

Université de la Méditerranée  
Aix-Marseille Université - Faculté des Sciences de Luminy

# **THESE**

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université d'Aix-Marseille II**

Discipline : Microbiologie et Biotechnologies

**Xiang ZHANG**

le Vendredi 19 novembre 2010

---

**Organisation fonctionnelle des segments  
transmembranaires d'un moteur moléculaire Tol et  
d'une protéine active contre une toxine bactérienne**

---

## **Membres du jury**

Pr. Cheng-Cai ZHANG	Président
Dr. Nathalie SAINT	Rapporteur
Dr. Daniel BRETHERS	Rapporteur
Dr. Yves CORDA	Examineur
Dr. Denis DUCHE	Examineur
Dr. Roland LLOUBES	Directeur de thèse



此去经年，应是良辰好景虚设，  
便纵有千种风情，更与何人说。

宋 柳永

谨此献给我的外祖父

*Dédié à mon grand-père*



Je tiens à remercier Mme Nathalie SAMT 娜塔莉, Mr. Daniel BRETHERS 丹尼尔, Mr. Yves Corda 伊夫 et Mr. Cheng-Cai ZHANG 张承才院长 de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail.

Je tiens à remercier Mr. Roland LLOBES 霍朗 de m'avoir accueilli au sein de ton équipe. Merci pour la grande sagesse et patience pendant ces 3 années de thèse. Pour tous les repas très sympathiques aussi bien chez toi qu'au resto. C'est toujours avec grande plaisir. Tu es un grand chef.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Denis 德尼, Mon Maître en personne. Merci pour ces plus de 4 années de patience et d'encadrement. J'ai beaucoup aimé le monde des colicines. Je te remercie pour m'avoir donné l'opportunité de travailler avec toi. J'ai appris vraiment beaucoup de choses avec toi, dans labo et aussi dans la culture française et la vie quotidienne, je sais que je peux toujours compter sur toi.

Eric 艾瑞克, merci pour m'avoir amené dans les différents mondes merveilleux, aussi bien dans le monde de Tol, que le monde des délices : la pizza de chez Dédé, les lasagnes du O'Brady'S, la tropézienne, le petit pique-nique sympa sur la plage avec le sandwich de l'Authentique... (C'est aussi ce jour-là que j'ai mangé le premier Hamburger de ma vie).

Marthe 玛特, Merci beaucoup pour toutes les bonnes intentions et ton affection. Tu es vraiment la maman de tous les thésards du labo. J'espère que tu va profiter de ton futur temps libre. Dommage pour ceux qui restent au labo et les nouveaux étudiants.

Herwé 埃尔雅, « malgré » le soleil et la chaleur, ce strasbourgeois a tout de même abandonné la neige et le froid pour nous rejoindre à Marseille. ^^ Merci pour me laisser gratter ton clavier, support de l'ordi, et aussi pour ta précieuse aide. Ta nouvelle maison est vraiment chouette.

Aurélien 奥蕾利, Je suis heureux d'avoir partagé plus de 3 années de vie de labo avec toi. Merci pour l'invitation à ton mariage, je suis heureux pour toi et Mattieu. Merci pour ton accompagnement. Ce fut un grand plaisir d'affronter la dernière année de thèse avec toi, tu m'as beaucoup aidé. Merci de nous avoir invité chez toi les bonnes lasagnes et de la tarte tatin. J'espère qu'un jour tu viendras en Chine et que je pourrai de faire découvrir mon pays.

MS 玛丽斯特法尼, merci pour m'avoir laissé t'embêter pendant 3 années. C'est toujours avec grand plaisir^^. On refera cela quand tu veux. Merci aussi d'avoir pris le temps de lire ma thèse et de faire des corrections d'orthographe. Je n'oublierai pas le beau sapin et la décoration de Noël

Yannick 雅尼克, un petit nouveau du clan du type N qui montre chaque jour son avec le motif « tissu de canapé typique du père Noël est une ordure »... Il aime la cuisine chinoise, mais malheureusement je n'en ai pas eu le temps de t'inviter à manger.

J'en profite pour dire bienvenue aux 2 nouvelles têtes : Laure et Erwan. Nous n'avons pas eu le temps de vraiment faire connaissance. Je vous dis bonne chance et bon courage.

Je tiens également à remercier

Martine, 玛提娜 pour tous les bons conseils et toute la bonne humeur apportée durant mon M2 et les 2 premières années de thèse. le bisou matinal me manque beaucoup ^^.

Emma 艾玛 pour accepter que je les dérange pendant les travaux de notre labo de mon année de M2. Astrid, Laëticia, Sandra, Rim...

Bande de J et P : James, Jean-Pierre, Jonathan K. Dr. Jérôme H. Pierre, Paul, Val la Maitresse, Kat... Un grand merci à JP, pour vice Dr-john et Dr. Jérôme pour l'aide, les conseils scientifiques et non scientifiques.

SEB 索菲, CSB 克里斯托弗, Laëticia H 莱提西亚 (Merci pour le conseil de shopping à taxefree shop), David, Jennifer, Nico, Caro... pour tous les précieux conseils et les bonnes blagues. Romé, SB, Steve, Gérard, Genevieve, Chantal, Mélissa...

Olivier 奥利弗 pour tous les milieux, les tampons... que tu as préparés. Annick 阿尼克 et Isabelle 伊莎贝拉 pour nous faciliter la vie de labo.

Un grand merci à Audrey qui est hyper-compétente et serviable.

Un grand merci à Anne 安娜 pour m'avoir « supporté » pendant les TP à la fac. ça serait bien si notre farce avait marché aussi...

Labo de Vincent GELI 万森:

Bien sûr un très grand merci à Vincent, à Pierra pour m'avoir laissé squatter la machine Odysée®. Merci à Eric Baille, pour ta patience et ton aide pendant mon stage de M1, et de m'avoir ramené chez moi quand je finissais tard. Merci aussi à Christophe d'RSA, Stéphane, M-N, Julien, Denise, Laurent, Vincent O.

Un grand merci à tout le monde du labo de Pr. ZHANG & Labo de DR. Wu

Pr. ZHANG 张承才院长 et Dr. Wu 吴龙飞教授, merci pour votre disponibilité et votre précieuse aide et conseils que vous m'avez donnés durant ma thèse.

Claire 克莱尔, merci pour : la bouture de Zygocactus, je vais essayer de la garder le plus longtemps possible, le bon gâteau au chocolat, l'abondance de nourriture est une attraction permanente ...^^

Nadège 娜黛芝, merci pour tes aides pour utiliser la Phire® et aussi plein d'autres choses.

Un grand merci à mes compatriotes de l'institut: ZHANG Lichen 张黎琛 (good food), ZHANG Shengda 张圣妲 (alignement, alignement, alignement...), ZHANG Weijia 张维佳 (Game, joke, laugh, dinner...), ZHANG Yong 张勇 (Mr. Cool T-Shirt), ZHE Boyang 戴博阳 (First time been called Uncle, am I really old...), FAN Yingping 樊英萍。It's a pleasure that we can talk in Chinese, joke in Chinese, laugh in Chinese from time to time. 实验室里少了会说中文的人有时还闷的。

Merci à Amel et Annick, toutes les précieuses aides que vous avez généreusement données.

Un grand merci à MCM, Emmanuel FALLA 艾玛妞艾尔, MCM, Céline BROCHER 席琳 Rimi 黑米 (虽说当事的不是黑的跟碳似的), Laura 劳拉, pour leur aide précieuse sur la bioinformatique et la phylogénétique.

Lea 蕾雅, Mirielle 米海依, le petit coucou et la souris de couloir fait toujours très plaisir. Je te souhaite bonne chance. Merci aussi Daniel 丹尼尔 pour la souche et aide dans la manip.

Je voudrais aussi dire merci à mes parents et à mes amis qui m'ont soutenus, et je vous aime très fort.

J'essaye de n'oublier personne, si vous ne trouvez pas votre nom, ben, ajoutez le dans au bas de page^^.

# Sommaire

<b>CHAPITRE 0 : INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>5</b>
<b>CHAPITRE I - PARTIE I : LA MEMBRANE ET LA PROTEINE MEMBRANAIRE.....</b>	<b>7</b>
1. La membrane lipidique permet la naissance de la première cellule sur terre. ....	7
2. La membrane et la protéine membranaire d' <i>Escherichia coli</i> .....	10
2.1. La membrane externe d' <i>E. coli</i> confère à la bactérie une barrière de protection et aussi une perméabilité sélective .....	11
2.2. Le peptidoglycane est le squelette essentiel pour la bactérie .....	12
2.3. La Membrane interne est une membrane dotée de fonctions essentielles .....	13
2.3.1. Adressage, Export, et sécrétion de protéine .....	13
2.3.1.1. Adressage des protéines à la membrane interne.....	14
2.3.1.2. Export des protéines dans la membrane externe .....	15
2.3.1.3. Sécrétion des protéines dans le milieu extérieur .....	18
2.3.2. Bioénergétique de la cellule .....	19
Le canal ionique de l'ATP synthase .....	21
2.4. Importation des molécules dans la cellule.....	24
2.4.1. Importation au travers la membrane externe .....	25
Porines .....	25
Récepteurs spécifiques .....	27
2.4.2. L'acheminement au travers de la membrane interne nécessite l'apport d'énergie.....	27
Transporteurs ABC.....	27
Lactose perméase .....	28
<b>CHAPITRE I- PARTIE II : SYSTEMES TOL-PAL, TONB ET MOTA-B .....</b>	<b>31</b>
I. Système Tol-Pal .....	31
1. Généralité.....	31
2. Phénotype tol et les rôles biologiques du système Tol-Pal .....	33
3. Composants du système Tol-Pal.....	39
3.1. Pal .....	39
3.1.1. Interaction de pal avec le peptidoglycane .....	39
3.1.2. Interaction de Pal avec TolA .....	40
3.2. TolB .....	41
3.3. TolA.....	43
3.4. TolQ .....	44
3.5. TolR.....	45
3.5.1. Le domaine périplasmique de TolR.....	46
3.5.2. L'hélice transmembranaire de TolR .....	48
4. Les interactions transmembranaires.....	48
5. Les interactions périplasmiques .....	51
6. Homologie de système Tol-Pal avec d'autres systèmes de l'enveloppe .....	53
7. Modèle du complexe minimal formé par les protéines TolQ-TolR-TolA .....	54
II. Le système TonB .....	57
1. Généralité.....	57
2. Composants du système .....	58
2.1. TonB est la protéine clef qui relie la membrane interne et la membrane externe.....	59
2.2. ExbD est un composant indispensable pour la formation du complexe TonB.....	63
2.3. ExbB est le composant majeur du complexe .....	65
3. Le fonctionnement du système TonB.....	66
3.1. Le mécanisme.....	66
3.2. Les transporteurs TonB-dépendant (TBDTs).....	68
3.3. Interaction entre récepteur et protéine TonB.....	71

4. Comment s'organise le système ? .....	73
5. Homologie et complémentation croisée entre le système Tol-Pal et le système TonB.....	77
III. Système moteur MotA-B (PomA-B) du flagelle .....	79
1. Généralité.....	79
2. La composition du flagelle.....	80
3. Les couples MotA-MotB et PomA-PomB sont des protéines intégrales membranaires .....	81
3.1. MotB .....	81
3.2. MotA .....	84
4. Organisation des segments transmembranaires de MotA et MotB.....	86
5. Assemblage du complexe MotA-B .....	88
6. Mécanisme de rotation du flagelle .....	93
<b>CHAPITRE I-PARTE III : LES COLICINES .....</b>	<b>95</b>
1. Généralité.....	95
2. Organisation génétique.....	97
3. Le mécanisme d'importation des colicines .....	98
3.1. La libération de la colicine : Protéine de Lyse .....	98
3.2. Infection d'une cellule sensible par la colicine.....	100
3.2.1. Organisation moléculaire des colicines .....	100
3.2.2. Le mode d'action des colicines .....	101
3.2.2.1. Réception .....	101
3.2.2.2. Translocation et Transit dans le périplasme .....	104
a. colicines du groupe A.....	104
a.1. Co-réception par co-récepteur de la membrane externe .....	104
a.2. Interaction avec TolB.....	109
a.3. Interaction avec TolA.....	110
a.4. Interaction avec TolQR .....	110
a.5. Autres composants du système de translocation de colicine .....	111
b. Les colicines du groupe B.....	113
b.1. Translocation au travers de la membrane externe .....	113
b.2. Interaction avec TonB .....	115
b.3. Interaction avec ExbB/D.....	116
b.4. Translocation atypique de la colicine M.....	116
3.3. Le domaine d'activité des colicines endonucléasiques et leur protéine d'immunité .....	117
3.4. Le domaine d'activité des Colicines ionophoriques .....	120
3.4.1. Formation du canal ionique par colicine .....	122
3.4.1.1. Modèle du canal à l'état fermé.....	122
3.4.1.2. Modèle du canal ionique à l'état ouvert .....	125
3.4.1.3. La controverse de la taille du canal vs la sélectivité ionique .....	128
3.4.2. La protéine d'Immunité des colicines ionophoriques.....	128
3.4.3. Topologie des protéines d'immunité des colicines ionophoriques .....	129
3.4.4. Mode d'action de la protéine d'immunité des colicines ionophoriques .....	130
3.4.4.1. Protéine d'immunité du Type-A.....	131
3.4.4.2. Protéine d'immunité du Type-E1 .....	133
4. Évolution des colicines .....	133
<b>CHAPITRE II : RÉSULTAT.....</b>	<b>135</b>
<b>Article I : Cartographie des interactions entre les sous-unités Tol d'<i>E. coli</i> : Mise en évidence de la rotation de segment transmembranaire de TolR .....</b>	<b>137</b>
Introduction : .....	137
Résumé : .....	138
Conclusion et discussion .....	141
<b>Article II : Cartographie des interactions entre les sous-unités Tol d'<i>E. coli</i> : Interactions entre les segments transmembranaires de TolQ .....</b>	<b>137</b>

.....	145
Introduction : .....	145
Résumé : .....	146
Discussion : .....	151
<b>Article III : Le domaine ionophorique de la colicine A modifie l'organisation dimérique de sa protéine d'immunité</b>	
.....	155
Introduction : .....	155
Résumé : .....	157
Conclusion et discussion: .....	163
<b>CHAPITRE III : CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>167</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>175</b>



**CHAPITRE 0 :**  
**INTRODUCTION GENERALE**



Les protéines membranaires interviennent dans de nombreux processus biologiques comme le transport des nutriments, la transmission de signaux extracellulaires, la reconnaissance entre les cellules, la bioénergétique... Ces protéines possèdent des structures spécifiques pour accomplir leur rôle. La large majorité des protéines intégrales de membrane traverse la membrane cytoplasmique sous forme d'hélices alpha. Jusqu'à ce jour, la structure de ces protéines est encore mal connue comparée à celle des protéines solubles.

Notre laboratoire s'intéresse tout particulièrement aux protéines intervenant dans les processus d'importation de macromolécules à travers l'enveloppe d'une bactérie à Gram négatif : *Escherichia coli*.

Pendant ma thèse, je me suis intéressé aux protéines du système Tol-Pal. Le système Tol-Pal est composé de 5 protéines : TolA, TolQ, TolR, TolB, Pal. –la protéine périplasmique TolB interagit avec la lipoprotéine Pal pour former un complexe au niveau de la membrane externe de la bactérie. –les protéines TolA, TolR, TolQ interagissent par leurs segments transmembranaires pour former un complexe au niveau de la membrane interne. Les deux complexes interconnectent la membrane interne, le peptidoglycane et la membrane externe. Le rôle exact de ce système est encore méconnu. Cependant l'une de ces fonctions est de participer à l'intégrité de la membrane externe. Un mutant *tol-pal* présente une déstabilisation de sa membrane externe se traduisant par une hypersensibilité aux composés toxiques, une fuite des protéines périplasmiques et une hypervésicularisation de la membrane externe. Chez certaines espèces comme *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* O7, le système Tol-Pal est essentiel pour la bactérie. Plus récemment, il a été proposé un rôle du système Tol-Pal dans les étapes tardives de la division cellulaire chez *E. coli* et aussi chez *Caulobacter crescentus*.

Ce système est parasité par certaines toxines bactériennes, appelées colicines, ainsi que par certains phages filamenteux. Le système Tol-Pal est alors utilisé pour permettre l'importation de macromolécules à travers l'enveloppe bactérienne. Des homologues du système Tol-Pal sont retrouvés chez presque toutes les bactéries à Gram négatif dont le génome a été séquencé, argument en faveur d'un rôle essentiel.

Des homologies de séquences au niveau des segments transmembranaires ont été mises en évidence entre les protéines de membrane interne du système Tol-Pal et celles de deux autres systèmes de membrane interne bien connus: le système TonB permettant l'importation du fer et de la vitamine B12 et, les protéines MotA et MotB qui forment le moteur du flagelle.

Cette homologie de séquences tend à montrer une origine commune de ces trois systèmes essentiels.

Le premier objectif de ma thèse a été l'étude, d'un point de vue fonctionnel et structural, des protéines de membrane interne TolQ et TolR au sein du système Tol-Pal.

Le second objectif a été focalisé sur l'étude d'une autre protéine membranaire, la protéine d'immunité de la colicine A (Cai). La colicine A est une toxine bactérienne qui forme un canal ionique dans la membrane interne d'une bactérie cible. La cellule qui synthétise la colicine A produit aussi Cai pour se protéger de la toxine produite. La protéine Cai possède 4 hélices transmembranaires. Durant ma thèse, j'ai défini, dans un premier temps avec plus de précision l'organisation et l'orientation des quatre hélices de Cai dans la membrane et ensuite j'ai caractérisé les interactions hélices-hélices qui permettent à Cai de bloquer la colicine A dans la membrane.

Dans cette thèse, un premier chapitre intitulé « Introduction Bibliographique » est consacré à la description des protéines membranaires et l'enveloppe d'*Escherichia coli*, en particulier leurs structures et leurs fonctions. Le système Tol et le système homologue TonB et les protéines MotAB seront décrits. Le monde des colicines sera aussi introduit dans ce chapitre.

Le chapitre II est consacré aux résultats. Il est composé de trois articles scientifiques publiés, soumis ou en préparation. Chaque article est introduit, résumé et discuté en reprenant les données essentielles. Les articles 1 et 2 concernent des résultats issus des études fonctionnelles et structurales effectuées sur des protéines de membrane interne TolQ et TolR au sein du système Tol-Pal. L'article 3 concerne les résultats obtenus sur l'arrangement des segments transmembranaires de Cai dans la membrane interne pendant son action.

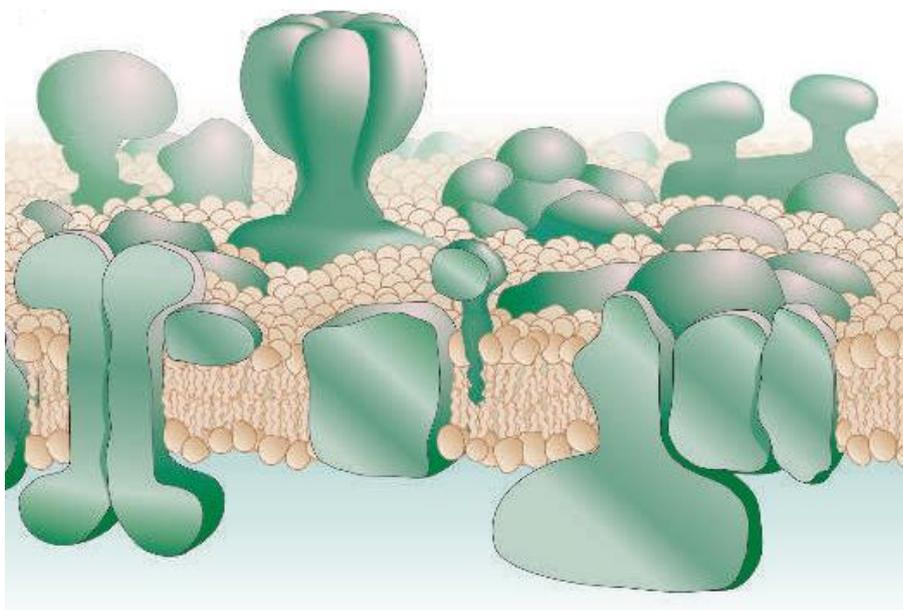
Le dernier chapitre intitulé « conclusions générales et perspectives » reprend les résultats obtenus au cours de ce travail en les replaçant dans le contexte des connaissances actuelles, et propose de nouvelles voies pour la suite de cette étude.

**CHAPITRE I :**  
**INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**



**Chapitre I - Partie I : La membrane et la protéine membranaire****1. LA MEMBRANE LIPIDIQUE PERMET LA NAISSANCE DE LA PREMIERE CELLULE SUR TERRE.**

Les **origines de la vie** sur Terre demeurent incertaines. Cependant, de nombreuses théories scientifiques existent pour expliquer l'apparition de la vie, telle que nous la connaissons aujourd'hui. Celle-ci remontrait à environ 3,5 à 3,8 milliards d'années.(Glansdorff, et al. 2008; Wilde, et al. 2001) L'une des étapes déterminantes dans l'apparition de la première cellule sur terre fut certainement l'enfermement et la protection d'une macromolécule prébiotique (des acides ribonucléiques, par exemple) par une membrane lipidique. Mais pendant très longtemps, la constitution microscopique de notre corps resta inconnue. Il fallut attendre l'invention du premier microscope en 1664, pour visualiser la membrane plasmique qui enveloppe la cellule.



**Figure 1-1 : Le modèle de la membrane plasmique. D'après (Engelman 2005).** La membrane est représentée en marron les protéines sont présentées en vert.

Quatre cents ans après la découverte de la membrane plasmique, l'architecture exacte de cette fine couche qui protège notre patrimoine génétique demeure inconnue. Le modèle actuel de la membrane biologique qui est probablement le plus proche de la réalité a été établi en 2005 par Engelman *et coll.* (Engelman 2005). (Figure 1-1)

Dans ce model, Engelman *et coll.* ont développé les points suivants :

1. La membrane est constituée d'une bicouche lipidique complexée à des protéines intégrales de membrane et des protéines de surface. Cependant, il est à noter que le dogme de la structure en bicouche peut être remis en cause lors de processus particulier comme par exemple la fusion membranaire ([van den Brink-van der Laan, et al. 2004](#)) ou encore localement sous l'effet de certaines contraintes. On parle alors, du polymorphisme de la membrane.

2. L'architecture de ce système est très dynamique. Ce dynamisme concerne les molécules qui composent la membrane à savoir les lipides et les protéines mais s'observe aussi lors de l'échange de ce système avec l'environnement externe et interne qu'il délimite. Contrairement à ce que l'on pensait avant, la distribution des lipides et des protéines dans les membranes ne se fait pas aléatoirement. Il a été démontré clairement que les protéines membranaires s'associent pour former des complexes fonctionnels comme les photosystèmes, le divisome, le complexe de la chaîne respiratoire et aussi comme nous allons le voir dans cette thèse des systèmes protéiques de l'enveloppe (Tol, Mot, TonB) d'*Escherichia coli*.

En ce qui concerne les lipides, il a été démontré depuis longtemps que la membrane plasmique est une structure asymétrique par sa composition chimique et que les épaisseurs des deux feuilletts extra- et intra- cellulaires sont différentes. Dans le cas des hématies, presque tous les lipides qui possèdent le groupement choline c'est à dire la phosphatidylcholine et la sphingomyéline, se trouvent du côté externe alors que tous les phospholipides contenant un groupement aminé terminal (phosphatidyléthanolamine et phosphatidylsérine) se trouvent du côté interne. La composition en lipides d'une membrane varie d'une espèce à l'autre. Chez les procaryotes, la composition de cette membrane est plus simple en espèces lipidiques que chez les cellules eucaryotes. La membrane cytoplasmique d'*E.coli* est composée d'environ 75% de phosphatidyléthanolamine, 20% de phosphatidylglycérole et 5% de cardiolipide ([Kadner 1996](#)).

Le ratio protéine : lipide de la membrane cytoplasmique dépend du type de cellule. Chez les cellules de même nature, la composition de la membrane peut varier selon les conditions environnementales et nutritionnelles. Voici quelque statistique ([Guidotti 1972](#)) : Table 1.

**Table 1 : La composition de différentes membranes biologiques. (D'après (Guidotti 1972))**

Membranes	Protéine	Lipide	Glucide
Globule rouge	49	43	8
Hépatocyte	54	36	10
Amibe	54	42	4
Myéline	18	79	3
Enveloppe nucléaire	66	32	2
Réticulum endoplasmique	62	27	10
L'appareil de Golgi	64	26	10
Mitochondrie			
Membrane externe	55	45	TRACE
Membrane interne	78	22	---
Chloroplaste			
Membrane interne	70	30	---
bactérie à Gram positif	75	25	0

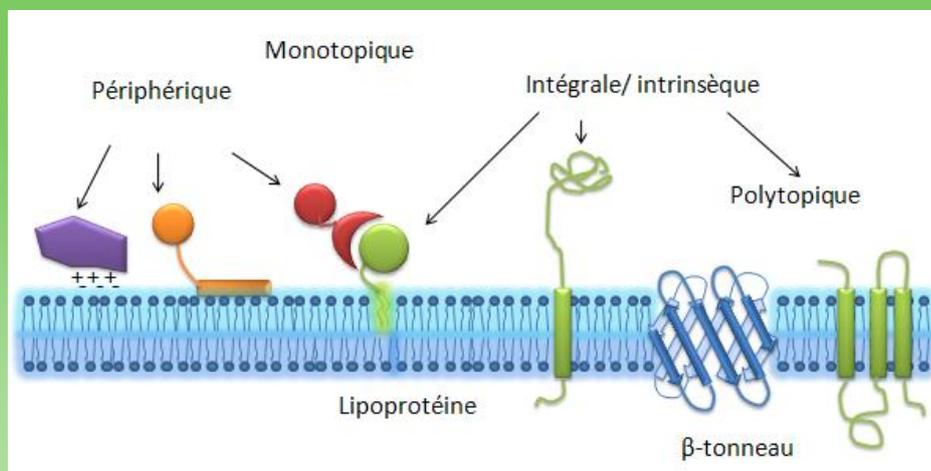
Sur cette table nous pouvons remarquer que le pourcentage de protéine dans la membrane est proportionnel au nombre de fonctions accomplies par la membrane, plus la membrane est dotée de fonctions, plus la teneur en protéine est grand. La membrane interne de la mitochondrie possède beaucoup plus de protéines que la membrane externe à cause des nombreuses protéines impliquées dans la chaîne respiratoire. La membrane des cellules de Schwann qui enveloppent l'axone afin de préserver la bonne isolation électrochimique est composée essentiellement de lipides (79%) ainsi que de seulement trois types de protéines. La composition de ces lipides dans la bicouche est asymétrique, et peut varier d'une lignée cellulaire à l'autre (Calderon and DeVries 1997).

