the outer membrane anchoring as a beta-barrel structure. *Mol Microbiol* 22, 31-42.
- Surana, N. K., Cutter, D., Barenkamp, S. J. & St Geme, J. W., 3rd (2004).** The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter contains an unusually short trimeric translocator domain. *J Biol Chem* 279, 14679-14685.
- Surana, N. K., Buscher, A. Z., Hardy, G. G., Grass, S., Kehl-Fie, T. & St Geme, J. W., 3rd (2006).** Translocator proteins in the two-partner secretion family have multiple domains. *J Biol Chem* 281, 18051-18058.
- Swanson, K. A., Taylor, L. D., Frank, S. D., Sturdevant, G. L., Fischer, E. R., Carlson, J. H., Whitmire, W. M. & Caldwell, H. D. (2009).** *Chlamydia trachomatis* polymorphic membrane protein D is an oligomeric autotransporter with a higher-order structure. *Infect Immun* 77, 508-516.
- Szabady, R. L., Peterson, J. H., Skillman, K. M. & Bernstein, H. D. (2005).** An unusual signal peptide facilitates late steps in the biogenesis of a bacterial autotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 221-226.
- Szczesny, P., Linke, D., Ursinus, A. & other authors (2008).** Structure of the head of the *Bartonella* adhesin BadA. *PLoS Pathog* 4, e1000119.

- Tamura, M., Ajayi, T., Allmond, L. R., Moriyama, K., Wiener-Kronish, J. P. & Sawa, T. (2004).** Lysophospholipase A activity of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretory toxin ExoU. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 323-331.
- Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau, F. & Jaeger, K. E. (2005).** *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* 151, 1313-1323.
- Tombola, F., Carlesso, C., Szabo, I. & other authors (1999).** Helicobacter pylori vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation. *Biophys J* 76, 1401-1409.
- Toutain, C. M., Caizza, N. C., Zegans, M. E. & O'Toole, G. A. (2007).** Roles for flagellar stators in biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Microbiol* 158, 471-477.
- Touze, T., Hayward, R. D., Eswaran, J., Leong, J. M. & Koronakis, V. (2004).** Self-association of EPEC intimin mediated by the beta-barrel-containing anchor domain: a role in clustering of the Tir receptor. *Mol Microbiol* 51, 73-87.
- Turner, D. P., Wooldridge, K. G. & Ala'Aldeen, D. A. (2002).** Autotransported serine protease A of *Neisseria meningitidis*: an immunogenic, surface-exposed outer membrane, and secreted protein. *Infect Immun* 70, 4447-4461.
- Turner, D. P., Marietou, A. G., Johnston, L., Ho, K. K., Rogers, A. J., Wooldridge, K. G. & Ala'Aldeen, D. A. (2006).** Characterization of MspA, an immunogenic autotransporter protein that mediates adhesion to epithelial and endothelial cells in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 74, 2957-2964.
- Twining, S. S., Kirschner, S. E., Mahnke, L. A. & Frank, D. W. (1993).** Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase, alkaline protease, and exotoxin A on corneal proteinases and proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 2699-2712.
- Uozumi, N. & Shimizu, T. (2002).** Roles for cytosolic phospholipase A2alpha as revealed by gene-targeted mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, 59-69.
- Valle, J., Mabbett, A. N., Ulett, G. C., Toledo-Arana, A., Wecker, K., Totsika, M., Schembri, M. A., Ghigo, J. M. & Beloin, C. (2008).** UpaG, a new member of the trimeric autotransporter family of adhesins in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190, 4147-4161.
- Vallet, I., Olson, J. W., Lory, S., Lazdunski, A. & Filloux, A. (2001).** The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6911-6916.
- Vallis, A. J., Finck-Barbancon, V., Yahr, T. L. & Frank, D. W. (1999a).** Biological effects of *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted proteins on CHO cells. *Infect Immun* 67, 2040-2044.
- Vallis, A. J., Yahr, T. L., Barbieri, J. T. & Frank, D. W. (1999b).** Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions. *Infect Immun* 67, 914-920.
- van den Berg, B. (2010).** Crystal structure of a full-length autotransporter. *J Mol Biol* Jan 7.