Indéniablement, les protéines membranaires jouent un rôle important dans le fonctionnement d'une cellule. Une membrane sans protéine, c'est comme une bulle de savon. Avec les protéines associées à la membrane, cette « bulle de savon » est véritablement devenue une membrane dotée d'intelligence biologique. Dans une cellule, en moyenne 20%-25% des protéines totales sont associées à la membrane. Chez *E.coli* la membrane interne possède 60% des protéines totales de l'enveloppe (Kadner 1996). Les protéines membranaires selon le type d'interactions faites avec la membrane peuvent être divisées en 2 classes : les protéines périphériques qui ne pénètrent pas dans la membrane et les protéines membranaires intégrales qui le font.

### Classification des protéines membranaires.

Les protéines membranaires sont classées en deux groupes en fonction de la façon dont elles interagissent avec la membrane : les protéines périphériques et les protéines intégrales. Les protéines périphériques n'interagissent pas avec le cœur hydrophobe de la membrane. Les protéines intégrales insèrent un ou plusieurs segments dans la membrane. Elles interagissent directement avec le cœur hydrophobe de la membrane.

Selon les structures en contact avec la membrane, les protéines intégrales de membrane peuvent être séparées en 3 groupes : monotopiques (en contact avec un seul des compartiments définis par la membrane) ; bitopiques (traverse la membrane une seule fois) et polytopiques (traverse la membrane plusieurs fois).



Cette biomembrane possède de multiples fonctions, la plus évidente étant la protection et le maintien d'un l'environnement interne stable. De même la membrane assure une perméabilité sélective qui permet de maintenir un potentiel de membrane. La membrane entraîne l'apparition de 2 compartiments, un compartiment interne et un compartiment externe, et par conséquent la nécessité pour la cellule de développer des processus permettant la connexion à travers la membrane, la transmission de messages et de signaux.

## 2. LA MEMBRANE ET LA PROTEINE MEMBRANAIRE D'ESCHERICHIA COLI.

*Escherichia coli* est une bactérie à Gram négatif appartenant à une grande famille de bactéries appelée *Enterobacteriaceae*. Les bactéries dans ce groupe des  $\gamma$ -protéobactérie sont regroupées en une cinquantaine de genres. Nous les rencontrons fréquemment en pathologie

infectieuse ainsi que dans les bio-industries (comme *Citrobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*). Etant une bactérie à Gram négatif, l'enveloppe d'*E. coli* est composée de 2 membranes lipidiques : la membrane interne et la membrane externe. Les deux membranes divisent l'espace en trois compartiments : le milieu extérieur, le périplasma, et le cytoplasme.

Le périplasma est le lieu de nombreux processus nécessaires à la croissance et à la survie de la bactérie. Il présente une certaine sensibilité aux changements de conditions environnementales (variations de pH, de température ou d'osmolarité).

On y trouve une fine couche de peptidoglycane assurant la forme et la rigidité de la cellule ; mais également un certain nombre de composés de nature oligo-saccharidique et de protéines. L'ensemble de ces constituants lui confère une consistance particulière, proche d'un gel (Hobot, et al. 1984).

Les deux membranes, avec une grande quantité de protéines associées, constituent une barrière qui permet à cellule de se différencier du milieu extérieur, de se nourrir, de communiquer, de faire des échanges et de se protéger des conditions hostiles du milieu extérieur.

#### 2.1. LA MEMBRANE EXTERNE D'*E. COLI* CONFERE A LA BACTERIE UNE BARRIERE DE PROTECTION ET AUSSI UNE PERMEABILITE SELECTIVE

Les composants de la membrane externe doivent conférer la rigidité nécessaire à cette membrane pour former une barrière protectrice vis-à-vis du milieu environnant souvent agressif, mais aussi la perméabilité nécessaire à sa survie. Ainsi, cette membrane doit d'une part limiter l'entrée par diffusion de composés toxiques, et d'autre part être un filtre sélectif permettant le passage d'éléments essentiels.

La composition de la membrane externe est très différente de celle de la membrane interne cytoplasmique. Elle possède deux couches, la composition de la couche interne est proche de celle de la membrane interne, avec un léger enrichissement en phosphatidyléthanolamine. Le feuillet externe est principalement constitué de lipopolysaccharide (LPS). On trouve également un glycolipide, appelé l'antigène commun entérobactérien, dont le rôle reste inconnu.

Au sein de cette membrane externe se trouvent associées plusieurs protéines. Elles forment essentiellement des canaux, plus ou moins spécifiques, permettant le transport de molécules. D'autres protéines, les lipoprotéines sont dites «structurales» car elles stabilisent l'architecture de l'enveloppe. En effet, elles possèdent un motif d'association au peptidoglycane créant un lien entre le périplasma et la membrane externe. La lipoprotéine Pal et la lipoprotéine majeure de Braun (Lpp) sont parmi les mieux décrites. La protéine OmpA est une protéine majeure qui possède également un site de liaison au peptidoglycane. Elle semble impliquée dans de nombreux processus. Elle fonctionne comme une adhésine, ou invasine, et participe à la formation de biofilms. Cependant, elle n'est pas toujours d'un apport bénéfique pour les bactéries puisqu'elle sert aussi de récepteur à certains bactériophages et participe à l'importation de bactériocines (pour revue, [\(Smith, et al. 2007\)](#)).

---

## 2.2. LE PEPTIDOGLYCANE EST LE SQUELETTE ESSENTIEL POUR LA BACTERIE

Dans le périplasma, le peptidoglycane ou muréine est une structure rigide mais hautement dynamique. Son épaisseur est comprise entre 5 et 8 nm (pour revue, [\(Scheffers and Pinho 2005\)](#)). Sa fonction principale est de préserver l'intégrité de la cellule. De plus, il est associé à la lipoprotéine majeure de Braun (Lpp), qui permet de lier de façon covalente le peptidoglycane à la membrane externe. Il sert donc d'ancrage à d'autres composants de l'enveloppe. Il constitue en partie le squelette bactérien, et contribue à définir la morphologie des bactéries. Enfin, il est intimement impliqué dans les processus de croissance et de division cellulaire. Chez *Escherichia coli*, le peptidoglycane est organisé en réseau de une à six couches de nature saccharo-peptidique superposées et liées entre elles. Une couche est composée d'un enchaînement de deux composés saccharidiques, le N-acétyl glucosamine (GlcNAc) et l'acide N-acétyl muramique (MurNAc), liés entre eux par des liaisons glycosidiques de type  $\beta$  (1-4). Les couches saccharidiques sont elles reliées par des liaisons peptidiques. La nature des acides aminés varie selon les micro-organismes. Chez *E. coli*, ces ponts peptidiques sont portés par MurNAc et sont formés de quatre acides aminés : L-alanine, D-glutamate, acide *meso*-diaminopimélique (m-A2pm) et D-alanine.

Ce réseau constitue un frein au passage de grosses molécules. Chez *E. coli*, la diffusion au travers de ce maillage est limitée aux molécules ayant un poids moléculaire inférieur à 50 KDa ([\(Demchick and Koch 1996\)](#)). Ceci pose un problème quant au transport de macromolécules à travers le périplasma, ainsi que la présence et la mise en place de complexes macromoléculaires, comme par exemple les systèmes de sécrétion ou les

machineries de différents appendices de surface. Dijkstra et Keck (1996) proposaient l'existence d'enzymes périplasmiques, les muréine-hydrolases, permettant le passage de ces macromolécules suite à la lyse (dégradation) locale du peptidoglycane (Dijkstra and Keck 1996). Des enzymes avec une telle activité ont été identifiées dans le cas de la mise en place de complexes macromoléculaires, tels que le flagelle (Koraimann 2003).

### 2.3. LA MEMBRANE INTERNE EST UNE MEMBRANE DOTÉE DE FONCTIONS ESSENTIELLES

Chez *E. coli*, la membrane interne ou cytoplasmique constitue la limite entre le cytoplasme et le périplasma.

Cette membrane est le siège des mécanismes de respiration, de transduction de signaux, de biosynthèse, d'importation de nutriments ou d'ions, ou de mécanismes d'exportation de composants vers l'extérieur du cytoplasme. C'est le cas des protéines du système Sec nécessaire à l'exportation de nombreuses protéines vers le périplasma. Cette membrane cytoplasmique est aussi le lieu de processus bioénergétique. En effet, cette membrane est énergisée par l'intermédiaire d'un gradient électrochimique mis en place en raison de l'absence de pores protéiques à diffusion passive dans cette bicouche lipidique. Ce gradient est dû à la différence de charges et de protons de part et d'autre de la membrane. Le flux de protons du cytoplasme vers le périplasma, provoqué par la chaîne respiratoire, entraîne une différence de potentiel de part et d'autre de la bicouche lipidique. La face cytoplasmique est alors électronégative, et la face périplasmique électropositive.

La membrane interne contient plus de protéines que la membrane externe. Les protéines de membrane interne possèdent des structures très divergentes. Ces protéines ont doté aussi la membrane interne de différentes fonctions. Ici nous allons nous intéresser au processus d'acheminement des protéines au travers de la membrane.

#### 2.3.1. ADRESSAGE, EXPORT, ET SECRETION DE PROTEINE

Chez les bactéries à Gram négatif, les protéines sont synthétisées dans le cytoplasme. Certaines y restent, d'autres doivent traverser les différents compartiments de l'enveloppe pour atteindre leur localisation finale : la membrane interne, le périplasma ou la membrane externe. Enfin, certaines protéines peuvent être sécrétées dans le milieu environnant.

### 2.3.1.1. ADRESSAGE DES PROTEINES A LA MEMBRANE INTERNE

---

Chez *E. coli*, quelque 27 protéines (périplasmique ou de la membrane interne) sont identifiés comme le substrat du système de translocation TAT (Berks, et al. 2005). Ces protéines contiennent généralement des cofacteurs métalliques. Leurs précurseurs déjà repliés sont transportés *via* le système Tat, utilisant l'énergie issue de la force proton motrice (fpm) (Palmer, et al. 2010).

La majorité des protéines de l'enveloppe ou sécrétées d'*E. coli* sont adressées par le translocon Sec (constitué de SecYEG) en utilisant 2 voies distinctes : la voie SRP et la voie SecA/B. La plupart des préprotéines sont adressées via le chaperon SecB, tandis que les autres sont adressées sous la forme d'un complexe Ribosome- peptide naissant- SRP par la protéine SRP (signal recognition particle). La translocation et insertion de certaines protéines ne dépendent que de la protéine YidC (figure1-2). En résumé, on distingue pour l'adressage des protéines les trois cas suivants :

- a. Dans le premier cas, la protéine est libérée dans le cytoplasme, puis amenée à la membrane interne et adressée à la protéine YidC soit par une interaction directe avec YidC soit à l'aide d'une protéine chaperon inconnue (a et e1). L'insertion de ces protéines ne nécessite que la force proton motrice comme source d'énergie.
- b. Dans le second cas, la protéine naissante est reconnue par un chaperon nommé SRP. SRP se fixe directement à la partie hydrophobe de la séquence Signal de la protéine naissante (b1). Ensuite le complexe Ribosome-ARNt-ARNm-protéine naissante-SRP est soit adressé au translocon Sec à l'aide du récepteur de la SRP (FtsY chez *E. coli*) (Valent, et al. 1995) (b3-b4), soit adressé directement à YidC (b2). Enfin, la protéine est insérée cotraductionnellement et transférée latéralement dans la membrane interne (e1 et e2).
- c. Dans le troisième cas, le trigger facteur oriente la préprotéine naissante vers la voie SecB en bloquant l'interaction entre le SRP et le peptide signal (Beck, et al. 2000). Pendant la traduction, SecB ou d'autres chaperons peuvent s'associer aux préprotéines naissantes afin de maintenir la protéine sous forme non-repliée(c1). La protéine est ensuite adressée post-traductionnellement au translocon Sec *via* la protéine SecA (c2). Les protéines SecD-SecF associées au translocon tirent le C-terminal du polypeptide vers le périplasme, la protéine est alors transloquée à

travers la membrane interne. Dans le cas des protéines intégrales de membrane, YidC intervient pour l'insertion dans la membrane interne (e2).

Pour revues, (Driessen and Nouwen 2008; Yuan, et al. 2010).

En cas de mauvais repliement, les protéines seront dégradées.

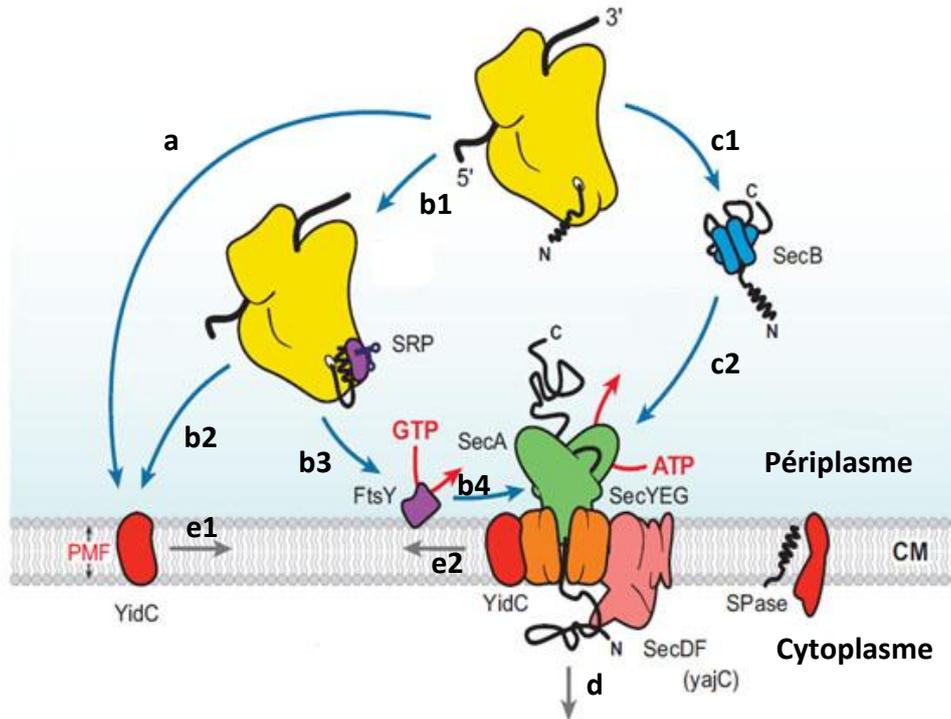


Figure 1-2 : Adressage des protéines à travers la membrane interne d'*E. coli*. D'après (Driessen and Nouwen 2008).

Nous noterons que les systèmes SecA/B et SRP sont impliqués dans la mise en place de protéines de membrane interne et l'exportation de protéines vers le périplasm. Les protéines se retrouvent alors dans le compartiment périplasmique, certaines y demeurent et d'autres doivent y transiter pour atteindre la membrane externe ou le milieu extérieur dans le cas des protéines sécrétées (Figure 1-2 d).

### 2.3.1.2. EXPORT DES PROTEINES DANS LA MEMBRANE EXTERNE

Principalement, deux types de protéines sont exportés dans la membrane externe : les lipoprotéines qui s'ancrent dans la membrane grâce à un groupement acylé et les protéines

intégrales de membrane qui ont exclusivement une forme de tonneau  $\beta$ . Les lipoprotéines et les protéines formant des tonneaux  $\beta$  (les porines par exemple) sont adressées par l'intermédiaire de systèmes composés de chaperons périplasmiques et de protéines de membrane externe. Le système Lol permet le transport et l'adressage des lipoprotéines, alors que le système Bam permet l'adressage des tonneaux  $\beta$ .

Les protéines intégrales de membrane externe ont une structure en tonneau  $\beta$  constituée de brins  $\beta$  antiparallèles. Le mécanisme d'adressage à partir du périplasme et l'insertion dans la membrane externe est peu connu. Après la translocation par le translocon Sec, les précurseurs protéiques sont pris en charge par les protéines chaperons périplasmiques telles que Skp ou SurA (pour revue, [\(Mogensen and Otzen 2005\)](#)). Les protéines sont ensuite adressées à la machinerie BAM (Omp85). La machinerie BAM ( $\beta$ -barrel assembly machinery) est composée de 5 protéines : une protéine intégrale de membrane : BamA et 4 lipoprotéines BamB, BamC, BamD BamE ([Figure 1-3 B](#)). BamA (ou YaeT chez *E. coli*) possède deux domaines: un domaine périplasmique riche en motif «POTRA» (pour POLypeptide TRanslocation Associated) et un domaine intégral de membrane externe organisé en tonneau  $\beta$ . Les domaines PROTA pourraient reconnaître les protéines de membrane externe en conformation non native dans le périplasme ([\(Bos and Tommassen 2004\)](#)). Chez *Escherichia coli*, un mutant conditionnel *yaeT* n'est plus capable d'incorporer les protéines de membrane néo-synthétisées ([\(Doerler and Raetz 2005\)](#)). Le mécanisme d'insertion des protéines dans la membrane externe reste à élucider (Pour revue [\(Knowles, et al. 2009\)](#)).

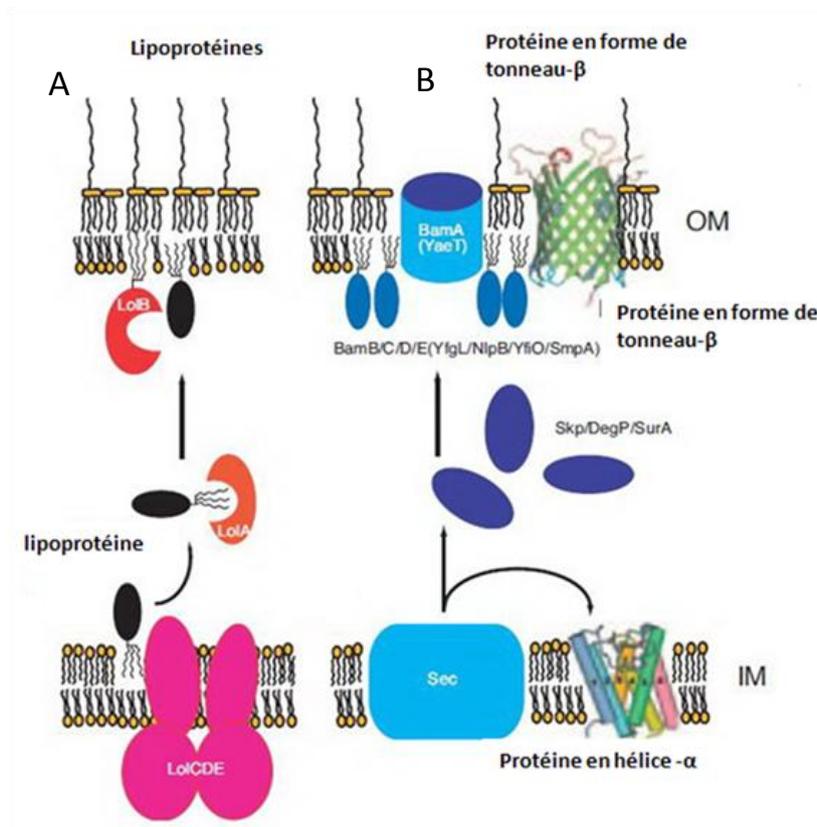


Figure 1-3 : Adressage des différents composants de la membrane externe : a/ adressage des lipoprotéines ; b/ adressage des protéines en tonneau-β par le complexe BAM (β-barrel assembly machinery). D'après (Tokuda 2009).

Les lipoprotéines sont synthétisées sous forme de précurseurs adressées à la membrane interne via le translocon Sec. Le peptide signal est inséré dans la membrane interne. Le précurseur est alors acylé au niveau du groupement  $-SH$  de la cystéine par la protéine Lgt. Le précurseur est mûré par la protéine LspA qui coupe en amont de la cystéine. L'extrémité  $NH_2$  est alors acylée par Lnt. Selon la nature de l'acide aminé voisin de la première cystéine (résidu en position +2 après la maturation), les lipoprotéines sont adressées soit à la membrane interne (+2=Asp), soit à la membrane externe via la machinerie Lol (+2=Autre acide aminée) (Tokuda 2009). Les lipoprotéines de membrane interne sont acylées, mais n'interagissent pas avec la machinerie Lol (Fukuda, et al. 2002; Robichon, et al. 2005).

Le complexe de membrane interne LolCDE est un transporteur ABC, il reconnaît et délivre la lipoprotéine mature à la protéine chaperon périplasmique LolA. Le complexe LolA/lipoprotéine traverse le périplasma et délivre à son tour la lipoprotéine à un récepteur de membrane externe LolB. La lipoprotéine est finalement incorporée au niveau de la membrane externe. L'acylation d'une lipoprotéine de membrane externe est essentielle à sa prise en charge par le système Lol (Figure 1-3 A) (Fukuda, et al. 2002).

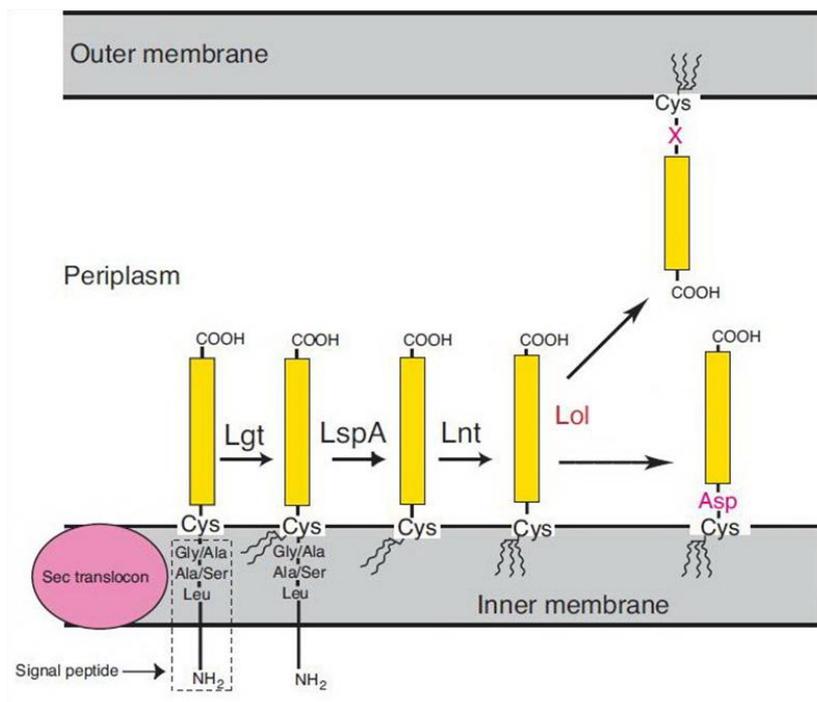


Figure 1-4 : Adressage et insertion des lipoprotéines dans la membrane. D'après (Tokuda & al 2009) .

### 2.3.1.3. SECRETION DES PROTEINES DANS LE MILIEU EXTERIEUR

De nombreuses protéines sont sécrétées vers le milieu extérieur, notamment les facteurs de virulence pour les bactéries pathogènes. Chez les bactéries à Gram négatif, une classification des voies de sécrétion du type I à VI a été réalisée (pour revue générale, (Gerlach and Hensel 2007; Tseng, et al. 2009)). Chaque système possède des spécificités de substrat et de mécanisme de sécrétion. Certains systèmes permettent le transport de macromolécules du cytoplasme vers le milieu extérieur en une seule étape, c'est le cas des systèmes de sécrétion de type I, III, et IV. Les systèmes de sécrétion de type III et IV injectent leurs substrats directement du cytoplasme de la bactérie vers le cytosol de la cellule eucaryote. Le système de sécrétion de type IV est capable de transloquer des protéines, des complexes multiprotéiques, mais aussi nucléoprotéiques. Les systèmes de sécrétions de type II et V dépendent de la voie Sec pour le passage de la membrane interne. Le système de sécrétion de type II forme un complexe reliant la membrane interne jusqu'à la membrane externe appelé sécréton. Le système de sécrétion de type V inclut les autotransporteurs et les systèmes à deux partenaires. Un nouveau système de sécrétion, de type VI, a été identifié chez *Vibrio cholerae* et *Pseudomonas aeruginosa* en 2006 (Mougous, et al. 2006; Pukatzki, et al. 2006), il semble permettre la sécrétion de facteurs de virulence dans le cytoplasme de la cellule hôte.

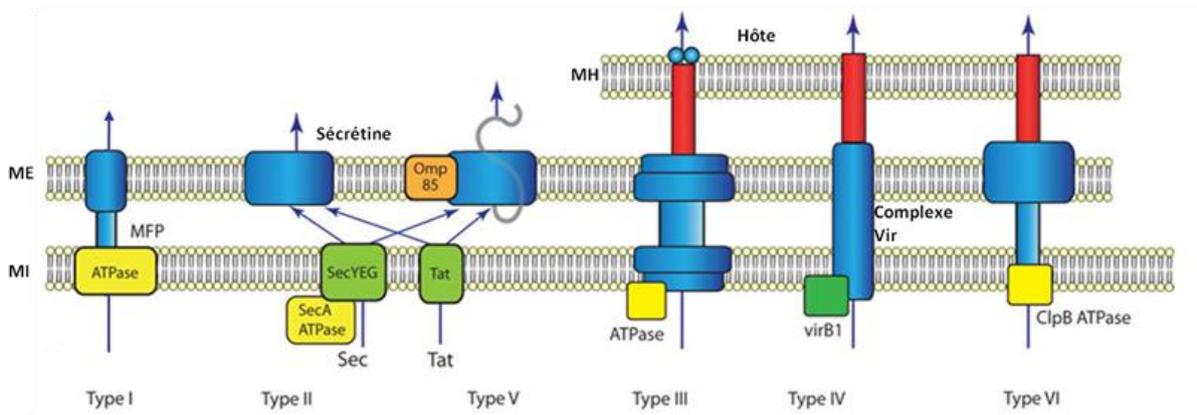


Figure 1-5 : Représentation schématique des systèmes de sécrétion chez les bactéries à Gram négatif. D’après (Tseng, et al. 2009). ME : membrane externe ; MI : membrane interne ; MFP : membrane fusion protein ; MH : Membrane de l’hôte.

2.3.2. BIOENERGETIQUE DE LA CELLULE

*Escherichia coli* est une bactérie anaérobique facultative. En absence d’O<sub>2</sub>, Elle peut fermenter le glucose en donnant de l’acide formique (HCOOH), de l’acide lactique, et de l’acide acétique. L’acide formique est ensuite décomposé en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>. L’énergie issue de l’hydrolyse de composés nutritifs est essentiellement libérée sous forme d’ATP. En présence d’O<sub>2</sub>, *E. coli* hydrolyse le glucose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O. Ce processus libère d’avantage d’énergie sous forme d’ATP. L’énergie stockée dans les nutriments peut également être libérée sous forme de PMF (la force proton motrice). (Neidhardt and Umbarger 1996). La force proton motrice est constituée par un gradient de proton (une concentration différente en [H<sup>+</sup>]) de part et d’autre de la membrane interne résultant de l’impermeabilité de cette membrane aux ions chargés et tient compte également de la présence de chaque ion de part et d’autre de la membrane, la valeur de ce potentiel est donnée par équation de Goldman-Hodgkin-Katz

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \left( \frac{\sum_i^N P_{M_i^+} [M_i^+]_{out} + \sum_j^M P_{A_j^-} [A_j^-]_{in}}{\sum_i^N P_{M_i^+} [M_i^+]_{in} + \sum_j^M P_{A_j^-} [A_j^-]_{out}} \right)$$

*P* : Perméabilité de chaque ion en mètre par seconde

*E<sub>m</sub>* : le potentiel de membrane du à la différence de concentration des particules chargées des deux côtés de la membrane.

$M^+$  : un cation monovalent;  $A^-$  : un anion monovalent;

Si nous isolons la concentration de proton ou de sodium des autres ions, nous pouvons obtenir l'expression suivante :

$$PMF = \Delta\psi - 2,3RT \Delta pH/F$$

$$SMF = \Delta\psi - \frac{2,3RT}{F} \log \left( \frac{[Na^+]_{ex}}{[Na^+]_{in}} \right)$$

■  $\Delta\psi$  : la différence du potentiel électrochimique d'une membrane est exprimé en Volt

■  $[Na^+]$ ,  $\Delta pH$  ( $[H^+]$ ) est mesurable et exprimé en mol/L ex=extérieur in= intérieur

PMF et SMF ( $\Delta\mu$ ) sont exprimés en Volt

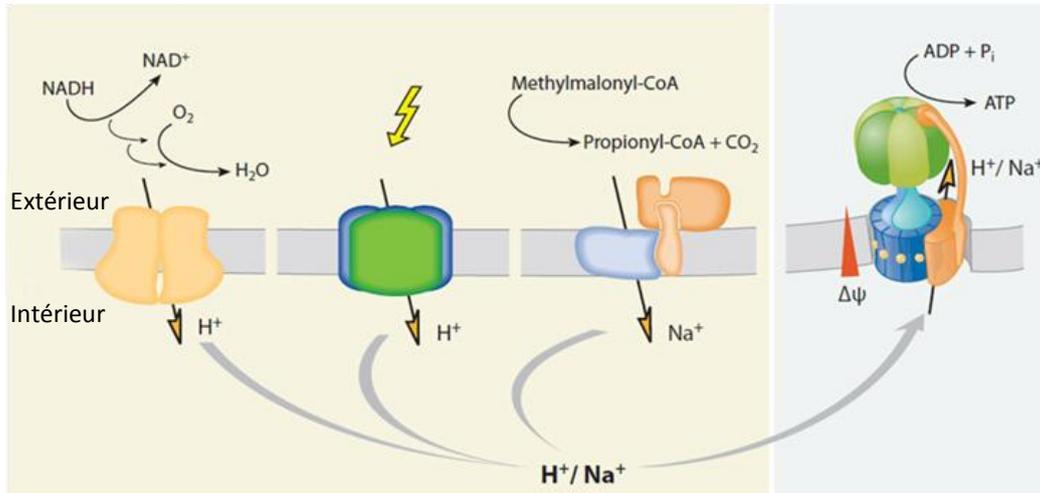
D'après l'équation, nous noterons que la PMF est constituée de deux termes : le potentiel électrique de membrane ( $\Delta\psi$ ) et la différence de concentration en protons ( $\Delta pH$ ).

Chez les microorganismes marins, l'abondance des ions sodium  $Na^+$  génère une autre forme d'énergie la SMF (sodium motive force), de façon similaire à la force proton motrice, la force  $s$

Divers processus peuvent alimenter le gradient de proton ou de sodium (Figure 1-6). Chez les organismes comme *E. coli*, la respiration est la principale voie pour construire un gradient de proton. Chez les organismes photosynthétiques, le gradient de proton peut être fourni par la photosynthèse. Chez les organismes anaérobies le gradient de proton peut provenir de réaction de décarboxylation (von Ballmoos, et al. 2009). Chez les organismes marins le gradient de  $Na^+$  peut aussi être converti à partir de la PMF par un antiport  $H^+/Na^+$  (Yorimitsu and Homma 2001).

La contribution du  $\Delta\psi$  et du  $\Delta pH$  dans la production d'ATP varient selon les organelles. Ainsi le  $\Delta\psi$  joue un rôle plus important que le  $\Delta pH$  dans la synthèse d'ATP mitochondrial. Inversement le  $\Delta pH$  joue un rôle plus important dans la synthèse de l'ATP chloroplastique. La PMF est impliquée non seulement dans le processus de synthèse d'ATP mais aussi dans le transport actif chez les procaryotes, les plantes et les champignons. La lactose perméase (Kaback 1992) et les pompes à efflux (Schuldiner, et al. 1994) sont des paradigmes d'utilisation de la PMF pour le transport de substrat à travers ces transporteurs. La PMF ou la SMF alimente aussi la rotation du moteur du flagelle ; la PMF assure le bon fonctionnement

du système Tol-Pal et l'importation des ions et des nutriments via le système Ton-ExbB/D (Voir la partie II).



**Figure 1-6 : Processus biologiques produisant de l'énergie potentielle sous forme de PMF ou SMF (D'après (von Ballmoos, et al. 2009)).**

#### LE CANAL IONIQUE DE L'ATP SYNTHASE

L'ATP synthase est le paradigme pour synthétiser l'ATP à partir de l'énergie potentielle sous forme de SMF ou PMF. L'ATP synthase d'*Escherichia coli* est une ATPase de type F, encore appelée F1Fo ATP synthase. Cette enzyme de masse moléculaire élevée (entre 550 à 650 kDa) est constituée de deux domaines protéiques : un domaine membranaire (Fo, o pour oligomycine) et un domaine extramembranaire (F1). Lorsque le gradient de protons est favorable, l'enzyme couple la synthèse de l'ATP (à partir de l'ADP et du Pi) au flux spontané de protons qui s'effectue à travers Fo vers la face de la membrane où se situe F1.

Ce processus peut être divisé en 2 étapes :

- Le domaine Fo convertit l'énergie potentielle en énergie mécanique, et la transmet au domaine F1.
- Le domaine F1 utilise cette énergie pour synthétiser l'ATP.

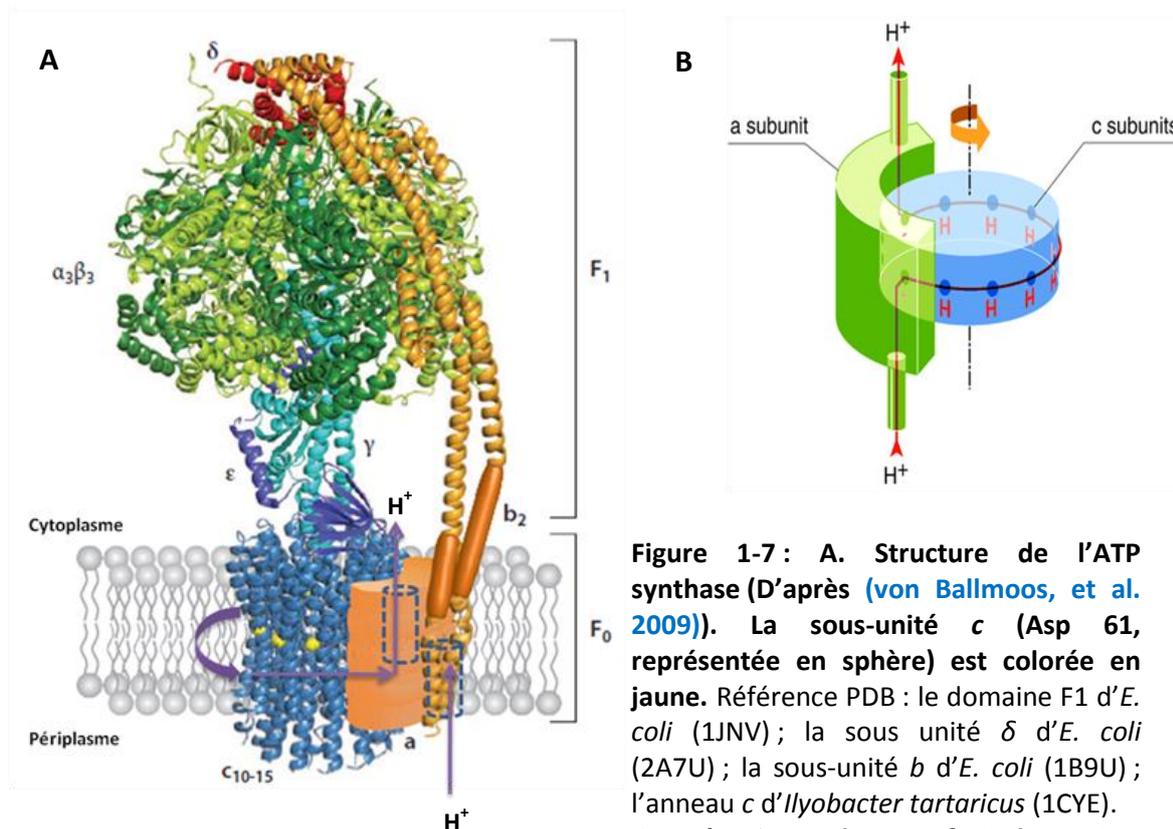
Ici nous nous intéressons uniquement à la première étape.

Le domaine Fo de l'ATP synthase est un complexe protéique intégré à la membrane. La stœchiométrie des sous-unités est 1a, b2, 10-15c (10c chez *E. coli* (Jones, et al. 1998)).

La première étape de conversion de l'énergie ne concerne que les sous-unités *c* et *a* du domaine Fo.

La structure de la sous-unité *c* a été résolue chez *Ilyobacter tartaricus* (PDB code : 1CYE). Les sous-unités *c* (très hydrophobes), sont formées de 2 hélices  $\alpha$  transmembranaires. L'une de ces hélices renferme un groupement protonable (Asp 61 chez *E. coli*), situé en position médiane. Les sous-unités *c* forment un anneau au sein de la membrane (figure 1-7 A et B colorés en bleu).

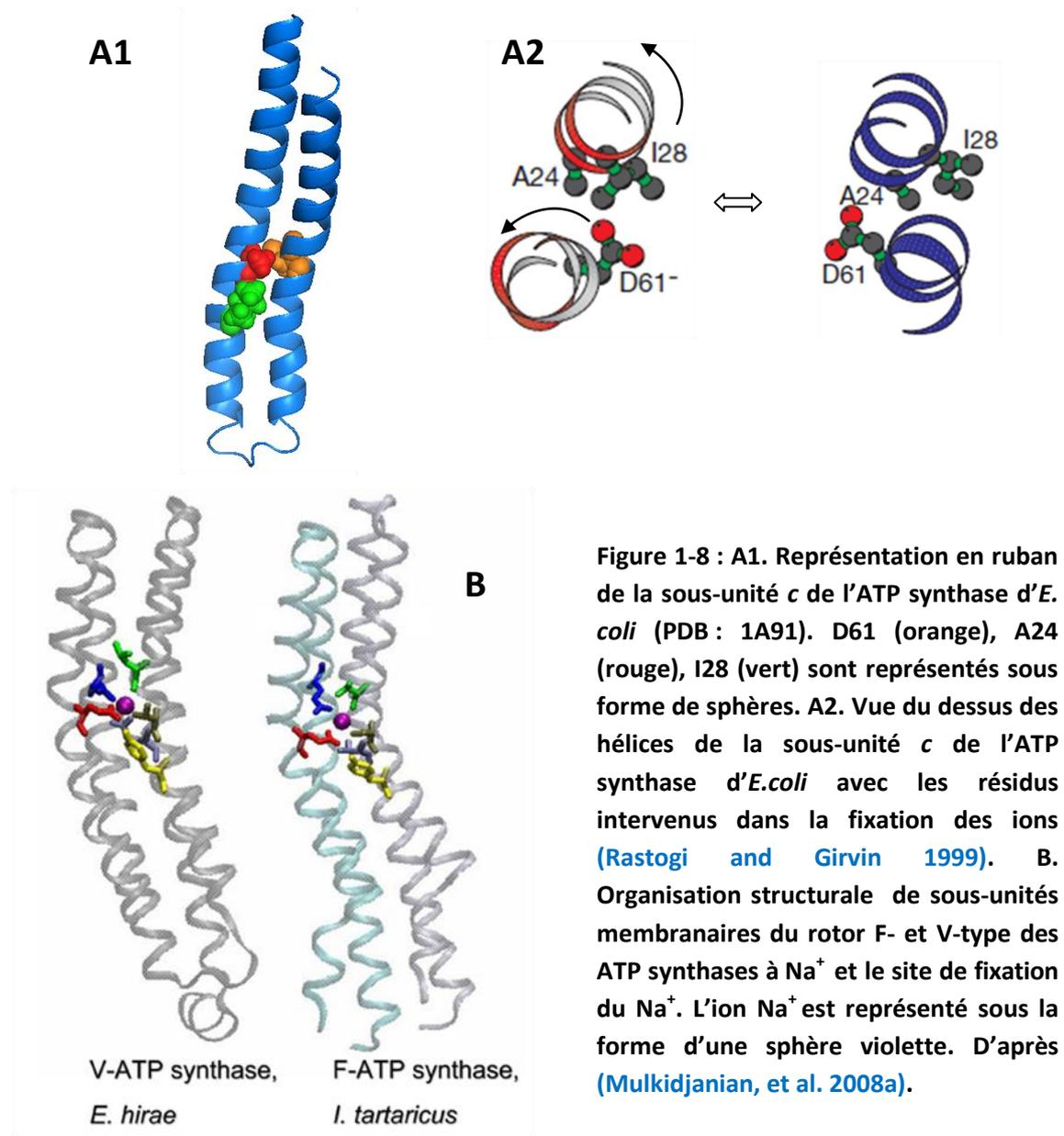
La sous-unité *a* forme 2 demi-canaux à protons : un du côté périplasma un du côté cytoplasme. Ces deux demi-canaux permettant le passage des protons entre les deux faces de la membrane à l'intérieur de la bicouche. Le passage du proton d'un demi canal à l'autre s'effectue *via* les sous-unités *c*.



Le changement conformationnel de la sous-unité *c* au sein du processus de transduction du proton a été identifié. La déprotonation de l'Asp61 s'accompagne de la rotation de l'hélice contenant l'Asp61 de 140°. La rotation change la position de l'aspartate déprotoné qui se

retrouve sur la face opposée par rapport à sa position initiale. Ainsi l'Asp déprotoné est en face de l'Asp protoné de la sous-unité *c* voisine. La rotation de l'anneau *c* amène l'Asp déprotoné dans le demi-canal périplasmique, elle amène aussi un résidu Asp protoné qui a effectué presque un tour de rotation dans l'anneau *c* dans le demi-canal cytoplasmique. L'Asp protoné libère le proton dans le cytoplasme accompagnant un changement conformationnel de sous-unité *c*. La sous-unité *c* retrouve sa conformation initiale. Le cycle peut recommencer (Figure 1-8 A2 ; 1-7) (Rastogi and Girvin 1999).

Les ATP synthases de type Fo-F1 et de type Vo-V1 (présente chez certaines bactéries) peuvent être divisées en 2 groupes : celles qui fonctionnent avec la PMF et celles qui utilisent la SMF. Ces deux groupes se différencient notamment par les résidus dans la sous-unité *c* qui stabilisent les ions sodium ou le proton. La sous-unité *c* des ATP synthases à proton possède un résidu Asp (Asp61 chez *E. coli*) à la position médiane de l'hélice. A l'évidence, le diamètre d'un ion Na<sup>+</sup> (hydraté ou non hydraté) est beaucoup plus grand que celui d'un proton. Un seul résidu ne suffit pas pour stabiliser la fixation de Na<sup>+</sup>. Pour cette raison la coordination du Na<sup>+</sup> dans la sous-unité *c* de l'ATP synthase à sodium est assurée par 6 molécules d'eau (Mulkidjanian, et al. 2008b) et 5 résidus se trouvant dans les hélices adjacentes : Glu, Gln Ser/Thr, Val/Leu, Gln/ Thr+H<sub>2</sub>O. Un résidu Tyr est important pour stabiliser le résidu Glu dans le processus de la coordination (Mulkidjanian, et al. 2008a).



#### 2.4. IMPORTATION DES MOLECULES DANS LA CELLULE

Pour survivre, les bactéries doivent se nourrir. Les nutriments doivent franchir l'enveloppe bactérienne et entrer dans le cytoplasme pour être utilisés. Les petites molécules comme H<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub>, O<sub>2</sub> ou bien le glycérol peuvent traverser la membrane librement en suivant leur gradient de concentration. Les ions et les grandes molécules doivent utiliser un autre mécanisme que la diffusion passive pour franchir la membrane en suivant ou même parfois en s'opposant au gradient de concentration.

La plupart des molécules traversent l'enveloppe en plusieurs étapes : Elles franchissent lors d'une première étape la membrane externe puis elles sont acheminées le long du périplasme pour finalement traverser la membrane interne et entrer dans le cytoplasme.

---

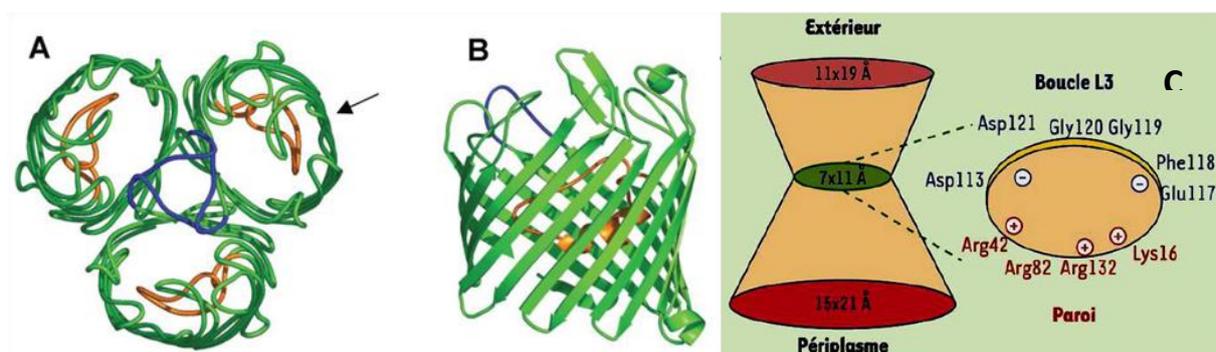
#### 2.4.1. IMPORTATION AU TRAVERS LA MEMBRANE EXTERNE

##### PORINES

---

Les porines sont des protéines au sein de cette membrane externe. Elles forment des canaux qui permettent la diffusion passive de molécules hydrophiles d'une taille inférieure à 600 Da. La taille du pore d'OmpF est plus grande que celle d'OmpC (Benz 1984). Chez *E.coli*, les porines majoritaires sont OmpF, OmpC et PhoE (Environ 100 000 copies par cellule). Bien que ces canaux soient dits non spécifiques, ils présentent certaines spécificités. Ainsi, OmpF et OmpC préfèrent les composés cationiques alors que les composés anioniques diffusent préférentiellement par PhoE. De plus, OmpF permet la diffusion de solutés légèrement plus grands. L'expression des gènes codant pour ces porines est régulée. Le rapport OmpC/OmpF varie en fonction de l'osmolarité du milieu, alors que le gène *phoE* est induit en carence de phosphate (Neidhardt and Umbarger 1996).

D'autres porines sont davantage spécifiques. Par exemple, la porine FadL est impliquée dans le transport des acides gras à longue chaîne (Black 1991), ScrY est nécessaire pour l'importation de sucrose (Schmid, et al. 1991), LamB est spécialisée dans le transport du maltose et des maltodextrines, et Tsx est requis pour le transport de nucléosides, respectivement. La concentration en substrat respectif intervient dans la régulation de la synthèse de ces porines (pour revue, (Delcour 2009; Nikaido 2003)).



**Figure 1-9 : Structure de la porine OmpF d'*E.coli*. D'après (Nikaido, 2003).**

(A) Vue du dessus du trimère. La boucle L2 est colorée en bleu et la boucle L3 est en orange.

(B) Vue de côté. La flèche en (A) présente l'orientation de cette vue de côté.

(C) Représentation schématique du pore d'OmpF par la boucle L3, les résidus chargés sur la paroi et la boucle L3 sont indiqués.

Au niveau architectural, ces porines de diffusion s'associent sous forme de trimères. Chaque monomère constitue un tonneau formé de 16 feuillettes  $\beta$  anti-parallèles, délimitant un large canal. Les brins  $\beta$  sont reliés entre eux par de courtes boucles périplasmiques et de longues boucles du côté externe. La boucle L2 sert de connection entre les monomères et joue un rôle dans la stabilisation de la structure. La boucle L3, particulièrement longue, est repliée à l'intérieur du tonneau et forme une zone de constriction (Figure 1-9). Les résidus (chargés) du pore faisant face à la boucle L3 participent également à la constriction du canal. Certains sont responsables de la sélectivité des solutés importés par ces porines. En effet, les résidus chargés vont empêcher les molécules hydrophobes de passer à travers le pore (Figure 1-9 C). En ce qui concerne PhoE, des expériences de mutagenèse dirigée ont montré l'importance du résidu lysine 125 dans la sélectivité vis-à-vis des anions. Cette lysine est remplacée par une glycine dans le cas d'OmpF (Bauer, et al. 1989).

Plus récemment, la structure de la porine OmpC a été résolue par cristallographie à 2Å (Basle, et al. 2006). Elle est superposable à celle d'OmpF, et notamment au niveau de la constriction du pore. Pourtant, ces porines importent des composés de tailles légèrement différentes. L'étude des structures a montré que ces deux porines se distinguent par la différence de potentiel électrostatique au niveau du pore.

Pour la porine LamB, la structure est également trimérique mais les tonneaux sont formés de 18 brins  $\beta$  (Schirmer, et al. 1995). La boucle L3 se replie à l'intérieur du pore mais forme

une constriction plus étroite. Enfin, des études par mutagenèse dirigée ont montré l'importance des résidus aromatiques dans le transport spécifique des maltodextrines (pour revue, (Klebba 2002)).

### RECEPTEURS SPECIFIQUES

---

Les nutriments comme les éléments essentiels (les vitamines ou les métaux par exemple) sont relativement grands, et souvent des composés rares. L'import de ces molécules requiert des récepteurs spécifiques, à haute affinité pour leur ligand, tels que BtuB (Importation de la vitamine B12), FepA ou FhuA (sidérophores) (Ferguson, et al. 1998).

Contre le gradient, le processus d'importation a besoin d'un apport d'énergie. Cette énergie provient de la membrane interne sous la forme de la force proton motrice. En réponse à l'apport énergétique, le récepteur subit un changement conformationnel conduisant à l'internalisation du substrat. On parle alors de transport actif. L'activation du récepteur dépend d'un système protéique de membrane interne, le système TonB qui va transduire l'énergie provenant de la membrane interne. La structure de ces récepteurs, l'organisation du système TonB, ainsi que le mécanisme d'acquisition de ces composés seront décrits dans le chapitre II.

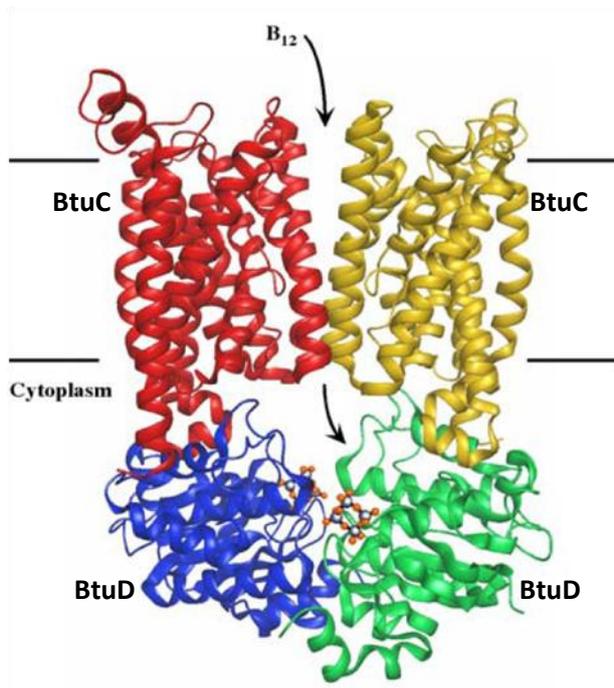
#### 2.4.2. L'ACHEMINEMENT AU TRAVERS DE LA MEMBRANE INTERNE NECESSITE L'APPORT D'ENERGIE.

---

### TRANSPORTEURS ABC

---

Une fois que les grandes molécules comme les sidérophores ou la Vitamine B12 sont importées dans le périplasme, elles doivent encore franchir la membrane interne afin d'être utilisées. Ce processus nécessite l'assistance d'un système appelé le transporteur ABC. Le transporteur ABC est conservé chez tous les être-vivants. Il intervient non seulement dans l'importation des nutriments, mais aussi dans divers processus biologiques comme l'exportation des composants toxiques, la sécrétion des facteurs de virulence, la biogénèse du flagelle (Higgins 1992).



**Figure 1-10** : Représentation en ruban de la structure du transporteur BtuCD. Le site de fixation de l'ATP est occupé par le cyclotétravanadate (en boule et bâton). Le cheminement de la VB12 est indiqué par la flèche. D'après (Locher, et al. 2002).

Le transporteur de la Vitamine B12 est constitué par deux molécules de BtuC (rouge et jaune) et deux molécules de BtuD (vert et bleu). La Vitamine B12 (cyanocobalamine) est accompagnée et adressée du récepteur BtuB au transporteur par BtuF. Puis elle est conduite à travers l'interface des deux molécules de BtuC. Elle va enfin sortir du côté cytoplasmique au niveau de l'interface formé par les 4 sous-unités (2BtuD+2BtuC). Ce processus est énergisé par l'hydrolyse de l'ATP (Locher, et al. 2002).

### LACTOSE PERMEASE

Certains nutriments sont importés par les transporteurs ABC, d'autres comme le lactose sont importés par des protéines de la famille MFS (Major Facilitator Superfamily) comme la protéine LacY. Dans cette famille, on dénombre quelques 4000 protéines transporteurs (Kaback 2005).

LacY est une protéine intégrale de membrane interne de 417 acides aminés. Elle se compose à 80-85% d'hélices alpha (Foster, et al. 1983). C'est un lactose/H<sup>+</sup> symport, c'est-à-dire que le gradient de proton fournit l'énergie au transport du lactose. LacY est le premier transporteur membranaire à avoir été solubilisé et purifié dans des conditions natives (Newman, et al. 1981; Viitanen, et al. 1984). Du fait de sa grande flexibilité, la protéine LacY n'a pu être cristallisée dans sa forme sauvage. Un mutant ponctuel qui bloque la conformation de LacY a pu être identifié et la structure cristalline de LacY a pu voir le jour en 2003 (Abramson, et al. 2003). Avant l'obtention de la structure cristalline, des approches

biochimiques et biophysiques ont été mises en œuvre pour élucider la structure de LacY, notamment l'approche du « cystéine scanning » (Frillingos, et al. 1998; Kaback, et al. 2001). Cette approche a permis de découvrir les résidus importants dans le transport du proton qui correspondent aux résidus His322, Glu325 et Arg302 (figure 1-11) (Kaback, et al. 2001) Une récente étude en AFM (Microscopie à Force Atomique) sur un cristal bidimensionnel de LacY obtenu dans une matrice de phospholipide POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-snglycero-3-phosphocholine) montre une organisation dimérique de LacY et une symétrie monoclinique  $p2$  (Merino-Montero, et al. 2006).