- van Ulsen, P., van Alphen, L., ten Hove, J., Fransen, F., van der Ley, P. & Tommassen, J. (2003).** A Neisserial autotransporter NalP modulating the processing of other autotransporters. *Mol Microbiol* 50, 1017-1030.
- van Ulsen, P., Adler, B., Fassler, P., Gilbert, M., van Schilfgaarde, M., van der Ley, P., van Alphen, L. & Tommassen, J. (2006).** A novel phase-variable autotransporter serine protease, AusI, of *Neisseria meningitidis*. *Microbes Infect* 8, 2088-2097.
- VanRheenen, S. M., Luo, Z. Q., O'Connor, T. & Isberg, R. R. (2006).** Members of a *Legionella pneumophila* family of proteins with ExoU (phospholipase A) active sites are translocated to target cells. *Infect Immun* 74, 3597-3606.
- Vasseur, P., Vallet-Gely, I., Soscia, C., Genin, S. & Filloux, A. (2005).** The *pel* genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiology* 151, 985-997.
- Vasseur, P., Soscia, C., Voulhoux, R. & Filloux, A. (2007).** PelC is a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane lipoprotein of the OMA family of proteins involved in exopolysaccharide transport. *Biochimie* 89, 903-915.
- Veiga, E., Sugawara, E., Nikaido, H., de Lorenzo, V. & Fernandez, L. A. (2002).** Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains. *EMBO J* 21, 2122-2131.
- Veiga, E., de Lorenzo, V. & Fernandez, L. A. (2004).** Structural tolerance of bacterial autotransporters for folded passenger protein domains. *Mol Microbiol* 52, 1069-1080.
- Vento, R., D'Alessandro, N., Giuliano, M., Lauricella, M., Carabillo, M. & Tesoriere, G. (2000).** Induction of apoptosis by arachidonic acid in human retinoblastoma Y79 cells: involvement of oxidative stress. *Exp Eye Res* 70, 503-517.
- Ventre, I., Goodman, A. L., Vallet-Gely, I. & other authors (2006).** Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 171-176.
- Vidal, J. E. & Navarro-Garcia, F. (2008).** EspC translocation into epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli* requires a concerted participation of type V and III secretion systems. *Cell Microbiol* 10, 1975-1986.
- Voulhoux, R., Bos, M. P., Geurtsen, J., Mols, M. & Tommassen, J. (2003).** Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* 299, 262-265.
- Wagner, S. & Paltauf, F. (1994).** Generation of glycerophospholipid molecular species in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Fatty acid pattern of phospholipid classes and selective acyl turnover at sn-1 and sn-2 positions. *Yeast* 10, 1429-1437.
- Wagner, V. E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A. I. & Iglewski, B. H. (2003).** Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* 185, 2080-2095.
- Walker, G., Hertle, R. & Braun, V. (2004).** Activation of *Serratia marcescens* hemolysin through a conformational change. *Infect Immun* 72, 611-614.
- Walters, M. C., 3rd, Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J. & Stewart, P. S. (2003).** Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of

- Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 317-323.
- Wiehlmann, L., Wagner, G., Cramer, N. & other authors (2007).** Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8101-8106.
- Wieland, C. W., Siegmund, B., Senaldi, G., Vasil, M. L., Dinarello, C. A. & Fantuzzi, G. (2002).** Pulmonary inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide, phospholipase C, and exotoxin A: role of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun* 70, 1352-1358.
- Wilhelm, S., Tommassen, J. & Jaeger, K. E. (1999).** A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 181, 6977-6986.
- Wilhelm, S., Gdynia, A., Tielen, P., Rosenau, F. & Jaeger, K. E. (2007).** The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *J Bacteriol* 189, 6695-6703.
- Winstanley, C., Langille, M. G., Fothergill, J. L. & other authors (2009).** Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res* 19, 12-23.
- Wolfgang, M. C., Kulasekara, B. R., Liang, X., Boyd, D., Wu, K., Yang, Q., Miyada, C. G. & Lory, S. (2003).** Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8484-8489.
- Wollmann, P., Zeth, K., Lupas, A. N. & Linke, D. (2006).** Purification of the YadA membrane anchor for secondary structure analysis and crystallization. *Int J Biol Macromol* 39, 3-9.
- Wozniak, D. J., Wyckoff, T. J., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G. A. & Parsek, M. R. (2003).** Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7907-7912.
- Yahr, T. L., Goranson, J. & Frank, D. W. (1996).** Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Mol Microbiol* 22, 991-1003.
- Yahr, T. L., Vallis, A. J., Hancock, M. K., Barbieri, J. T. & Frank, D. W. (1998).** ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13899-13904.
- Yahr, T. L. (2006).** A critical new pathway for toxin secretion? *N Engl J Med* 11, 1171-1172.
- Yates, S. P., Jorgensen, R., Andersen, G. R. & Merrill, A. R. (2006).** Stealth and mimicry by deadly bacterial toxins. *Trends Biochem Sci* 31, 123-133.
- Yen, M. R., Peabody, C. R., Partovi, S. M., Zhai, Y., Tseng, Y. H. & Saier, M. H. (2002).** Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1562, 6-31.
- Yeo, H. J., Cotter, S. E., Laarmann, S., Juehne, T., St Geme, J. W., 3rd & Waksman, G. (2004).** Structural basis for host recognition by the *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter. *EMBO J* 23, 1245-1256.
- Yoshihara, E., Gotoh, N., Nishino, T. & Nakae, T. (1996).** Protein D2 porin of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane bears the protease activity. *FEBS Lett* 394, 179-182.

**Young, B. M. & Young, G. M. (2002).** YplA is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 184, 1324-1334.

**Young, G. M., Schmiel, D. H. & Miller, V. L. (1999).** A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6456-6461.

**Zhang, J., Xu, K., Ambati, B. & Yu, F. S. (2003).** Toll-like receptor 5-mediated corneal epithelial inflammatory responses to *Pseudomonas aeruginosa* flagellin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 4247-4254.

**Zhao, L., Nguyen, N. T., Fernandez, R. C. & Murphy, M. E. (2009).** Crystallographic characterization of the passenger domain of the *Bordetella* autotransporter BrkA. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 65, 608-611.

**Zusman, D. R., Scott, A. E., Yang, Z. & Kirby, J. R. (2007).** Chemosensory pathways, motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Nat Rev Microbiol* 5, 862-872.