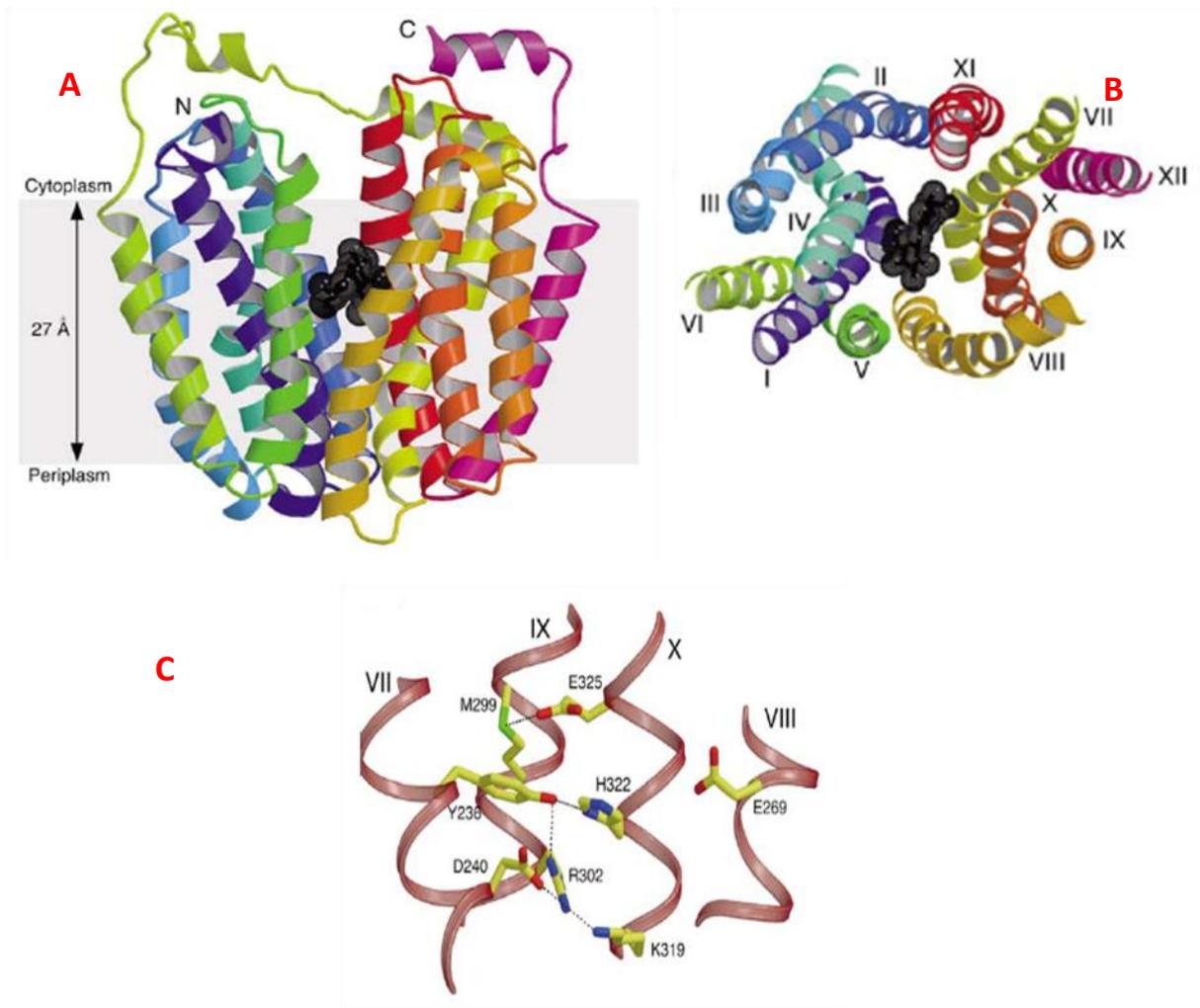


Figure 1-11 : A. Structure de la Lactose perméase d'*E. coli* représentée en ruban; B. La vue au dessus de A; l'inhibiteur  $\beta$ -D-galactopyranosyl-1-thio- $\beta$ -D-galactospyranoside (TDG) est représenté en sphère noire ; C. Les résidus engagés dans la formation du canal et dans le transport des ions sont indiqués. D'après (Kaback 2005).

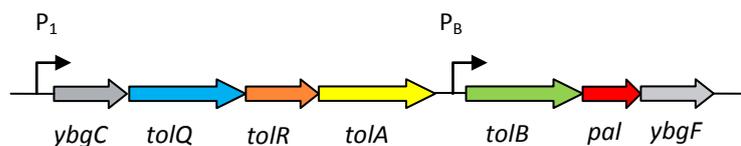


## Chapitre I- Partie II : Systèmes Tol-Pal, TonB et MotA-B

### I. SYSTEME TOL-PAL

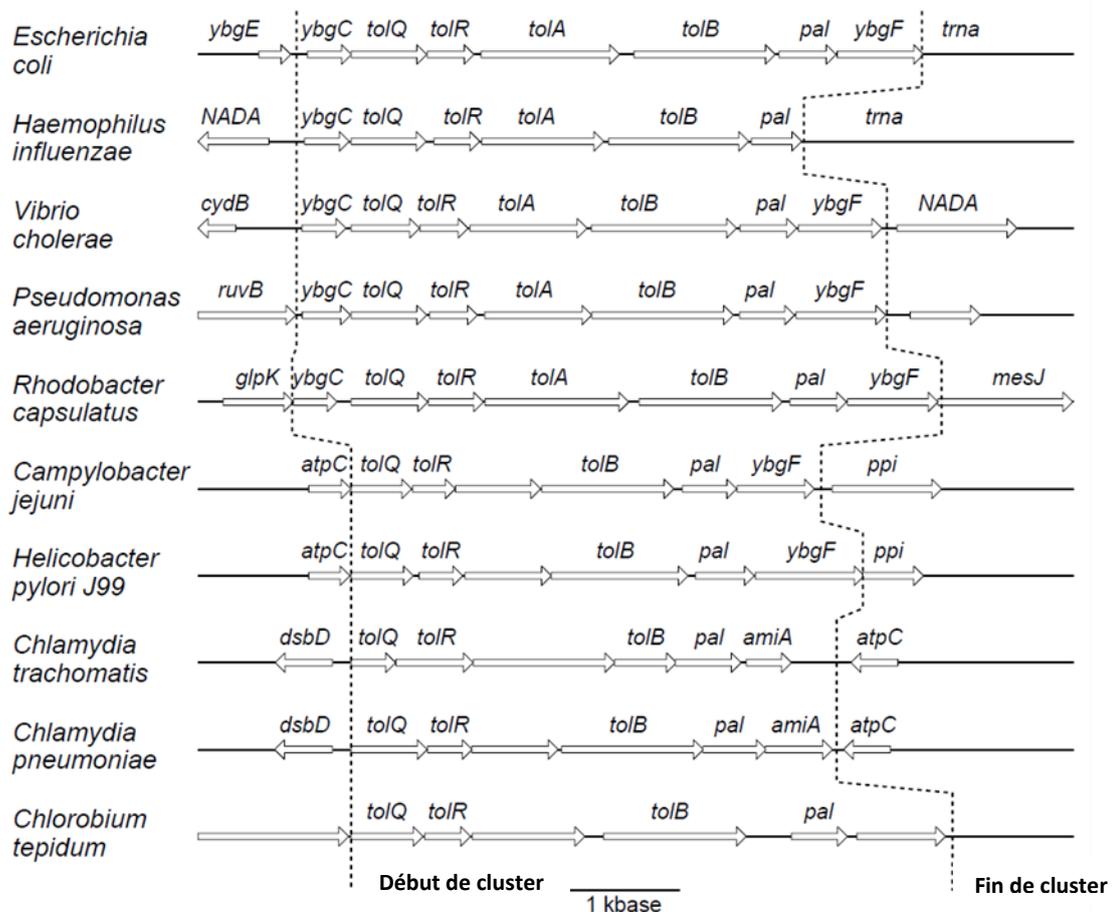
#### 1. GENERALITE

Le système protéique Tol-Pal est un complexe de l'enveloppe retrouvé chez la plupart des bactéries à Gram-négatif. Ce système est composé de 5 protéines: TolQ, TolR, TolA, TolB et Pal. Leurs gènes s'organisent en opéron chez la plupart des bactéries à Gram-négatif (Sturgis 2001). Les gènes codant pour les protéines du système Tol-Pal sont localisés à la minute 17 du chromosome d'*Escherichia coli* (Webster 1991). Les 5 gènes du système Tol-Pal sont encadrés par deux gènes *ybgF* et *ybgC*. Les protéines codées par ces deux gènes ne sont pas conservées et ont encore une fonction inconnue.



**Figure 2-1 : Organisation génétique de l'opéron *tol-pal* chez *Escherichia coli*. D'après (Vianney, et al. 1996)**

Chez *E. coli*, l'expression des gènes *tol-pal* est contrôlée par deux promoteurs : le promoteur  $P_1$  et  $P_B$ .  $P_1$  permet la transcription de la totalité de l'opéron *tol-pal* et  $P_B$  est situé en amont du gène de *tolB*, il permet la transcription de *tolB-pal-ybgF* (Vianney, et al. 1996). Les promoteurs  $P_1$  et  $P_B$  sont contrôlés par RscC, la protéine senseur du système à deux composants RcsBC, système impliqué dans la régulation des gènes codant pour la synthèse et la mise en place de la capsule. L'expression des gènes *ybgC-tolQRA* est diminuée d'un facteur 2 dans un mutant *rscC*, mais ce n'est pas le cas pour les gènes *tolB* et *pal*. La régulation de l'expression des gènes *ybgC-tolQRA* est indépendante du régulateur de réponse, RcsB, suggérant que RcsC fournit l'information à un autre régulateur non identifié. L'expression des gènes *tolR*, *tolA*, et *tolB* est induite à faible température (Clavel, et al. 1996). Ceci est en accord avec le phénotype mucoïde observé chez les mutants *tol-pal* à faible température.



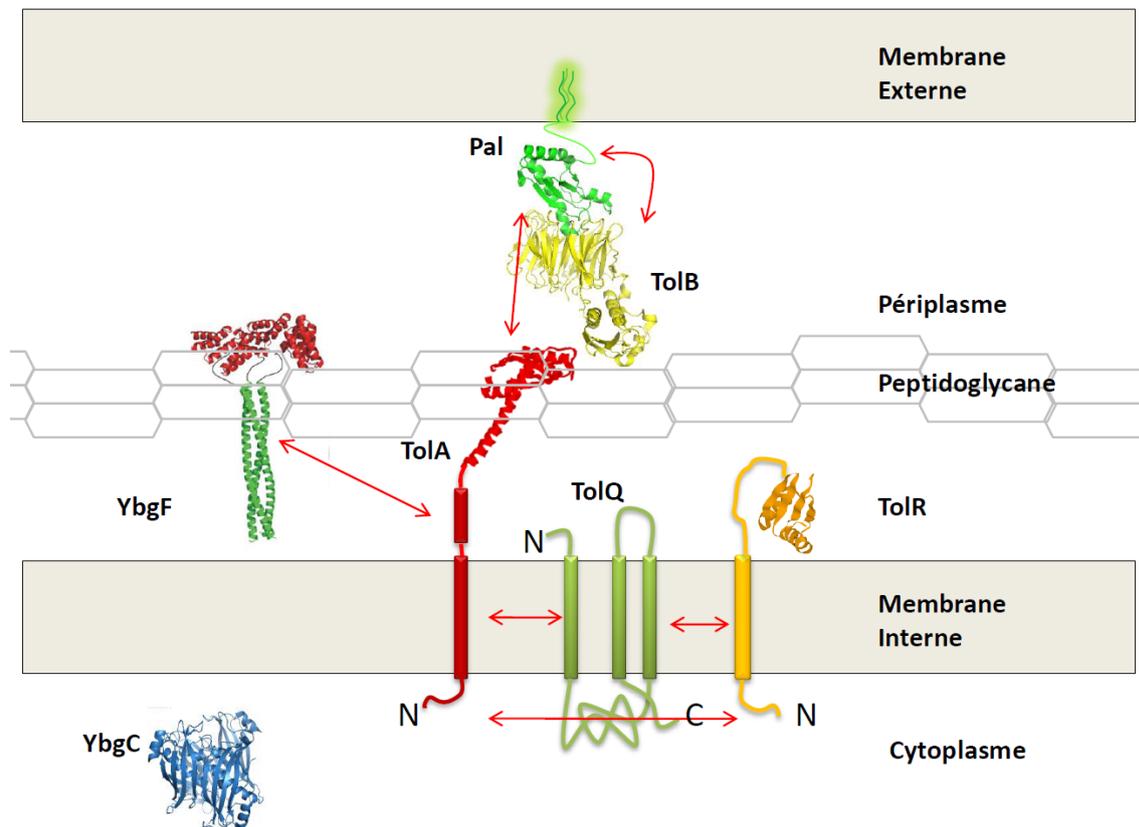
**Figure 2-2 : Organisation des gènes *tol-pal* chez les bactéries à Gram-négatif.**

Les limites des cluster sont indiquées par les pointillés D'après (Sturgis 2001)

Le groupe de gènes *tol-pal* est très conservé chez les bactéries à Gram-négatif. Les gènes codant pour les protéines du système sont retrouvés chez les bactéries du genre *Chlamydia*, *Chlorobium* ou les protéobactéries des différentes sous-divisions  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta\epsilon$  (Sturgis 2001). L'analyse des clusters a montré que, dans certains génomes, les gènes codant pour YbgC ou YbgF n'étaient pas présents. Les gènes *tol* sont absents du génome de certaines bactéries à Gram négatif (*spirochètes*, *Neisseria*, *Porphyromonas*...), ces bactéries sont des parasites intracellulaires. Il est intéressant de noter que ces bactéries produisent de nombreuses vésicules de membrane externe (Dorward and Garon 1989; Garon, et al. 1989; Zhou, et al. 1998c). L'opéron *tol-pal* n'est pas retrouvé chez les bactéries à Gram-positif et les archaeobactéries.

Chez *Salmonella typhimurium*, les gènes *tol-pal* ne sont pas régulés par RcsC (Prouty, et al. 2002). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, les gènes *tol-pal* sont induits en carence en fer, cette régulation est dépendante de la protéine Fur (Ferric uptake regulator). Une «boîte» Fur a

été mise en évidence en amont du promoteur *tolA* mais la fixation de la protéine Fur sur cette boîte n'a pas pu être mise en évidence (Lafontaine and Sokol 1998). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, l'expression des gènes *tol-pal* dépend également de la phase de croissance (Duan, et al. 2000).



**Figure 2-3 : Localisation et topologie des protéines codées par l'opéron *tol-pal* d'*Escherichia coli*.** Les interactions entre les protéines au sein du complexe sont indiquées par les doubles flèches. Référence PDB: **YbgF** (*E. coli*) le domaine en rouge : 2XEV le domaine en vert : 2XDJ ; **YbgC** (*Helicobacter pylori*) 2PZH ; **TolA** (*Pseudomonas aeruginosa*) 1LR0 ; **TolR** (*Haemophilus influenzae*) 2JWK ; **TolB-Pal** complexe (*E. coli*): 2W8B

## 2. PHENOTYPE TOL ET LES ROLES BIOLOGIQUES DU SYSTEME TOL-PAL

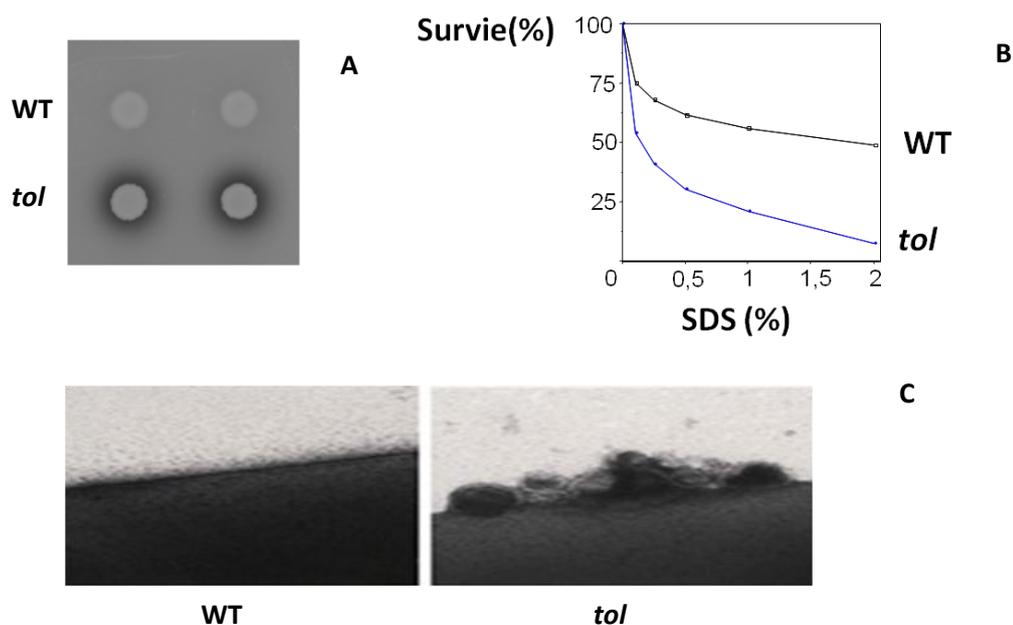
Le rôle physiologique du système Tol-Pal n'est pas connu, cependant l'ensemble des données établies suggère que ce système intervient dans des processus liés pour la plupart à

l'intégrité de la membrane externe. En effet, chez *E. coli* la délétion ou mutation de l'un de ces cinq gènes conduit à la perte d'intégrité de la membrane externe qui se traduit en 1/ une hypersensibilité aux composants toxiques (Bernstein, et al. 1972; Lazzaroni and Portulier 1981) 2/ une fuite de composants périplasmiques (Lazzaroni and Portulier 1981) 3/ une hyper-vésicularisation de la membrane externe (Bernadac, et al. 1998). (Figure 2-3)

Ces phénotypes sont retrouvés pour des mutants affectés dans la biogénèse de l'enveloppe. Une autre caractéristique des mutants *tol* est la formation de microvésicules de membrane externe (Bernadac, et al. 1998). Ce défaut est aussi présent chez les mutants affectés dans le gène codant pour la lipoprotéine Lpp (Somntag, et al. 1978; Suzuki, et al. 1978; Yem and Wu 1978). La lipoprotéine Lpp a un rôle majeur dans l'architecture membranaire, de plus elle interagit avec les protéines TolB et Pal (Cascales, et al. 2002; Clavel, et al. 1998).

D'autres phénotypes ont aussi été observés : induction de la synthèse de la capsule (Clavel, et al. 1996), défaut dans le transport de sucre tel que le glucose ou le maltose chez *Pseudomonas putida* (Llamas, et al. 2003) et anomalies dans la synthèse de curli chez *E.coli* (Vianney, et al. 2005). Les curli sont des fibres protéiques hautement adhésives impliquées dans la formation du biofilm chez *Escherichia coli* (Vidal, et al. 1998) et *Salmonella* (Collinson, et al. 1991). Cependant, ces phénotypes ne permettent pas l'attribution d'une fonction précise du système.

Les gènes de l'opéron *tol-pal* sont aussi impliqués dans la pathogénicité de certaines bactéries. Le gène *tolA* est surexprimé pendant la formation du biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa* (Heilpern and Waldor 2000; Whiteley, et al. 2001). Le gène *tolB* est indispensable pour la virulence de *Salmonella typhimurium* (Tamayo, et al. 2002) et *Vibrio cholerae* (Cameron, et al. 2008). L'expression de *tolB* est régulée par la concentration en Cl<sup>-</sup> chez la souche de *Burkholderia cenocepacia* isolée de patients atteints de mucoviscidose (Bhatt and Weingart 2008).



**Figure 2-4 : Les phénotypes *tol* chez *E. coli***

A. Détection de la fuite périplasmique d'un mutant *tol*. La libération de la RNase I périplasmique dans le milieu de culture se traduit par une hydrolyse des ARNs. Après précipitation des ARN résultant, le halo d'hydrolyse indique l'importance de la fuite. En haut souche sauvage (WT) ; en bas le mutant *tol*

B. Exemple d'hypersensibilité à des concentrations croissantes de détergent (le SDS) d'un mutant *tolA*.

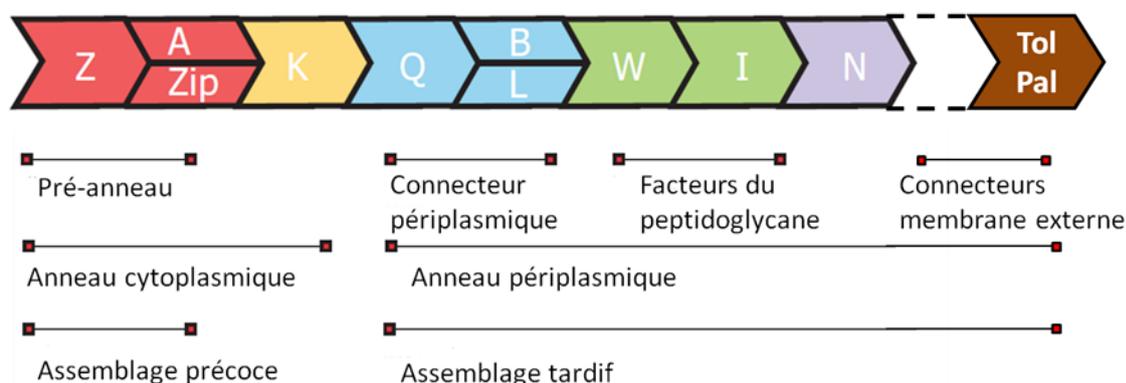
C. Phénotype d'Hypervésiculation de la membrane externe d'*E. coli*. A droite: un mutant *tol* ; à gauche : la souche sauvage

Les mutants *tol-pal* présentent des défauts de croissance chez de nombreuses bactéries comme chez *E. coli* O7 (Gaspar, et al. 2000), *P. aeruginosa* (Dennis et al., 1996), *Vibrio cholerae* (Heilpern and Waldor 2000) ; *Pseudomonas putida* (Llamas, et al. 2000; Rodriguez-Herva, et al. 1996) ; *Erwinia chrysanthemi* (Dubuisson, et al. 2005) et aussi chez *E. coli* K12 où il y a une filamentation des bactéries dans des conditions hyper-osmotiques ou hypo-osmotiques (Meury and Devilliers 1999). Le gène *tolA* est essentiel chez *E. coli* O7 (Gaspar, et al. 2000), chez *P. aeruginosa* (Dennis et al., 1996) et chez *C. crescentus* (Yeh, et al. 2010). En 2007, l'équipe de P. de Boer a montré l'implication du système Tol-Pal dans les étapes tardives de la division cellulaire. En utilisant des protéines fusionnées avec les protéines fluorescentes, les auteurs démontrent que les cinq protéines TolQ-R-A-B et Pal s'accumulent au niveau des sites de constriction chez *Escherichia coli* (Gerding, et al. 2007). La localisation de ces sites est dépendante de la protéine FtsN et coïncide avec les sites

d'invagination de l'enveloppe. Les auteurs observent que le processus de constriction est plus lent dans les mutants *tol-pal* que dans une cellule sauvage. Le recrutement des protéines Tol-Pal au niveau des sites de septation indique que ces protéines interviendraient dans une phase tardive de la division cellulaire. Les auteurs proposent un modèle dans lequel le système Tol-Pal aurait un rôle dans la constriction de la membrane externe. L'interaction entre TolA et Pal aurait alors pour fonction de ramener la membrane externe vers le peptidoglycane lors de la constriction.

La division cellulaire est organisée par un complexe multiprotéique appelé anneau septal qui contient 10 protéines essentielles (Pour revues: (Errington, et al. 2003; Goehring and Beckwith 2005; Margolin 2005; Vicente and Rico 2006). L'anneau septal est composé de protéines essentielles impliquées dans la division cellulaire ainsi que de protéines non-essentielles avec parfois des fonctions redondantes qui permettent d'accroître l'efficacité du processus de constriction.

La localisation de FtsZ au centre de la cellule initie le processus de division suite à la réplication du génome bactérien. Ainsi, cette protéine se positionne au site de division cellulaire situé entre les nucléoïdes répliqués au début de leur ségrégation. Par la suite, FtsZ polymérise en un anneau de division et recrute les protéines FtsA et ZipA qui stabilisent l'anneau et l'ancrent à la membrane plasmique. Ces dernières enclenchent alors un processus de recrutement protéique en cascade afin de rapatrier toutes les protéines requises à la division de la cellule mère. La protéine FtsN est la dernière protéine recrutée avant la constriction de l'anneau septal.



**Figure 2-5 : Recrutement protéique séquentiel pendant la division cellulaire**

Les noms des protéines Fts ont été abrégés par leur dernière lettre, Zip pour ZipA et --- indique que le recrutement du système Tol-Pal par FtsN se fait de manière indirecte. D'après (Bernard, et al. 2007; Gerding, et al. 2007; Vicente and Rico 2006)

Le défaut de localisation des protéines Tol au niveau de l'anneau septal dans un *mutant ftsN* indique que FtsN est nécessaire à la localisation du complexe Tol-Pal au niveau du divisome. Cependant, Bernard *et coll.* (2007) ont montré que le recrutement de TolA au niveau du septum par FtsN est indirect. En utilisant un *mutant ftsA* capable de compenser un mutant de délétion *ftsN*, TolA fusionnée à la GFP localise toujours au niveau du septum. Suggérant ainsi qu'il n'y aurait pas d'interaction directe entre FtsN et TolA mais que le recrutement de TolA serait plutôt dû à l'activité de la protéine FtsN (Bernard, et al. 2007).

En 2010, l'implication du système Tol dans la division cellulaire chez une  $\alpha$ -protéobactérie *Caulobacter crescentus* a aussi été démontrée. Chez *caulobacter*, les gènes *tol-pal* sont essentiels pour la localisation de marqueurs polaires grâce à l'interaction de TolA avec TipN (Yeh, et al. 2010). Il a aussi été suggéré que la protéine Pal, capable de se fixer au peptidoglycane, permettait de minimiser la distance séparant la membrane interne de la membrane externe, assistant le complexe BAM ( $\beta$ -barrel assembly machinery) dans le transport de protéines vers la membrane externe (Anwari, et al. 2010).

## Parasitisme

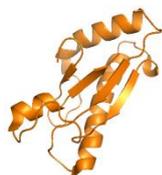
Les systèmes Tol et TonB (voir la partie II TonB) sont impliqués dans l'importation des macromolécules comme les colicines et l'ADN des phages. La dénomination de ce système

est liée à la tolérance (d'où le nom *tol*) de la bactérie aux colicines (toxines antibactériennes voir la partie *colicine*), excepté *pal*, la délétion de chacun des gènes *tol* conduit à la tolérance aux colicines et aux infections par des phages.

Les études prouvent que les phénotypes de sensibilité aux colicines et de maintenance de la stabilité membranaire peuvent être dissociés, en effet, certaines mutations dans le système Tol-Pal affectent seulement la stabilité membranaire sans affecter la sensibilité aux colicines (Goemaere, et al. 2007a). Ceci va être détaillé dans la partie III colicine.

### 3. COMPOSANTS DU SYSTEME TOL-PAL

#### 3.1. PAL



Pal est une lipoprotéine associée à la membrane externe de la bactérie par 3 chaînes acyl (N-palmitoyl cystéine et S-diacylglycérol cystéine) fixées de façon covalente sur la Cystéine N-terminale de la forme mature de Pal qui correspond à la forme dépourvue de la séquence signal (22 résidus). Elle possède 152 acides-aminés ayant une masse moléculaire de 16 kDa.

##### 3.1.1. INTERACTION DE PAL AVEC LE PEPTIDOGLYCANE

Pal interagit avec le peptidoglycane de manière non-covalente avec son domaine périplasmique « OmpA-like ». Le domaine « OmpA-like » est un domaine retrouvé fréquemment chez les protéines qui lient le peptidoglycane, notamment chez la protéine majeure OmpA, et les protéines MotB, PomB et MotY (voir le moteur du flagelle et les protéines MotA-MotB ou PomA-PomB). Un motif conservé OmpA-like a été identifié :  $LS(X)_2RA(X)_2V(X)_3L$  (X= un de 20 acides-aminés) (De Mot and Vanderleyden 1994). Il a été montré que malgré la différence de taille et de séquence, la région d'interaction avec le peptidoglycane (PBD peptidoglycan binding domain) du domaine OmpA-like de la protéine MotB peut être fonctionnellement échangée avec celui de Pal (Hizukuri, et al. 2009). La structure de la région périplasmique de la protéine Pal d'*Escherichia coli* a été déterminée par cristallographie (Abergel, et al. 2001). Elle présente une alternance de quatre brins  $\beta$  qui forment un feuillet  $\beta$  et de quatre hélices  $\alpha$  (Figure 2.6). La structure RMN de la protéine Pal d'*Haemophilus influenzae* associée avec un précurseur du peptidoglycane a été résolue, elle présente une organisation similaire à celle d'*E. coli* (Parsons, et al. 2006).

**OmpA:** OmpA est une protéine majeure de la membrane externe présente à  $10^5$  copies par cellule chez *E. coli*, elle s'organise en 2 domaines. Le domaine N-terminal de 170 résidus qui forme un tonneau  $\beta$  inséré dans la membrane externe. Le domaine C-terminal de 155 résidus est responsable de l'interaction avec le peptidoglycane (Grizot and Buchanan 2004). Le motif des protéines interagissant avec le peptidoglycane qui présente une forte similarité avec ce domaine d'OmpA. Il est nommé le domaine « OmpA-like ». Ironiquement, la structure de ce domaine « OmpA-like » d'OmpA n'a pas encore été résolue.

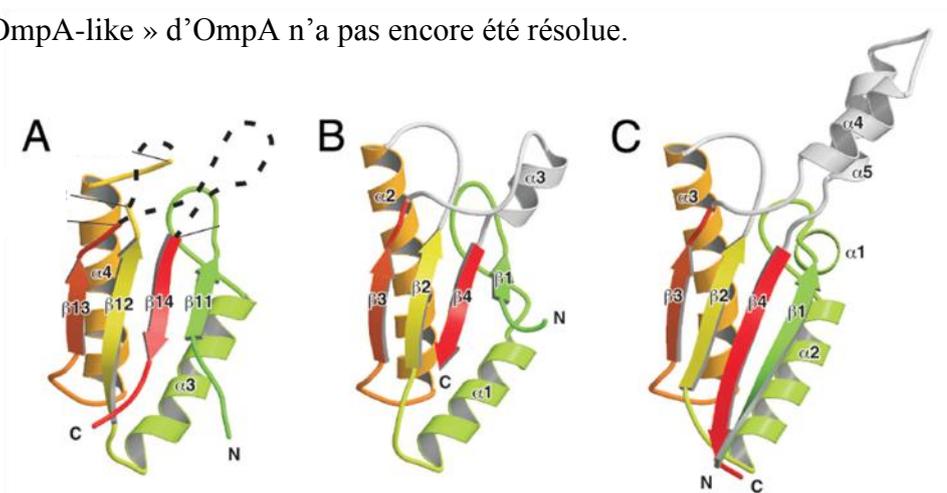


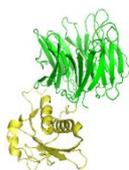
Figure 2-6 : OmpA-like domaine de MotY de *V. alginolyticus* (A) ; Pal d'*E. coli* (B); RmpM (*reduction modifiable protein M*) de *N. meningitidis* (C). Ces trois protéines interagissent avec le peptidoglycane (Kojima, et al. 2008b) . Les hélices et les brins correspondants sont numérotés. PDB code : MotY : 2ZF8 Pal : 1OAP RmpM : 1R1M.

### 3.1.2. INTERACTION DE PAL AVEC TOLA

Pal interagit avec la protéine TolA. Un motif CYGT, aussi appelé « TolA box », a été identifié dans le domaine C terminal de la protéine Pal. Il a aussi été retrouvé dans la séquence protéique de la protéine g3p des phages filamenteux et dans la séquence protéique de certaines colicines Tol-dépendantes (voir partie colicine) (Cascales and Lloubes 2004; Pommier, et al. 2005). Pal dimérise (Cascales, et al. 2002) et interagit avec de nombreux

partenaires de l'enveloppe : TolA (Cascales, et al. 2000), TolB (Bouveret, et al. 1995; Clavel, et al. 1998), OmpA (Cascales and Lloubes 2004; Palva 1979) et la lipoprotéine Lpp (Cascales, et al. 2002). Récemment, la protéine Pal a été identifiée dans la purification du complexe BAM ( $\beta$ -barrel assembly machinery) de *Caulobacter crescentus* (Anwari, et al. 2010).

### 3.2. TOLB



TolB est une protéine périplasmique (Isnard, et al. 1994) de 409 acides aminés après clivage de sa séquence signal de 21 résidus. C'est une protéine contenant le motif tryptophane-aspartate répété (WD repeat) (Fülöp and Jones 1999). Son adressage est dépendant du système SRP (Huber, et al. 2005). La structure cristallographique de TolB a été résolue en 1999. Elle montre clairement que TolB s'organise en 2 domaines : *D1*, *D2*.

*D1* est un domaine globulaire composé de 2 grandes hélices  $\alpha$  et d'un feuillet  $\beta$  formé par 5 brins antiparallèles. *D2* est un domaine organisé en feuillet  $\beta$  sous la forme d'un « 6-bladed  $\beta$ -propeller » (un propulseur à hélice à 6 pales) chaque pale est un feuillet  $\beta$  composé de 4 brins antiparallèles (Abergel, et al. 1999; Carr, et al. 2000).

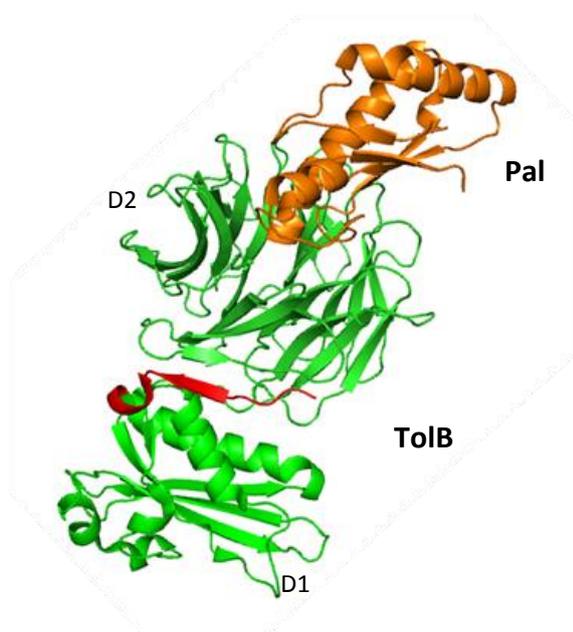


**Figure 2-7 : Structure 3D des domaines D1 et D2 de la protéine TolB d'*Escherichia coli***

PDB 1CRZ, Pymol®. Le domaine D1 et D2 sont indiqués

La protéine TolB se dimérise par son domaine D1, le domaine D1 interagit également avec le domaine III de la TolA, alors que le domaine D2 interagit avec la protéine Pal (Bonsor, et al. 2007; Clavel, et al. 1998; Ray, et al. 2000).

Le domaine  $\beta$ -propeller (D2) est présent chez des enzymes comme sialidase, l'ADN gyrase. Le site d'actif de ces enzymes se localise dans la cavité centrale formée par les pales. Ce domaine distinct est aussi retrouvé dans certains récepteurs comme le domaine YWTD (Tyr-Trp-Thr-Asp) de LDLR (low-density lipoprotein receptor) et les facteurs de croissance (preproepidermal growth factor) chez *homo sapiens*. Dans ces cas-là, le domaine  $\beta$ -propeller est formé par 6 domaines YWTD, afin de remplir la fonction de reconnaissance entre le domaine  $\beta$ -propeller du récepteur et la lipoprotéine (Jeon, et al. 2001; Springer 1998). En 2007, cette cavité centrale du domaine  $\beta$ -propeller de TolB a été impliquée dans l'interaction avec la protéine Pal (Bonsor, et al. 2007). TolB existe sous différentes conformations en réponse aux fixations de différents partenaires. Ainsi, la fixation de la lipoprotéine Pal entraîne le retrait de l'extrémité N-terminale de TolB vers l'intérieur du  $\beta$ -propeller et empêche l'interaction avec TolA, alors que l'interaction de la colicine E9 sur TolB facilite l'interaction de l'extrémité N-terminale de TolB avec TolA (voir la partie colicine) (Bonsor, et al. 2009).



**Figure 2-8 : Structure du complexe TolB**

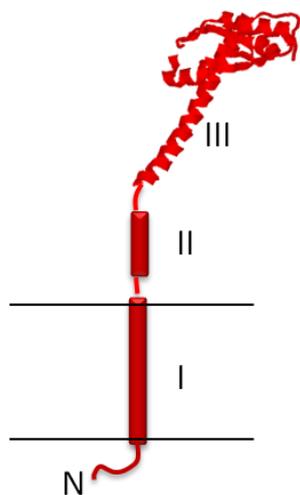
- Pal, PDB : 2W8B par Pymol®.

En orange : le domaine soluble de Pal ;

En vert : TolB.

La partie TolA-box de TolB (résidus E22-S33) est représentée en rouge.

## 3.3. TOLA



**Figure 2-9 :** Représentation schématique de l'organisation de TolA PDB : 1LR0

TolA est une protéine bitopique composée de 421 acides-aminés (Levengood and Webster 1989). Elle est composée d'une courte séquence cytoplasmique N-terminale, d'une hélice transmembranaire (domaine I) suivie par un long domaine périplasmique. Le domaine périplasmique est prédit pour être riche en hélice  $\alpha$  (domaine II) et le domaine C-terminal est globulaire (domaine III) (Derouiche, et al. 1999; Levengood, et al. 1991). La structure du domaine III a été déterminée en complexe avec le domaine N-terminal de la protéine G3p du phage filamenteux par cristallographie et aussi sous forme libre par RMN (Deprez, et al. 2005;

Lubkowski, et al. 1999).

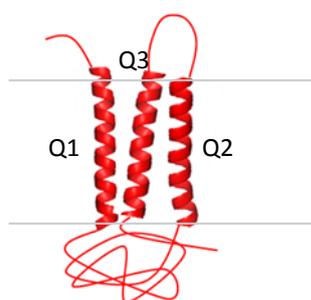
Le domaine TolAIII est constitué de trois hélices  $\alpha$  entourant un feuillet  $\beta$  composé de trois brins  $\beta$ , d'un brin  $\beta$  aperiodique et d'une petite hélice  $\alpha$ , alors que la structure du domaine libre obtenue par RMN présente trois hélices  $\alpha$  et deux brins  $\beta$ . Le troisième brin  $\beta$  est flexible et la petite hélice  $\alpha$  est absente. Ces deux structures ne sont pas totalement superposables. Ceci montre que le domaine TolAIII possède au moins deux conformations, une libre et une liée à celle en interaction avec le domaine N-terminal de g3p (Deprez, et al. 2005).

La protéine TolA interagit avec la lipoprotéine Pal de la membrane externe. Il est démontré que cette interaction dépend de la force proton-motrice (pmf) et des protéines TolQ et TolR (Cascales, et al. 2001). Le domaine TolAIII libre produit dans le périplasma interagit avec Pal indépendamment de la pmf (Cascales, et al. 2000). De plus, un mutant Pal délété du motif SYGK situé dans le domaine d'interaction avec TolA ne co-immunoprécipite plus avec TolA et présente une déstabilisation de la membrane externe (Cascales and Lloubes 2004). Cette interaction est donc indispensable pour maintenir l'intégrité de la membrane externe.

D'autre part, il a été montré que TolA changeait de conformation et que cela dépendait également de la force proton motrice et des protéines TolQ et TolR (Germon, et al. 2001). Ainsi il apparaît que l'état énergisé de TolA entraîne une modification de conformation qui permet l'interaction du domaine C-terminal de TolA avec Pal.

La protéine TolA interagit avec de nombreux partenaires aussi bien avec des protéines endogènes qu'avec des protéines exogènes. Chez *Escherichia coli*, TolA interagit avec TolQ et TolR dans la membrane interne via son domaine I (Derouiche, et al. 1995; Germon, et al. 1998) ; elle interagit avec les porines trimériques via son domaine II (Derouiche, et al. 1995) ; elle interagit avec Pal (Cascales, et al. 2000), TolB (Walburger, et al. 2002), TolR (Journet, et al. 1999) et avec les protéines de capsid de phage (g3p) et les colicines Tol dépendantes via son domaine III. Le domaine II de TolA interagit aussi avec la protéine périplasmique YbgF présent dans l'opéron *tol* (Walburger, et al. 2002), il semblerait que TolA régule la trimérisation d'YbgF (Krachler, et al. 2010a; Krachler, et al. 2010b), mais la fonction physiologique d'YbgF et le rôle de cette interaction TolA-YbgF ne sont pas définis.

### 3.4. TOLQ



**Figure 2-10 :**  
Modélisation de la structure de TolQ. Les trois segments transmembranaires sont indiqués par Q1, Q2 et Q3.

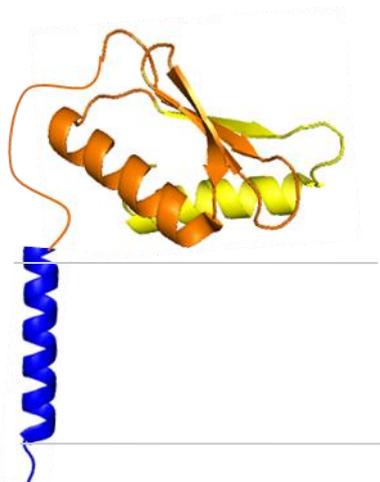
TolQ est une protéine membranaire polytopique. Elle possède 3 segments transmembranaires. L'extrémité N-terminale se trouve dans le périplasma, elle traverse 3 fois la membrane interne laissant ainsi l'extrémité C-terminale dans le cytoplasme. La boucle périplasmique est très courte et celle du cytoplasme est très large (environ 100 résidus). La structure de la protéine TolQ d'*E. coli* composée de 230 acides aminés n'est actuellement pas déterminée (Bourdineaud, et al. 1989; Kampfenkel and Braun 1993; Vianney, et al. 1994).

L'insertion de la protéine TolQ est dépendante de la force proton motrice de la membrane interne. Bien qu'elle ne possède pas de séquence signal, la première hélice s'insérerait dans la membrane cytoplasmique de façon autonome, tandis que les

deux autres hélices nécessiteraient l'énergie issue de la pmf pour s'insérer dans la membrane (Lewin and Webster 1996). Ces résultats suggèrent que ce processus pourrait être dépendant de l'insertase YidC et n'utiliserait pas le translocon Sec pour l'insertion dans la membrane cytoplasmique chez *E. coli* (Kuhn 2009).

L'organisation des hélices transmembranaires de TolQ a fait l'objet d'un des projets de ma thèse. Les données obtenues seront exposées dans le chapitre II résultat.

### 3.5. TOLR

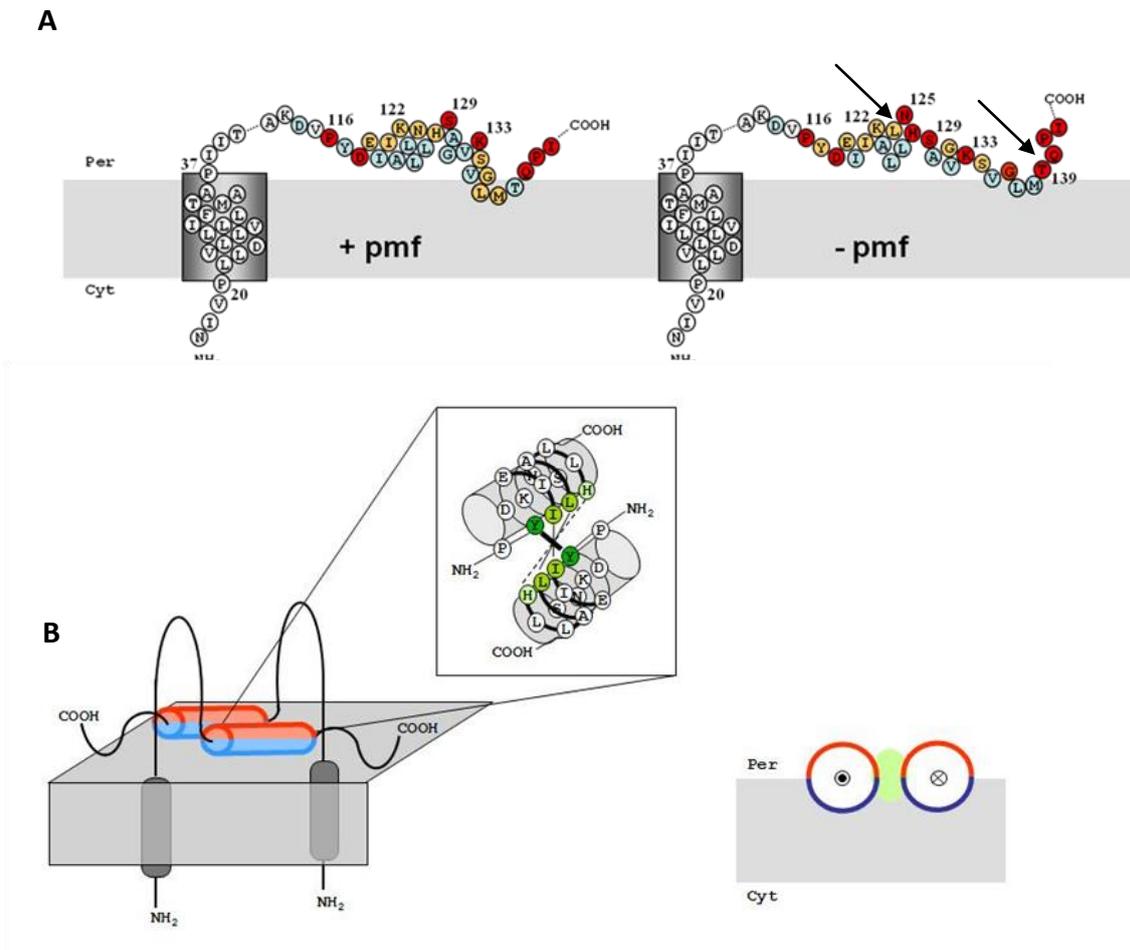


**Figure 2-11 : Représentation de la structure en ruban de TolR.** Le domaine C-terminal (PDB : 2JWK/2JWL) est divisé en 2 parties fonctionnelles, la partie orange correspond à la région II la partie jaune correspond à la région III définies par Journet *et coll.* (1999) Le domaine transmembranaire est modélisé en hélice bleue.

TolR est une protéine bitopique qui traverse la membrane interne une seule fois avec son extrémité N-terminale dans le cytoplasme (Kampfenkel and Braun 1993; Muller, et al. 1993). Chez *E. coli*, TolR possède 142 acides aminés, elle se divise en trois régions (Journet, et al. 1999) : la région N-terminale contient le segment transmembranaire ; le domaine périplasmique de TolR est scindé en deux parties : la région II est responsable de la dimérisation de TolR et la région III qui possède une affinité pour la membrane cytoplasmique. Cette association est supportée par le fait que cette région III est protégée contre l'activité de la carboxypeptidase et qu'un suppresseur de la mutation A177V, localisé dans le segment transmembranaire 3 de TolQ a été obtenu dans l'extrémité C-terminale de TolR (Journet, et al. 1999; Lazzaroni, et al. 1995).

3.5.1. LE DOMAINE PERIPLASMIQUE DE TolR

L'alignement de séquences de la région C-terminale de TolR issues de différentes espèces montre que ce domaine est faiblement conservé. Néanmoins, la nature des résidus (polarité, charge) est globalement conservée. Afin de déterminer le rôle de cette région, chaque résidu localisé entre la Pro116 et l'Ile142 a été muté en cystéine (Goemaere, et al. 2007b). La formation de ponts disulfures entre certaines cystéines introduites montre clairement que TolR-III forme un homodimère qui est organisé tête-bêche.



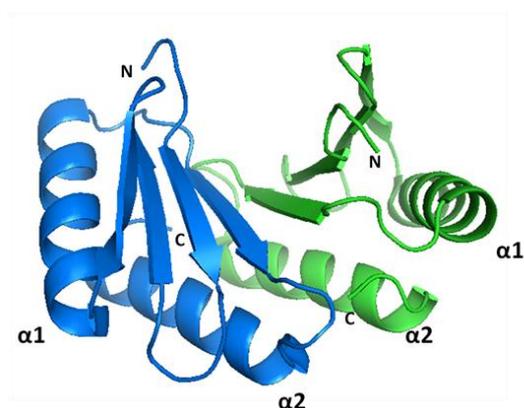
**Figure 2-12 : A. Représentation de la protéine TolR en présence ou non de la force proton motrice.** Les résidus cystéine fortement marqués par la sonde sont colorés en rouge, ceux qui sont moyennement marqués sont en orange, ceux qui ne sont pas marqués sont en bleu. Les deux changements majeurs d'accessibilité sont indiqués par les flèches.

**B. Organisation antiparallèle de l'hélice amphipathique de TolRIII au sein d'une membrane.** La face hydrophobe de l'hélice est représentée en bleu et celle hydrophile en rouge. Les résidus impliqués dans la dimérisation de TolRIII sont indiqués en vert. D'après (Goemaere, et al. 2007b)

Goemaere *et coll.* ont mis en évidence la présence d'une hélice amphiphile dont la face accessible est composée de résidus polaires et la face inaccessible de résidus apolaires. Les données obtenues permettent d'organiser cette hélice à l'interface avec la membrane ou une protéine membranaire.

D'autre part, des tests d'accessibilité des résidus substitués en cystéine par une sonde biotinylée révèlent que ce domaine subit un changement de conformation. Les variations d'accessibilité de ce domaine sont liées à la présence ou l'absence du potentiel de membrane mais également des résidus ionisables supposés impliqués dans le canal ionique (TolR-D23, TolQ-T145, TolQ-T178). La mutation du résidu P187 de ST-TolQ3 ne provoque pas de variation d'accessibilité et indique que ce résidu serait impliqué dans la transduction d'énergie mécanique. Le mouvement du domaine C-terminal de TolR pourrait être la cause ou bien la conséquence du passage d'ions dans le moteur moléculaire TolQ-R.

Chez *Haemophilus influenzae*, la structure du domaine périplasmique soluble de TolR a été résolue par RMN (Parsons, *et al.* 2008). TolR de *H. influenzae* partage 61% d'identité avec celle d'*E. coli*. Le domaine C-terminal est sous forme homodimérique en tête bêche avec les hélices amphipatiques  $\alpha 2$  de chaque monomère en interaction comme décrit par Goemaere *et coll.* (Goemaere, *et al.* 2007b).



**Figure 2-13 : Structure du domaine C-terminal (résidus 59-130) de TolR chez *Haemophilus influenzae* en homodimère (PDB 2JWK par Pymol®)**  
Les extrémités N et C terminales ainsi que les deux hélices sont indiquées. Les deux monomères sont représentés en vert et bleu respectivement

### 3.5.2. L'HÉLICE TRANSMEMBRANAIRE DE TOLR

Les alignements de séquences montrent une conservation stricte du résidu Asp 23 du segment transmembranaire (ST) de TolR (Cascales, et al. 2001). L'importance de ce résidu est confirmée par mutagenèse dirigée, en effet, la mutation D23A inactive une partie de la fonction du système Tol-Pal avec des bactéries qui sont affectées dans l'intégrité membranaire mais le système Tol-Pal semble correctement assemblé au sein de la membrane puisque la souche mutante D23A reste sensible aux colicines Tol-dépendantes. L'obtention du mutant suppresseur TolQ-A185D de la mutation TolR-D23A ainsi que d'autres mutations suppressives ont permis d'établir un schéma d'organisation des STs de TolR et de TolQ (Goemaere, et al. 2007a). L'organisation du ST de TolR dans le complexe Tol fait partie de mon travail de Thèse et sera détaillé dans la partie résultats.

L'étude de Cascales *et coll.* en 2001 montre l'importance du résidu aspartate 23 hautement conservé qui est situé dans le ST de TolR. Le résidu Asp23 de TolR est essentiel pour l'interaction de TolA avec Pal. En effet, la mutation de ce résidu aspartate en arginine abolit l'interaction entre TolA et Pal et provoque des défauts membranaires similaires à ceux des mutants *tol* alors que la mutation D23E confère un phénotype sauvage. La nature polaire de ce résidu semble donc importante pour la fonctionnalité du système.

## 4. LES INTERACTIONS TRANSMEMBRANAIRES

Par le pontage chimique, Derouiche *et coll.* (1995) ont pu mettre en évidence des interactions *in vivo* entre TolA et les deux autres protéines TolQ et TolR. La même expérience avec des protéines tronquées de TolA a permis de montrer que ces interactions ne nécessitaient que la présence de l'ancre transmembranaire de TolA.

En 1995, Lazzaroni *et coll.* ont caractérisé une mutation A177V dans TolQ3 qui inactive la protéine. Des mutants suppresseurs ont été localisés : un au sein de la molécule TolQ, L19P, la majorité au niveau du ST de TolR (P20L, A36V, P37L, S42N) avec un dernier suppresseur dans le domaine C-terminal de TolR. Ces informations indiquent l'existence d'interactions entre les STs de TolQ : ST-TolQ1 et ST-TolQ3 , ST-TolQ3 et ST-TolR et le ST-TolQ3 et TolR C-terminal (Lazzaroni, et al. 1995) (Figure2-14).

De la même manière, d'autres mutants suppresseurs ont été mis en évidence. En 2007, Goemaere *et coll.* ont identifié des interactions entre les segments transmembranaires de TolQ (ST-TolQ2 et ST-TolQ3), entre les segments transmembranaires de TolR et de TolQ, et entre les segments transmembranaires de TolR et de TolQ2, ainsi que l'interaction entre le domaine C-terminal de TolR et le segment transmembranaire de TolQ3 (Goemaere, *et al.* 2007a).

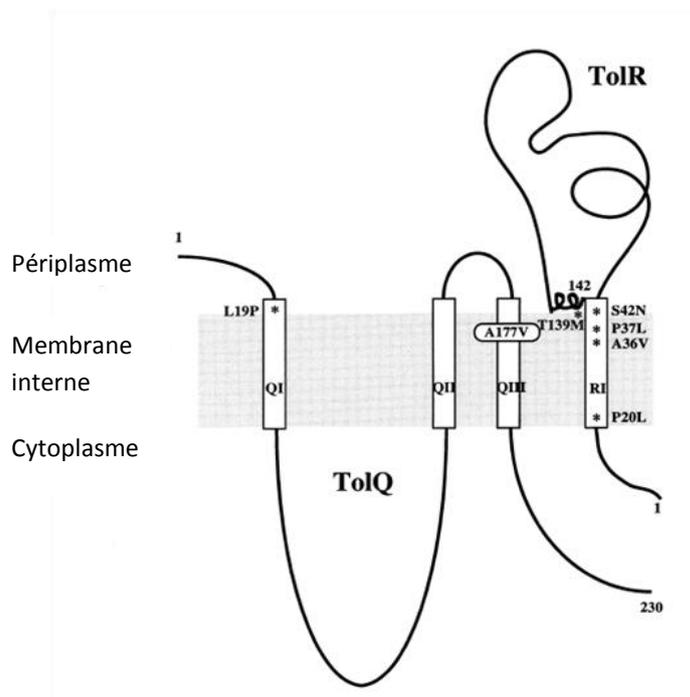


Figure 2-14 : Représentation schématique des mutants suppresseurs du mutant TolQ A117V dans les protéines TolQ et TolR. D'après (Lazzaroni, *et al.* 1995)

En 1998, l'interaction entre TolQ et TolR, ainsi que la dimérisation de TolR ont été caractérisées de manière biochimique par pontage chimique au formaldéhyde *in vivo* (Germon, *et al.* 1998). Dans ce même travail, les auteurs caractérisaient des suppresseurs extragéniques de mutants dans l'ancre transmembranaire de TolA et mettaient ainsi en évidence l'interaction du segment transmembranaire de TolA avec le premier segment transmembranaire de TolQ. Des mutations au niveau de l'His 22, la Ser 18 et de la Phe 26 affectent la fonction de TolA (Germon, *et al.* 1998). L'histidine et la sérine se trouvent dans le motif SHLS conservé à la fois dans TolA et TonB chez *Escherichia coli* (Koebnik 1993). D'autre part, l'ajout d'un protonophore (le CCCP) modifie le profil de dégradation de TolA par la protéinase K (Germon, *et al.* 2001). Les auteurs montrent également qu'une mutation d'un

des résidus Ser 18 ou His 22 du motif SHLS de TolA, empêche le changement conformationnel de TolA (Germon, et al. 1998).

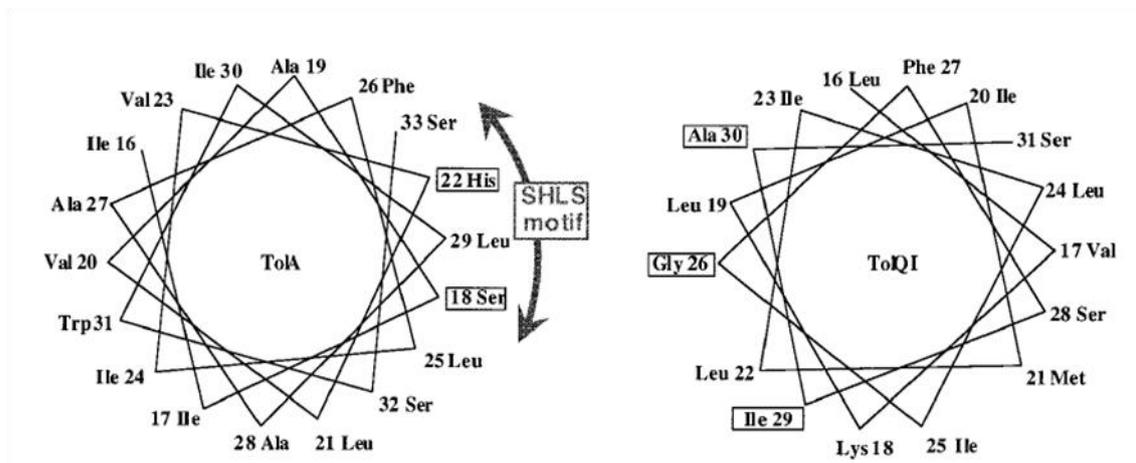
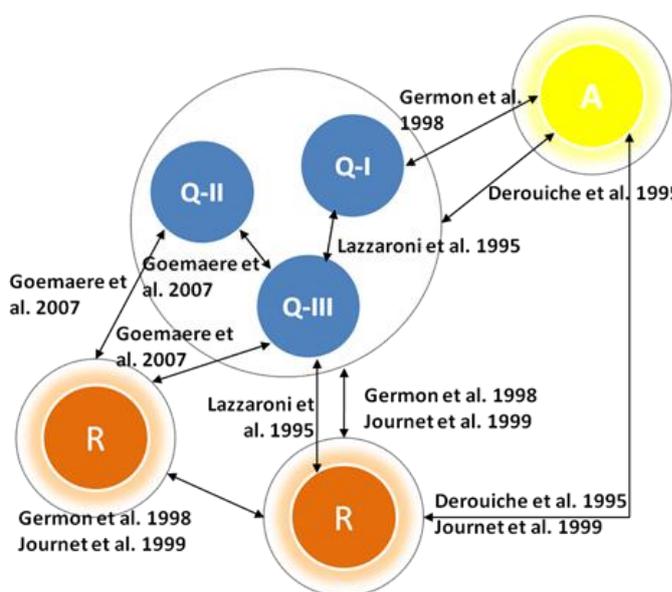


Figure 2-15 : Le motif SHLS de TolA visualisé sur une projection de l'hélice transmembranaire. D'après (Germon, et al. 1998). Les mutants suppresseurs sont encadrés.

L'étude plus particulière de TolR a permis de montrer que le domaine II de TolR était nécessaire pour la dimérisation de la protéine. Cette étude biochimique a également mis en évidence que les domaines I et III de TolR étaient requis pour l'interaction entre TolA et TolR (Journet, et al. 1999).

Toutes ces études montrent que les protéines TolQ, TolR, et TolA forment un complexe dans la membrane interne de par les interactions entre leurs segments transmembranaires et aussi par le domaine C-terminal de TolR.

La stœchiométrie des protéines du complexe a été estimée par des expériences de radiomarquage, il y aurait 2 à 3 TolQ pour une protéine TolR et le ratio du complexe TolQ : TolR : TolA a été estimé à 4-6 : 2 : 1 (Cascales, et al. 2002; Guihard, et al. 1994).



**Figure 2-16 : Organisation du complexe TolQ-TolR-TolA dans la membrane interne**

Les hélices transmembranaires des protéines TolQ (bleu) TolR (orange) TolA (jaune) sont représentées. Les cercles noirs représentent la protéine en entier et les flèches les interactions déterminées.

## 5. LES INTERACTIONS PERIPLASMIQUES

En 1995, Bouveret *et coll.* montrent pour la première fois l'existence d'un complexe de membrane externe au sein du système Tol-Pal. Une co-immunoprécipitation de la protéine TolB étiquetée, ainsi que le pontage au formaldéhyde ont prouvé une interaction avec la lipoprotéine Pal. Des expériences de co-fractionnement permettent d'affirmer que la protéine TolB est associée à la membrane externe uniquement en présence de Pal (Bouveret, *et al.* 1995). L'interaction entre TolB et Pal a également été étudiée par l'équipe de J.-C. Lazzaroni. Par mutagenèse aléatoire et pontage au formaldéhyde, les auteurs ont pu déterminer des zones d'interaction entre ces protéines. Les résidus de Pal impliqués dans l'interaction avec TolB ont été localisés au niveau du domaine d'interaction avec le peptidoglycane (Clavel, *et al.* 1998). Cette étude montre également que l'interaction de TolB avec OmpA et Lpp dépend de Pal. La lipoprotéine Pal pourrait permettre un rapprochement de TolB au niveau de la membrane externe et son interaction avec OmpA et Lpp. Bouveret *et coll.* (1999) ont démontré que l'interaction entre Pal et TolB impliquait la même région de Pal nécessaire pour l'interaction avec le peptidoglycane, et que les deux complexes ne pouvaient pas se former en même temps. Une approche génétique a permis de déterminer la région d'interaction de TolB avec Pal. Des mutations suppressives d'un mutant ponctuel de Pal (A88V) ont été isolées au niveau du  $\beta$ -propelleur de TolB (Ray, *et al.* 2000). Récemment, la structure cristalline du complexe TolB-Pal a été résolue et montre qu'une hélice  $\alpha$  de Pal interagit avec le canal central du

domaine «  $\beta$ -propeller » de TolB (Bonsor, et al. 2007). Cette interaction entraîne un changement conformationnel au niveau de l'extrémité N-terminale de TolB qui empêche l'interaction avec TolA (Bonsor, et al. 2009).

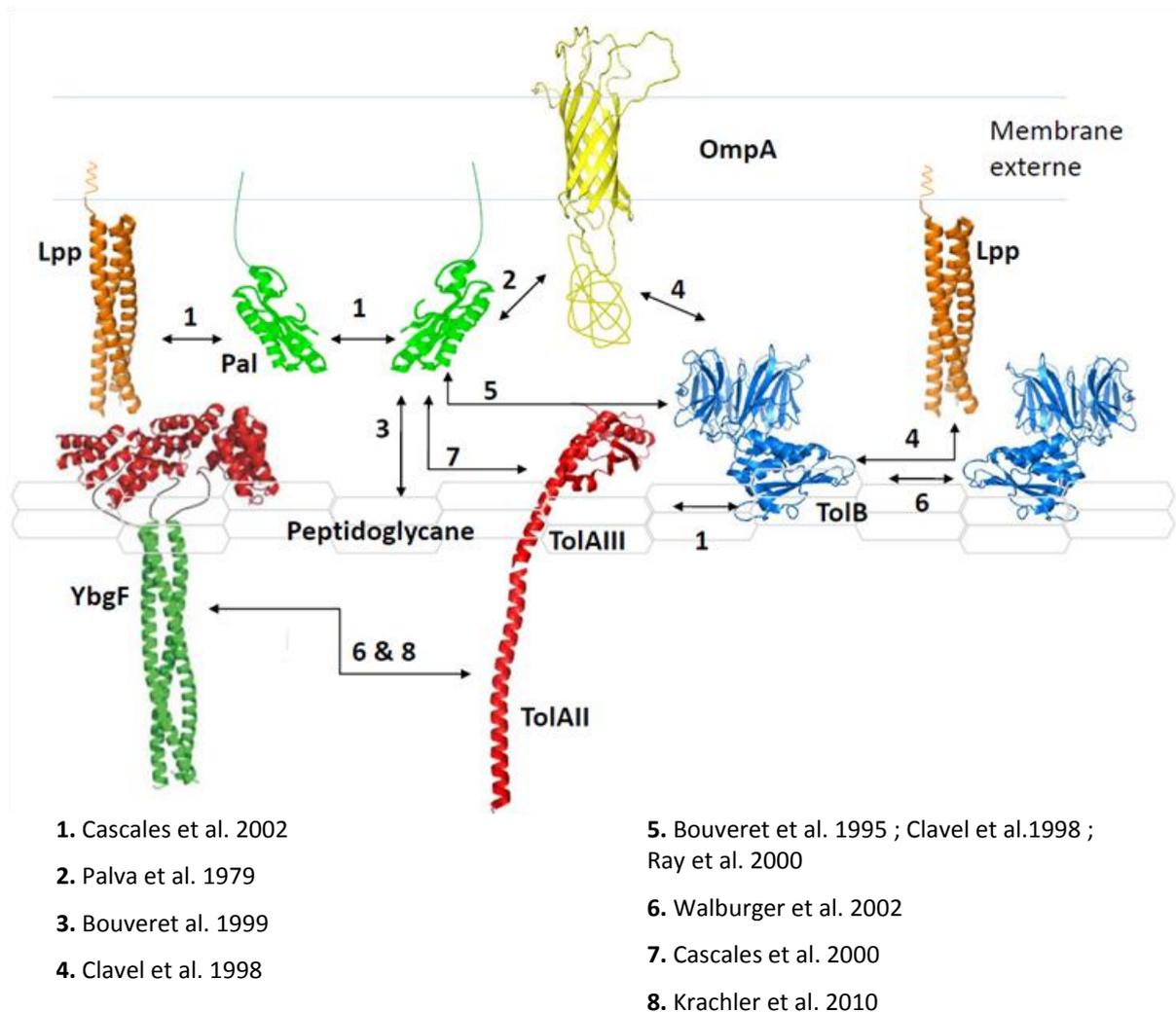


Figure 2-17 : Représentation schématique du complexe de membrane externe

## 6. HOMOLOGIE DE SYSTEME TOL-PAL AVEC D'AUTRES SYSTEMES DE L'ENVELOPPE

Pour obtenir des informations phylogénétiques du système Tol-Pal une analyse bioinformatique de ce système a été réalisée (Sturgis 2001). En 2000, Cascales *et coll.* ont démontré la conservation de séquence protéique entre le système TolQ-TolR et le système MotA-MotB (protéines stator du flagelle qui en sont le moteur) au niveau des résidus présents dans des segments transmembranaires (Cascales, *et al.* 2001). D'autre part, le système ExbB-ExbD est homologue au système TolQ-TolR de part les identités de séquences et de topologies (Eick-Helmerich and Braun 1989; Kampfenkel and Braun 1992; Kampfenkel and Braun 1993; Muller, *et al.* 1993; Vianney, *et al.* 1994). De façon générale les segments transmembranaires des protéines TolQ, ExbB et MotA (uniquement les 2 derniers segments transmembranaires) et des protéines TolR, ExbD et TonB présentent une forte conservation de résidus qui sont impliqués dans la fonction respective de ces systèmes (Cascales *et al.* 2001). De plus, il existe une complémentarité croisée entre les systèmes Tol et TonB. En effet le complexe ExbB-ExbD peut être substitué par le complexe TolQ-TolR et compléter l'importation de sidérophore et aussi restaurer l'importation des colicines (Herrmann and Braun 1993) (Voir chapitre colicine).

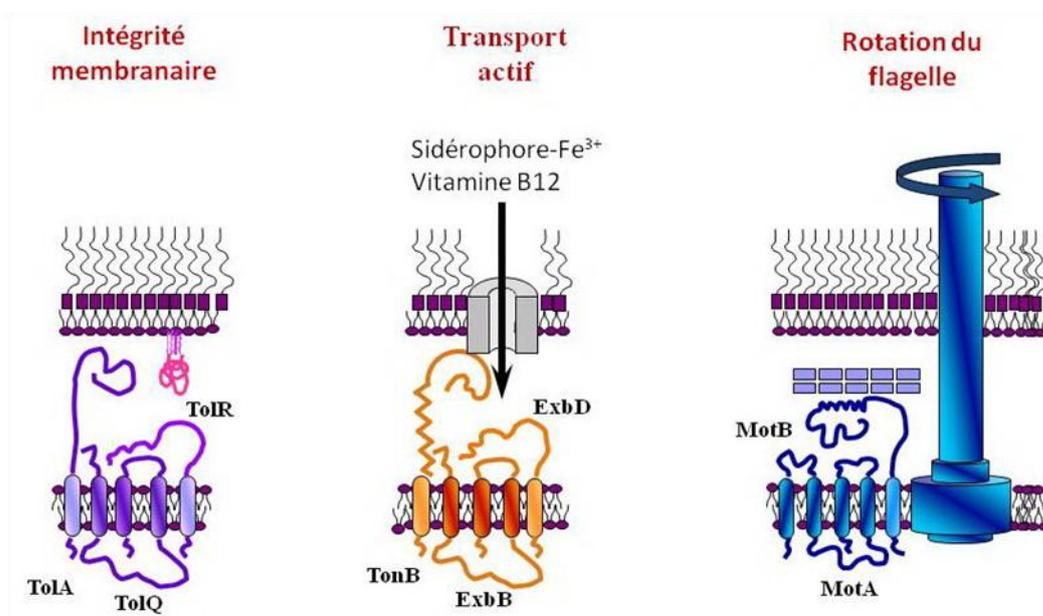
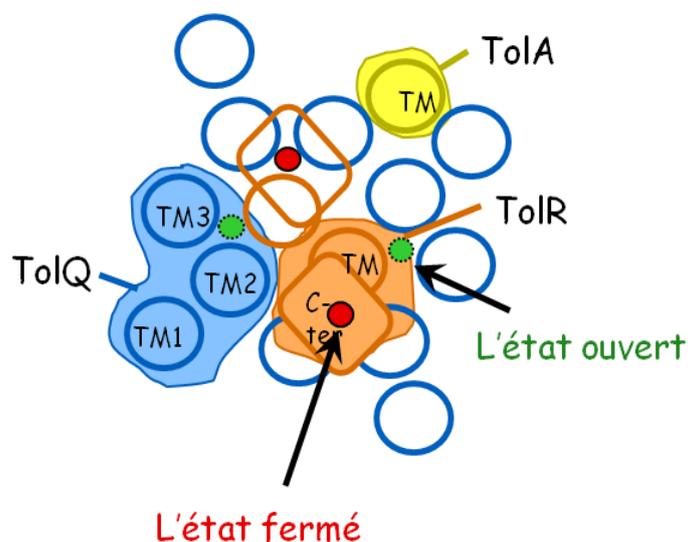


Figure 2-18 : Homologies entre les systèmes Tol-Pal, TonB et MotA-B. D'après (Cascales, *et al.* 2001). Les segments transmembranaires colorés en sombre sont ceux qui contiennent une forte proportion de résidus conservés.

7. MODELE DU COMPLEXE MINIMAL FORME PAR LES PROTEINES TOLQ-TOLR-TOLA

En 2001, en se basant sur l'ensemble des interactions connues et la similarité de séquence avec les systèmes MotAB et TonB-ExbBD, Cascales *et coll.* ont proposé un modèle d'organisation des protéines TolA-TolQ-TolR. C'est un modèle de moteur moléculaire où les protéines Tol utiliseraient la force proton motrice pour la convertir en énergie mécanique et assurer le changement conformationnel de TolA et son interaction avec Pal.

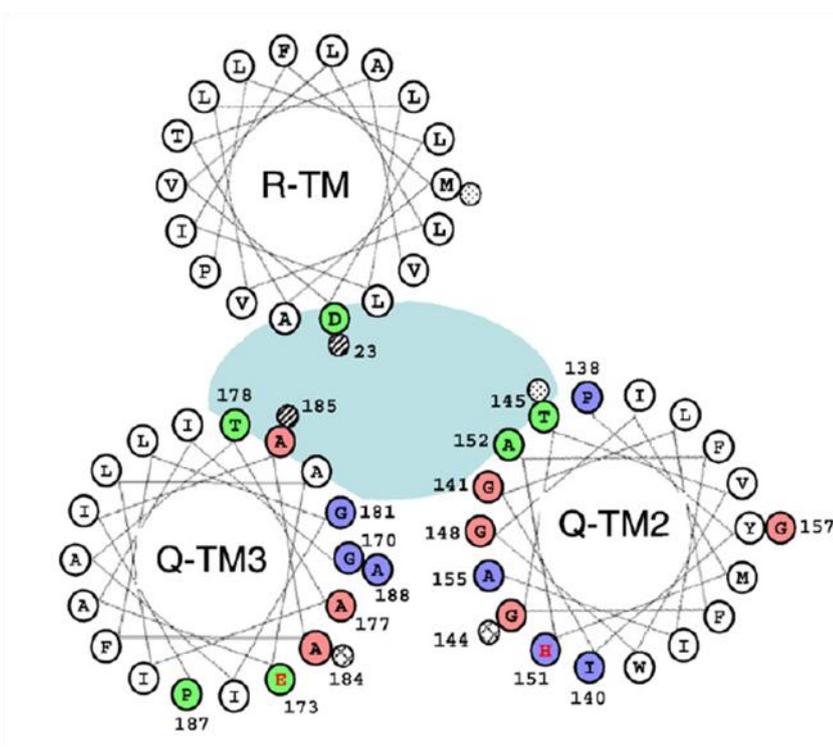
Dans ce modèle, les surfaces des STs de TolQ2 et 3 ainsi que le ST de TolR délimiteraient un canal ionique au travers duquel pourraient transiter les protons. Le domaine C-terminal de TolR agirait comme un «filtre» contrôlant l'entrée du pore. Le passage de proton provoquerait un réarrangement des hélices, changement de conformation qui serait transmis jusqu'à TolA. Cela induirait un changement conformationnel du domaine périplasmique de TolA qui pourrait interagir avec Pal. Le complexe de membrane interne se réorganiserait après la libération du proton dans le cytoplasme.



**Figure 2-19 : Modèle d'organisation des protéines de membrane interne**

**TolQ-R-A** Modèle minimum basé sur la stœchiométrie 1TolA-2TolR-4TolQ. Les hélices transmembranaires (TM) des protéines TolQ-R-A et la région C-terminale périplasmique de TolR sont représentées par des cercles et des rectangles, respectivement. Les hélices transmembranaires de TolQ sont représentées en bleu; celle de TolR en orange; et en jaune pour TolA. Le canal ionique par lequel peuvent transiter les protons est représenté en position ouverte (cercle vert) et en position fermée (cercle rouge). D'après (Cascales, *et al.* 2001).

Les travaux de Goemaere *et coll.* (2007) ont apporté des connaissances sur ce modèle en ciblant des couples mutants/suppresseurs au niveau des hélices transmembranaires. En substituant chaque petit résidu de TolQ issu de motif Gxx(x)G conservé (G représente les petits résidus comme G, A, V, et x représente un des 20 acides aminés), motif qui est caractéristique des interactions hélice-hélice des ST et présent dans les ST-TolQ2 et TolQ3 par des résidus plus encombrants (G en A, A en I ou L), les auteurs ont pu constater l'apparition d'un phénotype *tol*. Ceci suggère que les interactions entre les petits résidus des segments transmembranaires de TolQ2-3 sont essentielles. Il est intéressant de noter qu'un suppresseur d'une de ces mutations « petit résidu » a pu être obtenu et correspond à TolQ G144A-A184G (TolQ2 vs TolQ3). Les auteurs ont aussi pu identifier deux autres résidus hydrophiles TolQ2-T145 et TolQ3-T178 qui pourraient être impliqués, comme TolR-D23, dans le canal ionique.



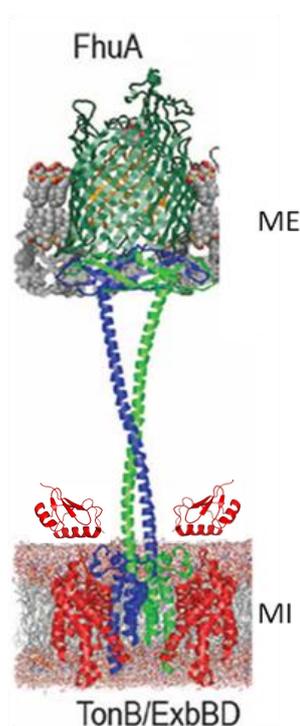
**Figure 2-20 : Représentation en projection des hélices des hélices transmembranaires. Les mutants suppresseurs sont indiqués (Vu périplasmique). D'après (Goemaere, et al. 2007a).** Les paires de mutation suppresseur sont indiqués en cercle coloré. Le canal ionique est représenté en bleu clair. Le couleur de cercle présente le classement de phénotype des mutants.

Deux couples de mutants supprimeurs ont été obtenus et engagent des résidus hydrophiles potentiellement ionisables qui pourraient jouer un rôle dans la formation d'un canal ionique, ils correspondent à TolR-D23A – TolQ-A185D et à TolQ-T145A – TolR-M33Q. La position de Met 33 de l'hélice transmembranaire forme un angle de  $\approx 80^\circ$  avec le résidu D23. Si les deux résidus doivent à un moment donné être présents dans le canal ionique délimité par les segments transmembranaires de TolQ et TolR, un changement conformationnel de TolR serait alors nécessaire. La recherche sur l'organisation et le changement de conformation du ST de TolR est présentée dans la partie « Résultat ».

## II. LE SYSTEME TONB

Le système TonB de l'enveloppe bactérienne d'*Escherichia coli* forme un système homologue au système Tol de membrane interne de part les topologies, les similarités de séquences et la complémentation croisée entre les 2 systèmes. Le nom Ton a été donné par référence au phénotype qui correspond à la résistance aux infections aux phages T<sub>1</sub> (T-one). L'implication de ce système pour l'importation des colicines et l'ADN du phage Φ80 a aussi été démontrée.

### 1. GÉNÉRALITÉ



**Figure 2-21 : Représentation Schématique du complexe FhuA-TonB-ExbB-ExbD.** D'après (Kaserer, et al. 2008). La structure de FhuA est colorée en vert foncé (PDB : 1BY3 et 1BY5), deux monomères de TonB sont indiqués en vert clair et bleu (C-terminal de TonB : PDB : 1IHR and 1QXX), les deux domaines C-terminaux périplasmiques d'ExbD sont indiqués en rouge (PDB : 2PFU), les STs de TonB et ExbB-ExbD (en rouge) sont modélisées en hélices  $\alpha$ . ME : membrane externe ; MI : membrane interne

Le système TonB des bactéries à Gram-négatif forme un complexe protéique de la membrane interne. Il se compose de 3 protéines : TonB, ExbB, ExbD. Ce système est impliqué dans divers processus de transport haute affinité de molécules comme la vitamine B12 et les sidérophores chargés en  $\text{Fe}^{3+}$ . Récemment son implication dans le transport actif des divers ions comme le nickel chez *Helicobacter pilori* (Schauer, et al. 2007), le zinc chez *Neisseria meningitidis* (Stork, et al. 2010), le cuivre chez *cyanobacterium Anabaena* sp (Nicolaisen, et al. 2010) a été mise en évidence.

Chez certains organismes, le système TonB est impliqué dans des processus habituellement non TonB-dépendant. En 2008, un transporteur de maltose TonB-dépendant a été mis en évidence par Lohmiller *et coll.* chez *Caulobacter crescentus*. Les auteurs ont pu démontré que contrairement à *Escherichia coli*, le transport de maltose est TonB-dépendant chez *Caulobacter crescentus* (Lohmiller, *et al.* 2008). Son rôle dans la photorégulation de la morphologie cellulaire en condition d'adaptation aux rayonnement lumineux (rouge ou vert) a été aussi identifié chez une cyanobactérie *Fremyella diplosiphon* (Pattanaik and Montgomery 2010).

Le gène *tonB* d'*E. coli* est présent sur le chromosome à la minute 28 (Postle 1990). Les gènes *exbB-exbD* sont organisés en opéron à la minute 65 du chromosome d'*E. coli* (Eick-Helmerich and Braun 1989). Cependant, chez certaines espèces, l'organisation génétique peut être différente. En effet, chez *Pseudomonas putida* ou *Neisseria gonorrhoeae*, les trois gènes sont regroupés en opéron *exbB-exbD-tonB* (comme pour les genes *tolQ-tolR-tolA*). Les gènes codant pour les protéines TonB, ExbB et ExbD peuvent être présents en plusieurs exemplaires chez certaines espèces (Sturgis 2001), parfois avec des fonctions redondantes, parfois avec des caractéristiques particulières (Wang, *et al.* 2008). Le séquençage de nombreux génomes bactériens a permis de montrer que les gènes codant pour les homologues des protéines ExbB, ExbD, et TonB sont très conservés chez la majorité des bactéries à Gram négatif (Sturgis 2001).

Chez *Escherichia coli*, l'expression des trois gènes *exbB*, *exbD*, et *tonB* est régulée par le taux de fer dans le milieu environnant: elle est induite lorsque le milieu s'appauvrit en fer. Cette régulation dépend de la protéine régulatrice Fur (Eick-Helmerich and Braun 1989; Postle 1990). Fur agit comme un répresseur de la transcription en présence de fer.

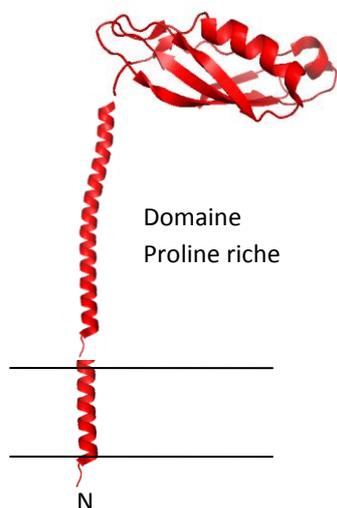
## 2. COMPOSANTS DU SYSTEME

Les trois protéines du système TonB : ExbB, ExbD, et TonB, sont localisées au niveau de la membrane interne.

## 2.1. TONB EST LA PROTEINE CLEF QUI RELIE LA MEMBRANE INTERNE ET LA MEMBRANE EXTERNE.

TonB est une protéine de 239 acides aminés et d'une masse moléculaire de 26 kDa. La composition en acides aminés de la protéine TonB est particulière, elle est très riche en résidus proline (17%) (Postle and Good 1983). La protéine TonB possède un segment transmembranaire N-terminal, correspondant à une séquence signal hydrophobe non clivée lors de la translocation Sec-dépendante (Hannavy, et al. 1990; Postle and Skare 1988). La majorité de la protéine TonB occupe l'espace périplasmique.

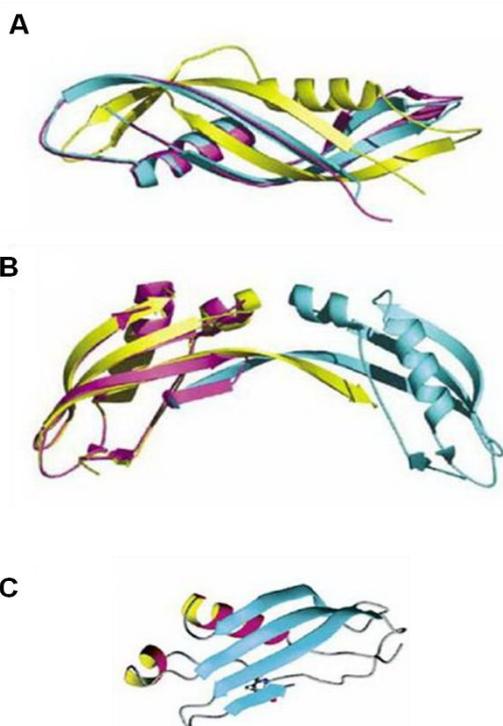
La région périplasmique de TonB peut être divisée en deux domaines distincts. La partie centrale (résidus 70-102) est riche en proline (42%) et présente une répétition des motifs Glu-Pro et Lys-Pro. Des études par RMN effectuées sur un peptide synthétique suggèrent que ce domaine adopte une conformation  $\beta$  étendue de plus de 100Å (Brewer, et al. 1990; Evans, et al. 1986) qui permettrait à TonB de s'étendre de la membrane interne à la membrane externe. Cependant, cette région peut être totalement déléetée sans affecter la fonction de TonB (Larsen, et al. 1993; Seliger, et al. 2001).



**Figure 2-22: Représentation de Structure de TonB.** Les domaines C-terminal PDB : 1XX3, central, proline riche (environ 130 résidus,) et transmembranaire (modélisé en hélice alpha) de TonB sont représentés.

La partie carboxy-terminale (résidus 103-239) est essentielle pour l'interaction avec les transporteurs de membrane externe. Les structures des 75 et 76 résidus C-terminaux ont été résolues par cristallographie sous la forme d'un dimère hautement ordonné (Chang, et al. 2001; Koedding, et al. 2004). Chaque monomère est constitué de trois brins  $\beta$  antiparallèles et d'une hélice  $\alpha$ , l'association entre les deux sous-unités imbriquées formant une structure en forme de cylindre. Cependant, un fragment plus long (92 résidus) se présente sous forme

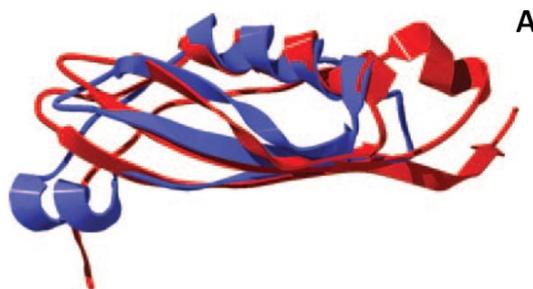
monomérique en solution (Kodding, et al. 2005) et la cristallisation de ce domaine révèle une structure beaucoup moins rigide. Le troisième brin  $\beta$  et une petite hélice  $\alpha$  additionnelle de chaque monomère sont néanmoins en interaction. Une troisième structure a été résolue par RMN, en utilisant un fragment de 137 résidus (Sean Peacock, et al. 2005). Les 49 résidus N-terminaux de ce fragment ont été trouvés sous forme désordonnée, la partie C-terminale est sous forme monomérique.



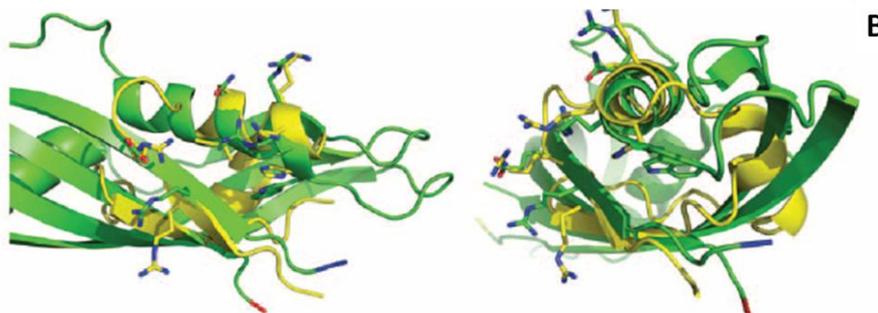
**Figure 2-23. A, B, C : Structures tridimensionnelles du domaine C-terminal de TonB D'après (Postle and Larsen 2007).** La figure **A** représente la structure des 75 résidus C-terminaux de deux monomères (jaune et bleu) étroitement en interaction (Chang, et al. 2001). La structure du peptide de 76 résidus résolue ultérieurement (Koedding, et al. 2004) est superposée en magenta. La figure **B** correspond à la structure résolue en dimère du peptide de 92 résidus (Kodding, et al. 2005). Les monomères sont présentés en jaune et bleu. La structure sous forme monomérique de 87 résidus résolue en RMN est superposée en magenta (Sean Peacock, et al. 2005). La figure **C** représente la structure par RMN des 87 résidus ordonnés du peptide de 137 résidus C-terminal de TonB (Sean Peacock, et al. 2005).

La structure tridimensionnelle du domaine C-terminal de TonB est superposable en grande partie avec celle de TolA d'*Escherichia coli* et de *Pseudomonas aeruginosa* (Kodding, et al. 2005). En 2008, la similarité de séquence et de structure entre le domaine périplasmique de TonB et YcfS : une protéine riche en proline d'enveloppe d'*E. coli* contenant un motif LysM qui interagit avec la peptidoglycane a été démontrée par le groupe de Dr. Klebba. Deux sites conservés ont été identifiés comme les sites de contact avec le peptidoglycane. L'interaction entre le peptidoglycane et TonB a été confirmée par une expérience de co-précipitation *in vitro* (Kaserer, et al. 2008). D'autre part, des études génétiques ont démontré que ce même domaine C-Terminal de TonB interagit avec ExbD au sein du périplasme (Ollis, et al. 2009).

**Figure 2-24. A: Superposition des structures tridimensionnelles des domaines C-terminaux de TonB (rouge) et de TolA (bleue)** La partie N-terminale de l'hélice  $\alpha$  de TolA, non présente dans TonB, n'est pas représentée. D'après (Kodding, et al. 2005).



**B: Superposition des structures tridimensionnelles du domaine C-terminal de TonB (verte) et du LysM d'Escherichia coli (jaune).** D'après (Kaserer, et al. 2008)



L'ancre transmembranaire de TonB est essentielle à sa fonction. Les premières preuves ont été mises en évidence en réalisant une protéine hybride constituée du domaine transmembranaire de la protéine TetA et de la partie périplasmique de TonB (Jaskula, et al. 1994). Cette protéine chimère est localisée dans la membrane mais n'est plus active, de plus, le complexe ExbB-TonB n'est plus mis en évidence par pontage covalent au formaldéhyde. Ces résultats confirment les données de Karlsson *et coll.* (1993b) sur le rôle de l'ancre de TonB pour permettre des interactions fonctionnelles avec les protéines ExbBD (Karlsson, et al. 1993b).

En 1993, la présence d'un motif SHLS conservé est mise en évidence sur les ancres transmembranaires des protéines TonB et TolA d'*Escherichia coli* (Koebnik 1993). Ces résidus sont localisés sur une même face de l'hélice. Les auteurs suggèrent que ce motif pourrait être impliqué dans l'interaction avec les protéines ExbB (ou TolQ) et ExbD (ou TolR).

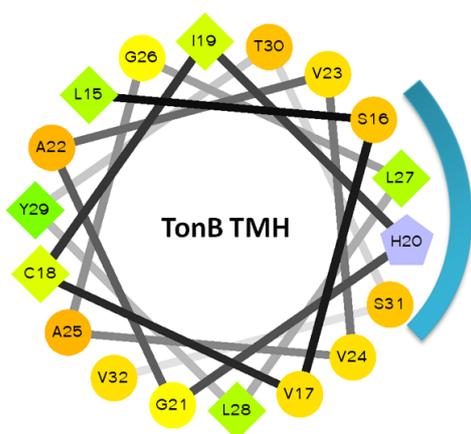


Figure2-25 : Le motif SHLS de TonB visualisé sur une projection d'hélice transmembranaire. D'après (Koebnik 1993)

Traub *et coll.* (1993) ont montré qu'un fragment correspondant aux 44 premiers acides aminés de TonB pouvait être stabilisé par ExbB, suggérant qu'un site important pour l'interaction entre TonB et ExbB était localisé dans la région N-terminale de TonB. Les auteurs ont montré également l'importance du résidu histidine du motif SHLS puisqu'un mutant TonB H20R n'est plus fonctionnel (Traub, *et al.* 1993).

Des délétions ponctuelles dans le motif SHLS de TonB rendent la protéine inactive et diminuent fortement l'efficacité du pontage au formaldéhyde de TonB avec ExbB (Larsen and Postle 2001). Il semble que la présence et la position des résidus Ser 16 et His 20 aient un rôle particulier dans la fonctionnalité du complexe. Ceci est en accord avec une étude antérieure du motif SHLS, où les mutations ponctuelles S16L et H20Y rendent la protéine TonB inactive (Larsen, *et al.* 1999). Ces mutations substitutives ainsi que la délétion Val 17 sont supprimées par les mutations extragéniques trouvées dans le premier segment transmembranaire d'ExbB (V35E V35D, ou A39E) (Larsen, *et al.* 1999; Larsen, *et al.* 1994). En 2007, la substitution des résidus du segment transmembranaire de TonB en alanine (résidus 12 à 32) a permis d'affiner le rôle des résidus Ser16 et His20 du segment transmembranaire de TonB (Larsen, *et al.* 2007). De manière surprenante, un mutant TonB portant une ancre transmembranaire composée de résidus alanine et conservant uniquement les résidus Ser16 et His20 est toujours fonctionnel. De plus, seule la mutation en alanine de l'histidine en position 20 abolit la fonction de TonB. La mutation ponctuelle de la sérine 16 en alanine n'a pas d'effet sur la fonction de TonB, suggérant qu'un ou plusieurs résidus de l'hélice ont une fonction redondante à celle de la sérine 16. Cependant, la protéine TonB mutante contenant un segment transmembranaire poly-alanine avec les résidus Ser16 et His20 interagit de manière

non spécifique avec de nombreuses protéines, suggérant que les autres résidus de l'hélice de TonB confèrent à la protéine sa spécificité d'interaction.

Comme son homologue TolA, la protéine TonB subit aussi un changement conformationnel pendant son fonctionnement. Par les expériences de protéolyses ménagées, en 1994 Larsen *et coll.* ont montré que TonB existait sous plusieurs conformations et que le changement conformationnel de TonB était dépendant des protéines de membrane interne ExbB et ExbD. (Higgs, *et al.* 1998; Larsen, *et al.* 1994). Plus tard, l'ancre membranaire de TonB en particulier certains résidus du motif SHLS et la PMF ont été identifiés comme indispensables pour le changement conformationnel de TonB (Larsen and Postle 2001; Larsen, *et al.* 1999). L'étude de Ghosh et Postle (2005) montre que la dimérisation de TonB par son domaine C-terminal dépend également de tous ces facteurs réunis. Ces changements conformationnels seraient dus à la transduction d'énergie, à partir des protéines ExbB-ExbD jusqu'à la partie C-terminale de TonB. La dimérisation de TonB serait une étape conformationnelle transitoire.

Le système TonB transmettrait l'énergie issue de l'utilisation de la force proton motrice vers les récepteurs de membrane externe ce qui permettrait l'ouverture du pore du récepteur et l'entrée du ligand. Cependant, nous avons vu que la partie C-terminale de TonB est capable d'interagir avec le récepteur dans un état non-énergisé. Le mécanisme d'ouverture du canal récepteur n'est pas clairement défini, deux hypothèses sont émises, soit que le domaine «bouchon» globulaire subirait un réarrangement conformationnel conduisant à la création d'un petit canal (Ferguson, *et al.* 1998) soit qu'il serait extrudé partiellement ou complètement du tonneau  $\beta$  (Faraldo-Gomez, *et al.* 2003). Les mouvements dynamiques, l'état énergétique, et les nombreux interactants de la protéine TonB rendent l'étude de cette protéine difficile et pourraient expliquer les résultats différents voire même parfois contradictoires observés dans les nombreuses études de ce système.

## 2.2. EXBD EST UN COMPOSANT INDISPENSABLE POUR LA FORMATION DU COMPLEXE TONB

Chez *E. coli*, ExbD est une protéine de 141 acides aminés, d'une masse moléculaire de 15,5 kDa. Elle possède un segment transmembranaire N-terminal permettant l'ancrage dans la

membrane interne et la partie C-terminale est localisée dans le périplasma (Eick-Helmerich and Braun 1989; Kampfenkel and Braun 1992).

Tout comme les protéines TolQ et TolR, les segments transmembranaires d'ExbB ainsi que la partie transmembranaire de la protéine ExbD sont très conservés dans les différents génomes bactériens. Les alignements de séquences de différentes bactéries à Gram négatif ont permis d'établir une séquence consensus du ST d'ExbD qui est : **nxxpxxDvxlvlxxfxxt** (Cascales, et al. 2001).

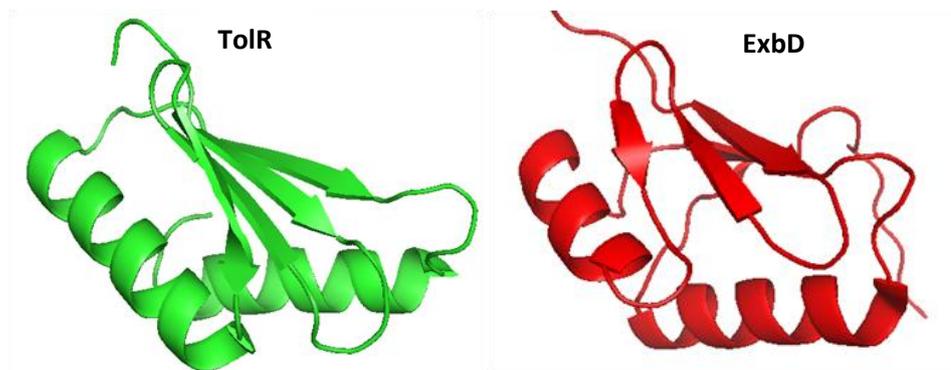
L'aspartate 25 dans l'hélice transmembranaire d'ExbD est strictement conservé. La mutation D25N abolit la fonction du système TonB. Cependant la mutation L132E qui se trouve dans le domaine périplasmique d'ExbD abolit également l'activité du système TonB, indiquant que le domaine C-terminal d'ExbD joue aussi un rôle important dans le fonctionnement du système TonB (Braun, et al. 1996).

La structure du domaine périplasmique C-terminal d'ExbD d'*E. coli*, a été résolue par RMN à pH acide ( $\approx 3$ ) (Garcia-Herrero, et al. 2007). Ce domaine se présente sous forme monomérique. Il est formé de 2 hélices  $\alpha$  et d'un feuillet  $\beta$  composé de 5 brins  $\beta$ . Les 19 structures obtenues par RMN montrent une grande flexibilité des parties N- et C-terminales de la protéine. Les séquences des domaines périplasmiques des protéines ExbD et TolR d'*E. coli* ont été alignées. L'identité entre les deux séquences pour les résidus 60 à 142 est de 21 % et la similarité de 45%. Ces valeurs sont légèrement inférieures à celles des protéines complètes (25% d'identité et 70% de similarité) ; en effet, le segment transmembranaire est la partie la plus conservée (Cascales, et al. 2001). La structure 3D du domaine C-terminal de TolR d'*Haemophilus influenzae* et d'ExbD d'*E. coli* sont très ressemblantes (Figure 2-26). La structure RMN du domaine C-terminal de TolR est obtenue sous forme dimérique à pH 6, tandis que la structure d'ExbD est monomérique à pH 3. La différence de pH utilisé pour obtenir la structure des deux protéines pourrait être la cause des différentes formes oligomériques observées. La dimérisation d'ExbD mise en évidence par pontage chimique au formaldéhyde est indépendante de la présence d'ExbB, de TonB ainsi que de la PMF (Ollis, et al. 2009).

L'interaction entre le domaine périplasmique de TonB et le domaine périplasmique d'ExbD a été démontrée par pontage au formaldéhyde et par substitution des résidus en cystéine. Ainsi, les résidus A92C d'ExbD et A150C de TonB forment un pont disulfure.

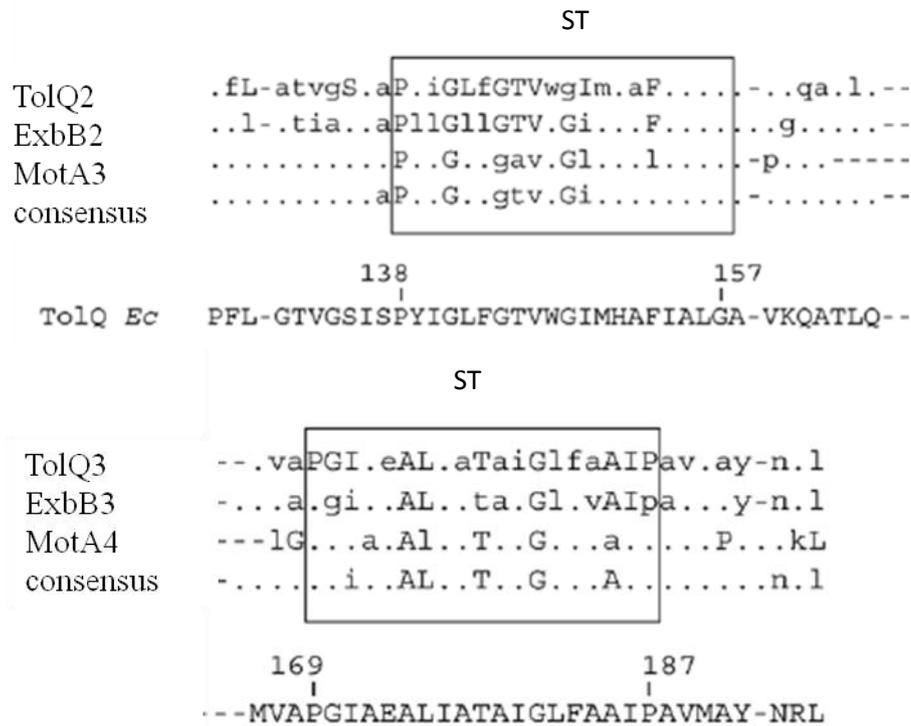
L'interaction du domaine C-Terminal de TonB avec le domaine C-terminal d'ExbD est dépendante de chaque protéine du système TonB ainsi que de la PMF (Ollis, et al. 2009).

**Figure 2-26 : Comparaison de la structure du domaine C-terminal de TolR (*H. influenzae*) et ExbD (*E. coli*)** PDB code : TolR (2JWK) ExbD (2PFU) - Image réalisé par Pymol®



### 2.3. EXBB EST LE COMPOSANT MAJEUR DU COMPLEXE

ExbB est une protéine intégrale de membrane interne, elle possède trois segments transmembranaires. Chez *Escherichia coli*, la protéine ExbB est composée de 241 acides aminés et présente une masse moléculaire de 26 kDa. Comme son homologue TolQ de système Tol-Pal, la partie N-terminale de la protéine est périplasmique (Eick-Helmerich and Braun 1989; Karlsson, et al. 1993a), la boucle cytoplasmique comprise entre les segments transmembranaires I et II est de taille importante, tandis que la boucle périplasmique entre les segments transmembranaires II et III est très courte. Elle est 7 fois plus abondante dans la cellule que TonB (Higgs, et al. 2002a). Nous ne disposons pas d'informations structurales concernant cette protéine. L'alignement de séquence a néanmoins permis d'identifier des homologies entre les hélices transmembranaires de protéines intégrales ExbB, TolQ et MotA (le système MotAB, moteur du flagelle, sera introduit après le système TonB). Une séquence consensus a été retrouvée chez les différentes espèces de bactéries à Gram-négatif (Cascales, et al. 2001; Zhai, et al. 2003).



**Figure 2-27 : Les séquences consensus des segments transmembranaires de TolQ, ExbB et MotA. D’après (Cascales et al, 2001).** Lettre en Majuscule : >90% identité  
Lettre en Minuscule : >60% identité

### 3. LE FONCTIONNEMENT DU SYSTEME TONB

Le système TonB est impliqué dans le transport actif à travers l’enveloppe bactérienne et indispensable pour la croissance bactérienne. Les connaissances actuelles sur le fonctionnement du système TonB sont décrites ci-après.

#### 3.1. LE MECANISME

L’importation des sidérophores et la régulation de ce mécanisme sont étudiées depuis de longues années. Le modèle actuel est le suivant : Le substrat (sidérophore chargé en  $Fe^{3+}$ ) se fixe sur son récepteur de la membrane externe (aussi connu sous le nom de « Transporteurs TonB-Dépendant », **TBDT**). Le transport des sidérophores à travers la membrane externe

utilise l'énergie issue de la force proton motrice de la membrane interne. Cela nécessite la transduction d'énergie du complexe TonB, ExbB et ExbD (Figure 2-28), depuis la membrane interne. TonB interagit avec la boîte TonB (« TonB-box ») des TBDTs de la membrane externe et permet le passage du sidérophore-Fe<sup>3+</sup>. Le transport des sidérophores ferriques jusqu'au périplasma exige une protéine de liaison périplasmique (en violet) et un transporteur ABC (en marron) pour le passage à travers la membrane interne. Une fois que le sidérophore a pénétré dans le cytoplasme, l'ion ferrique (Fe<sup>3+</sup>) est réduit en ion fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>), qui est destiné au stockage ou à l'incorporation dans les enzymes. Les sidérophores sont soit détruits soit recyclés vers le milieu extérieur. L'excès des ions Fe<sup>2+</sup> (qui pourrait induire la formation de radicaux nocifs pour la cellule) se lie à la protéine répressur Fur, qui lie à son tour à sa cible, le promoteur (P<sub>fur</sub>) et inhibe la transcription des gènes impliqués dans le transport des sidérophores.

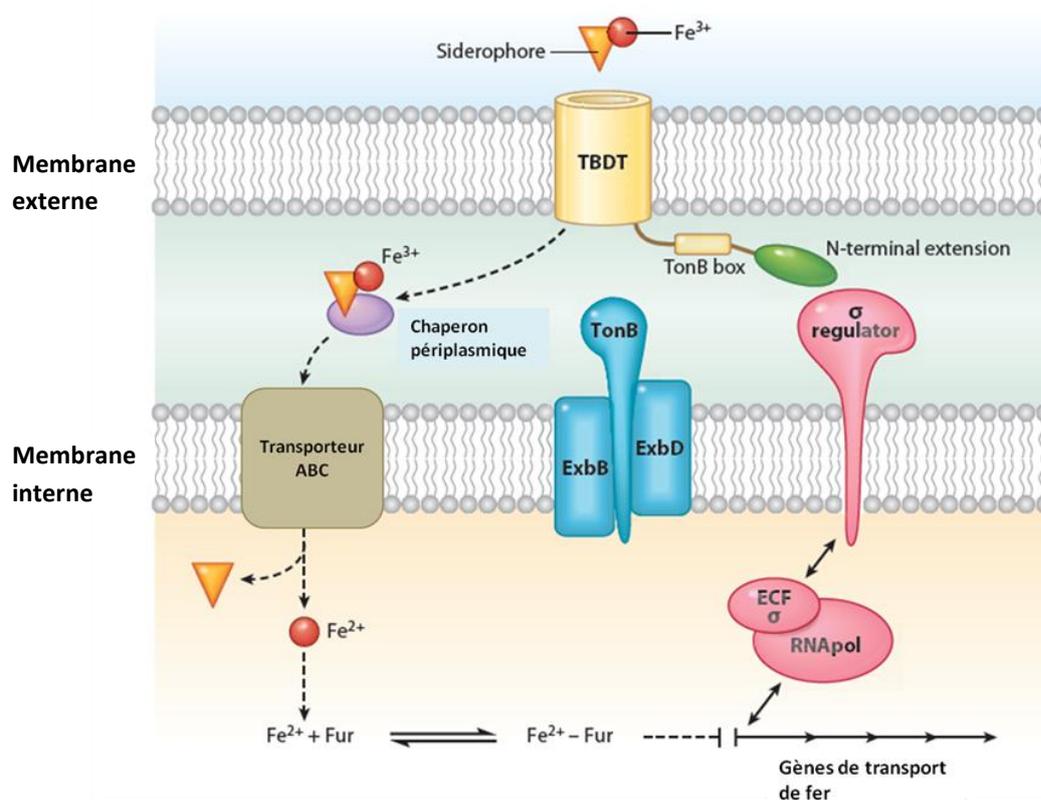


Figure 2-28 : Transport et régulation des sidérophores. D'après (Noiraj, et al. 2010)

Certains récepteurs, tels que FecA d'*Escherichia coli*, sont également contrôlés par les facteurs  $\sigma$  / anti- $\sigma$ . En plus de transporter le citrate diferré, FecA régule l'expression des gènes de transport *fecABCDE*. Cette régulation implique une interaction entre l'extension N-

terminale de la protéine FecA (vert), le régulateur de la membrane interne FecR (régulateur  $\sigma$ , rose), et le facteur sigma FecI cytoplasmique [extracytoplasmic function (ECF)  $\sigma$  factor] rose. L'énergie nécessaire au transport est fournie par le complexe TonB-ExbB-ExbD de la membrane interne (Noinaj, et al. 2010).

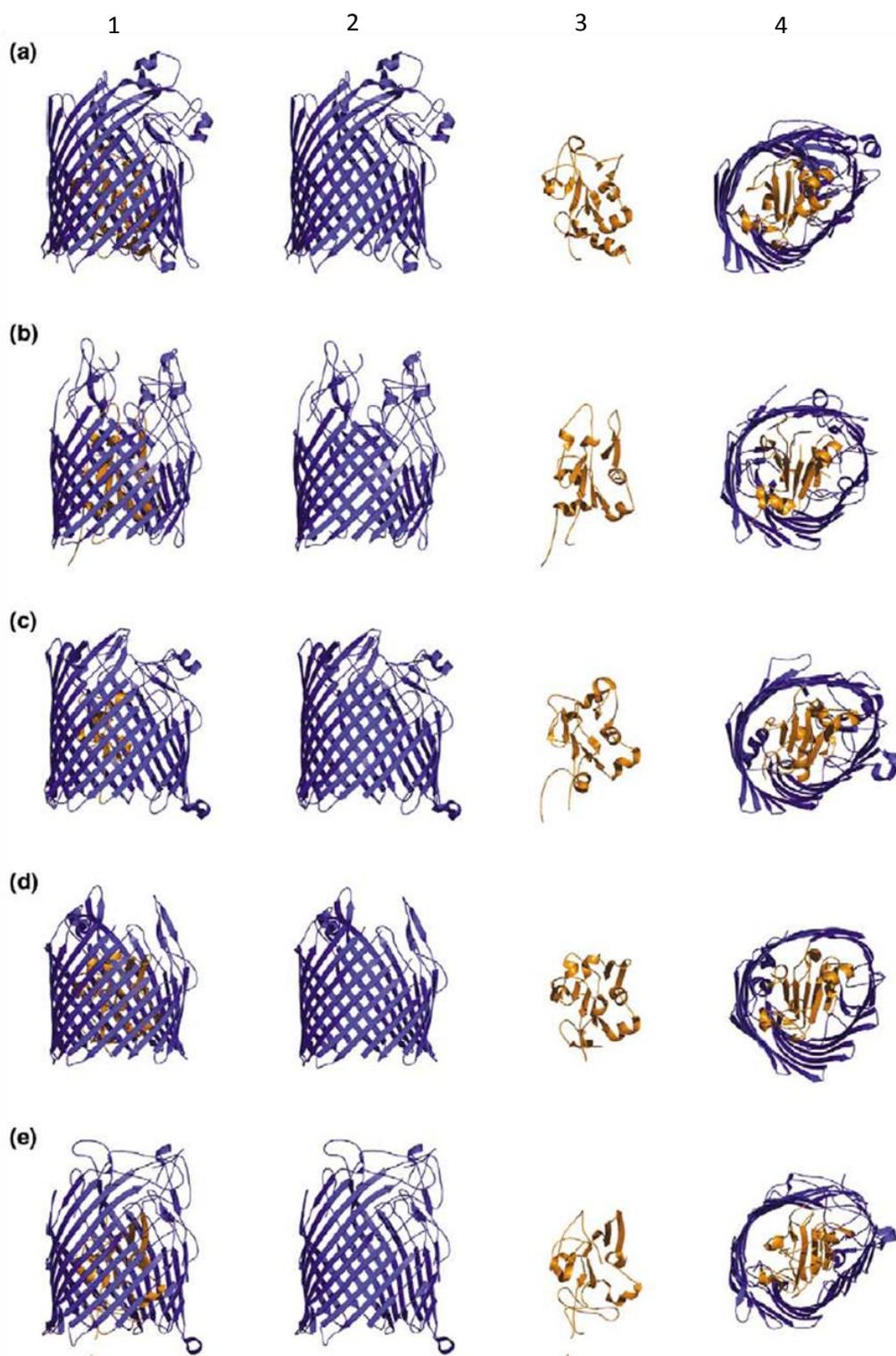
### 3.2. LES TRANSPORTEURS TONB-DEPENDANT (TBDTS)

Seuls les éléments d'une taille inférieure à 600 Da (sucres, acides aminés, petits peptides) peuvent diffuser librement à travers les canaux formés par les porines. Pour les composés d'une taille plus importante tels que les sidérophores, il existe de nombreux récepteurs à haute affinité au niveau de la membrane externe. Un sidérophore est un élément chimique sécrété par les micro-organismes et capable de chélater l'ion  $\text{Fe}^{3+}$  qui a une faible solubilité dans le milieu à pH neutre. Certaines souches pathogènes comme *Pseudomonas* ou *Haemophilus* possèdent des récepteurs spécifiques aux hémoprotéines (hémoglobine, hémopexine, ou leghémoglobine) et aux hèmes. Ces souches sont donc capables d'utiliser le  $\text{Fe}^{3+}$  qui provient d'autres microorganismes (Cornelis 2010). Les TBDTs fixent les sidérophores chargés en fer ou la vitamine B12 (cyanocobalamine) et permettent leur internalisation jusqu'au périplasme où ils sont pris en charge par un système de transport jusqu'au cytoplasme. Ces récepteurs présentent souvent une spécificité de substrat.

Beaucoup de bactéries pathogènes ont développé des récepteurs de membrane externe afin d'importer le fer sans avoir la nécessité de synthétiser un sidérophore comme les bactéries de la famille *Neisseria*, *Pasteurella* et *Moraxella*. L'import du fer est alors réalisé par un autre type de TBDT composé de la protéine de type TbpA. Le fer, lié à une transferrine, se fixe au récepteur capable de le décomplexer et de l'importer sans son sidérophore. Pour revue, (Cornelissen 2003).

La structure de nombreux récepteurs a été résolue par cristallographie: FhuA (Ferguson, et al. 1998; Locher, et al. 1998) ; FepA (Buchanan, et al. 1999); FecA (Ferguson, et al. 2002) ; BtuB (Chimento, et al. 2003); FpvA (Cobessi, et al. 2005a) ; FptA (Cobessi, et al. 2005b). Ces structures sont en forme de tonneau- $\beta$  composé de 22 brins qui délimitent un pore. Le domaine N-terminal des récepteurs forme un domaine globulaire – le « bouchon » qui obture le pore. Le domaine bouchon est composé d'un nombre variable d'hélices  $\alpha$  et de brins  $\beta$ . Les

22 brins  $\beta$  formant le paroi du tonneau- $\beta$  sont reliés par les petites boucles périplasmiques et les grandes boucles extracellulaires ([Wiener 2005](#)).



**Figure 2-29 : Structure des 5 récepteurs Ton B dépendants.**

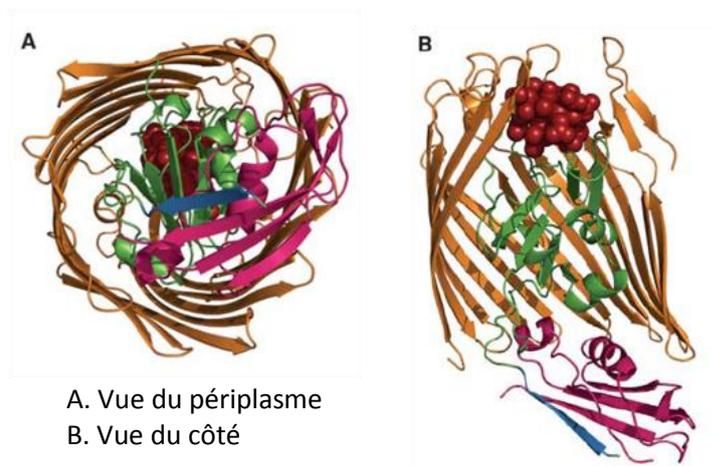
Les structures de (a) FhuA, (b) FepA (c)FecA (d) BtuB (e) FpvA sont présentées. Par colonne, de gauche à droite figurent : 1. Le récepteur entier vue de côté (le domaine globulaire (orange) le tonneau  $\beta$  (bleu) sont représentés) ; 2. Le tonneau- $\beta$  isolé ; 3. Le domaine central globulaire « bouchon » isolé ; 4. Le récepteur en entier (vue périplasmique). D'après (Wiener 2005).

### 3.3. INTERACTION ENTRE RECEPTEUR ET PROTEINE TONB

Il existe une interaction physique entre les récepteurs de membrane externe TonB-dépendant et le domaine C-terminal de TonB. Au niveau des récepteurs, cette zone d'interaction se situe dans la région N-terminale sur une région très conservée. Une séquence consensus de sept résidus a été identifiée : (D/E)-T-(I/L)-(V/T)-V-(V/T)-A. Cette séquence est appelée « boîte TonB ». Ce motif est aussi retrouvé chez les colicines TonB-dépendantes (toxines bactériennes qui utilisent le système TonB pour entrer dans la cellule : voir la section colicine). Cela suggère que la colicine mimerait l'interaction entre le récepteur et TonB.

L'interaction de TonB avec le récepteur BtuB a été suggérée pour la première fois de manière génétique. Des mutations suppressives de mutants dans la « boîte TonB » de BtuB ont été isolées au niveau de TonB (Bell, et al. 1990; Heller, et al. 1988). D'autres études ont permis d'isoler des supprimeurs de mutations dans la «boîte TonB » du récepteur FhuA (Schoffler and Braun 1989). La mise en évidence d'un complexe TonB-FepA a été obtenue *in vivo* par pontage covalent au formaldéhyde (Skare, et al. 1993). Des mutations au niveau de la «boîte TonB» de FepA entraînent la disparition du complexe FepA-TonB (Larsen, et al. 1997). D'autres preuves ont confirmé l'interaction entre TonB et des récepteurs de membrane externe. TonB est co-purifié avec FhuA fusionné à une étiquette 6-histidine (Moeck, et al. 1997) et les récepteurs FhuA et FepA sont retenus sur une colonne où la région périplasmique de TonB est immobilisée (Moeck and Letellier 2001). L'interaction entre la « boîte TonB » de BtuB et la région de TonB a été démontrée *in vivo* par substitution des résidus impliqués en cystéine (Cadieux, et al. 2000; Cadieux and Kadner 1999). Cette étude a permis de montrer que la région située entre Asn159 et Pro164 du TonB (nommée «région Q160 » par Cadieux *et coll.*) est en contact direct avec la «boîte TonB » de BtuB. Une étude similaire montre qu'il en est de même pour l'interaction entre TonB et FecA (Ogierman and Braun 2003). De plus, les auteurs montrent qu'il est possible de substituer la «boîte TonB » de FecA à celle de FhuA ou FepA. Cependant, une étude récente de ce domaine montre que la «région Q 160» tolère un certain nombre de délétions (notamment du résidu Q160) et de substitutions sans abolir l'activité de TonB (Vakharia-Rao, et al. 2007).

Les structures co-cristallines de deux récepteurs BtuB et FhuA, en présence de leur ligand cobalamine ou sidérophore, liés à la partie C-terminale de TonB ont été résolues (Shultis, et al. 2006).



**Figure 2-30 : Structure du complexe BtuB avec son ligand cobalamine (sphères rouges) et le domaine C-terminal de TonB. D'après (Shultis, et al. 2006).** La Ton-box (résidus 6 à 12) est en bleu; le domaine bouchon (résidus 13 à 137) en vert ; le tonneau  $\beta$  (résidus 138 à 594) est en orange. Le domaine C-terminal de TonB avec les résidus 153 to 233 est en rose.

TonB occupe la moitié de la face périplasmique du TBDT. Alors que la structure globale de la partie C-terminale de TonB est similaire à celles observées précédemment, la «boîte TonB» de l'extrémité N-terminale du récepteur qui est désordonnée sous forme libre est devenue ordonnée et forme un brin  $\beta$  dans le co-cristal. Ce brin  $\beta$  est reconnu par le troisième brin  $\beta$  de TonB et déplace le quatrième brin  $\beta$  qui devient alors désordonné. Cette interaction permet le contact entre la «boîte TonB» et la «région Q160» de TonB précédemment décrite *in vivo* comme la région d'interaction (Cadieux and Kadner 1999). Récemment, la structure RMN de la partie C-terminale de TonB avec FepA suggère que cette interaction entraîne un désordre au niveau de TonB (Peacock, et al. 2006) indiquant que TonB serait une protéine structurellement dynamique. Un autre aspect intéressant du co-cristal est que TonB ne couvre que la moitié de la face périplasmique de BtuB. Ceci pourrait laisser la place à une deuxième molécule de TonB et expliquer ainsi les résultats observés *in vitro* (Khursigara, et al. 2004). En effet, des études par centrifugation analytique et des expériences de Biacore montrent que l'interaction TonB-FhuA est de stœchiométrie 1 : 2 (Khursigara, et al. 2004). Cependant, il n'y a pas de deuxième «boîte TonB» sur le récepteur, mais un second site de faible affinité a été proposé (Khursigara, et al. 2005). Ces résultats restent surprenants et il n'existe pas de preuve *in vivo* d'un état oligomérique de TonB lié à la membrane externe.

D'autres protéines de membrane externe interagissent avec la protéine TonB. TonB interagit par sa partie C-terminale avec la lipoprotéine Lpp *in vivo* et *in vitro* et également avec la protéine OmpA. Le rôle physiologique de cette interaction n'est pas connu, mais il pourrait renforcer l'association de TonB à la membrane externe (Higgs, et al. 2002b).

#### 4. COMMENT S'ORGANISE LE SYSTEME ?

Les protéines ExbB, ExbD, et TonB interagissent entre elles. Les nombreuses études, biochimiques, génétiques, et structurales ont permis de définir les interactions entre ces trois protéines ancrées dans la membrane interne. L'interaction entre les protéines ExbB, ExbD, et TonB a tout d'abord été suggérée par des preuves indirectes. Il a été montré que la surproduction d'ExbB prévenait la dégradation protéolytique intrinsèque des protéines ExbD et TonB lorsqu'elles étaient surproduites (Fischer, et al. 1989). De plus, TonB est instable dans un mutant *exbB* ou *exbD* (Ahmer, et al. 1995; Skare and Postle 1991). Ces données suggèrent que ces trois protéines sont étroitement liées bien qu'elles ne soient pas organisées en opéron sur le chromosome.

Les premières preuves directes de l'interaction entre ExbB et TonB ont été obtenues par pontage covalent au formaldéhyde (Skare, et al. 1993). Le complexe ExbB-TonB est reconnu par un anticorps anti-TonB et disparaît dans un mutant *exbB*. Le domaine périplasmique riche en proline ne semble pas nécessaire à cette interaction (Larsen, et al. 1993; Traub, et al. 1993).

La seconde preuve de l'interaction entre ExbB et TonB est génétique. Le complexe ExbB-TonB disparaît dans un mutant ponctuel de l'ancre transmembranaire de TonB ( $\Delta V17$ ), et un mutant suppresseur a été isolé dans le premier segment transmembranaire d'ExbB (A39E) (Larsen, et al. 1994). En 1996, Braun *et coll.* montrent qu'une protéine ExbD non fonctionnelle, mutée dans l'ancre transmembranaire (D25N), entre en compétition avec la protéine sauvage. Ceci suggère une interaction au niveau du segment transmembranaire d'ExbD avec les autres composants du système TonB ou une multimérisation de la protéine. En utilisant des conditions de radiomarquage et de surproduction, la protéine ExbB-6His co-purifie avec ExbD ainsi qu'avec TonB (Braun, et al. 1996).

En utilisant des protéines ExbB et ExbD étiquetées en N-terminal par un épitope T7 et un anticorps monoclonal, des complexes homo- et hétéro-multimériques ont été découverts (Higgs, et al. 1998). Onze ans plus tard, la forme homomultimérique d'ExbD a été identifiée comme étant un dimère (Ollis, et al. 2009). Ce travail a également mis en évidence le complexe ExbD-TonB et a confirmé l'interaction entre ExbB et TonB qui est maintenu même en l'absence d'ExbD. Ces interactions sont conservées chez de nombreuses espèces bactériennes. L'utilisation d'anticorps monoclonaux, dirigés contre la protéine TonB

d'*Escherichia coli* et ayant une réaction croisée avec les protéines TonB d'autres entérobactéries, a permis d'observer des complexes ExbB-TonB par pontage chimique chez huit entérobactéries. Les auteurs suggèrent alors que l'organisation du système TonB est conservée chez les entérobactéries (Larsen, et al. 1996).

Pour établir un modèle d'assemblage du complexe, il faut déterminer le nombre de chaque composant. La quantification des protéines ExbB, ExbD, et TonB a été établie avec une stœchiométrie de 7 ExbB, pour 2 ExbD et 1 TonB (Higgs, et al. 2002a). La quantification a été réalisée dans deux conditions, en présence de fer ou dans un mutant *fur* (condition dans laquelle l'expression des gènes *exbB-exbD-tonB* est indépendante du fer et dérégulée). La production des protéines est diminuée d'un facteur 4 en présence de fer mais ces deux quantifications ramènent à la même stœchiométrie. La mutation *fur* mime la carence en fer, le ratio de FepA : TonB a augmenté de 1,5 :1 à 12,5 :1. Ceci montre que la stratégie de cellule en condition de carence en Fer, est de tapisser la surface de récepteur. Une fois que le sidérophore se fixe sur le récepteur, TonB est seulement requis pour libérer les sidérophores du récepteur. TonB n'est pas dédié à un seul récepteur.

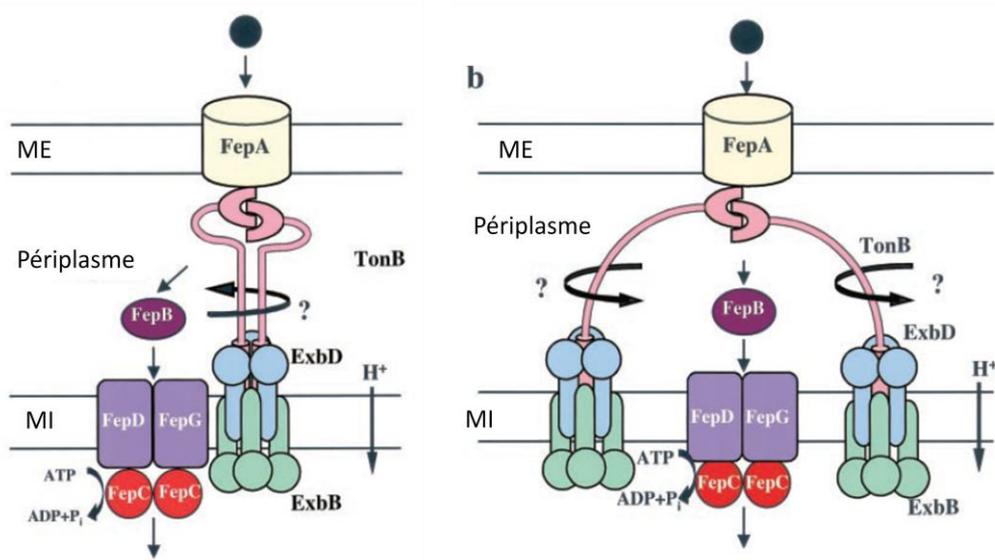
Composant	100µM FeCl <sub>3</sub>		Fur	
	Nombre de copie	Ratio	Nombre de copie	Ratio
<b>ExbB</b>	<b>2460</b>	<b>7</b>	<b>10080</b>	<b>7</b>
<b>ExbD</b>	<b>740</b>	<b>2</b>	<b>2840</b>	<b>2</b>
<b>TonB</b>	<b>330</b>	<b>1</b>	<b>1350</b>	<b>1</b>
<b>FepA</b>	<b>500</b>	<b>1,5</b>	<b>16830</b>	<b>12,5</b>

Table2-1 : Stœchiométrie du complexe ExbB-ExbD-TonB D'après (Higgs, et al. 2002a).

Le ratio déterminé pour le système TolQRA est de 4-6 TolQ : 2 TolR : 1 TolA tandis qu'une stœchiométrie de 4 : 2 a été proposée pour le moteur MotA-MotB (voir après). Les modèles proposés pour ces deux derniers systèmes sont similaires. Pour le système TonB, il est beaucoup plus difficile d'établir un modèle avec au minimum 24 hélices transmembranaire. En effet, contrairement à TolA, TonB a été trouvé dans un état dimère; ce ratio 1 TonB : 2 ExbD : 7 ExbB pourrait donc ne pas refléter le nombre de protéines dans un complexe natif et ne correspondrait qu'à un ratio minimal. La formation du complexe TonB est supposée être un processus actif et dynamique où ExbB pourrait s'intégrer et se désintégrer du complexe TonB en en réponse à la PMF (Ollis, et al. 2009).

Ces nombreuses études du système TonB amènent à proposer deux modèles de transduction d'énergie: un modèle propulseur (« propeller ») où TonB reste ancré dans la membrane interne et tire ou tord les transporteurs de membrane externe pour libérer leur ligand (Chang, et al. 2001; Kaserer, et al. 2008) ; le second modèle, propose que TonB ferait la navette de la membrane interne à la membrane externe pour délivrer le potentiel énergétique stocké.

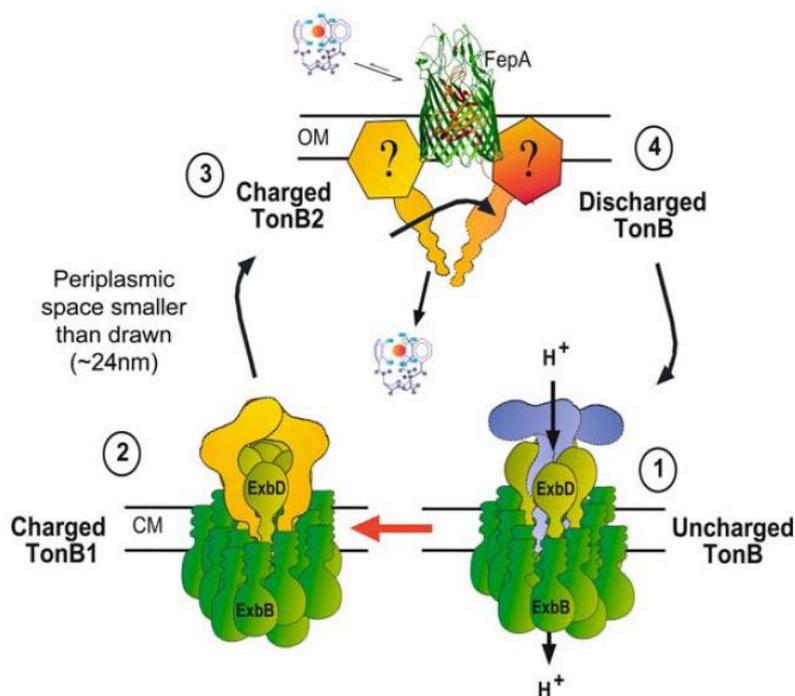
Ces deux modèles sont en faveur de l'utilisation du gradient électrochimique par l'intermédiaire des protéines ExbB et ExbD pour fournir un potentiel énergétique à la protéine TonB et provoquer un changement conformationnel de TonB.



**Figure 2-31 : Modèle schématisé de transduction d'énergie par le système TonB : modèle « propulseur ».** Dans ce modèle, TonB reste associé à la membrane interne. Il tient compte des données cristallographiques indiquant une dimérisation de TonB. Les deux molécules de TonB qui interviennent dans le processus peuvent provenir d'un même complexe ExbBD-TonB ou de deux complexes différents. D'après (Chang, et al. 2001).

Certaines preuves expérimentales soutiennent le second modèle, ou modèle cyclique dans lequel la protéine TonB se désengage de la membrane interne pour traverser l'espace périplasmique afin d'interagir avec les récepteurs de membrane externe. Des expériences de fractionnement en gradient de saccharose montrent que TonB est distribué dans les deux membranes. Dans un mutant *exbBD-tolQR*, TonB n'est retrouvé qu'au niveau de la membrane externe (Letain and Postle 1997). Des expériences de marquage, à l'aide d'un maléimide ne

pouvant traverser la membrane cytoplasmique, suggèrent que la partie N-terminale de TonB se trouve accessible dans le périplasma (Larsen, et al. 2003).



**Figure 2-32 : Modèle schématique de transduction d'énergie pas le système TonB : modèle « navette»**

La PMF est utilisée par le complexe ExbB-D (étape 1) et induit un changement conformationnel de TonB alors associé en dimère (étape 2). L'énergie potentielle conservée par le changement conformationnel de TonB est délivrée à un transporteur TonB-dépendant et provoque la libération du ligand dans l'espace périplasmique (étape 3). TonB est alors recyclé vers le complexe de membrane interne ExbBD (étape 4) pour être utilisé de nouveau. D'après (Postle and Larsen 2007).

Ce cycle de transduction d'énergie commence au niveau de la membrane interne où TonB est en association avec un complexe hétéromultimérique d'ExbB et d'ExbD. Dans ce modèle de « navette », TonB doit se désengager de la membrane interne impliquant donc que l'association avec la membrane interne soit négociée par des interactions faibles avec le complexe ExbB-ExbD. Toutefois cette seconde hypothèse a été récusée récemment. En effet, la protéine GFP fusionnée à l'extrémité N-terminale de TonB, n'inactive pas TonB tout en demeurant dans le cytoplasme indiquant que TonB est toujours fonctionnel bien que dans l'incapacité de se désengager de la membrane interne (Kaserer, et al. 2008).

Les données récentes et la discussion des modèles de transduction d'énergie de TonB ont fait l'objet de nombreuses revues (Braun and Endriss 2007; Braun, et al. 2003; Klebba 2003; Nikaido 2003; Postle and Larsen 2007; Wandersman and Delepelaire 2004; Wiener 2005)

## 5. HOMOLOGIE ET COMPLEMENTATION CROISEE ENTRE LE SYSTEME TOL-PAL ET LE SYSTEME TONB

Le couple d'homologues ExbB/TolQ d'*Escherichia coli* présente une similarité de séquences de 79% (26% d'identité). Ces homologues sont notamment très fortes au niveau des segments transmembranaires. Le couple d'homologues ExbD/TolR d'*Escherichia coli* présente une similarité de séquences de 70% (25% d'identité) (Eick-Helmerich and Braun 1989). Les protéines TolA et TonB sont homologues; les segments transmembranaires N-terminaux sont similaires et peuvent être échangés sans altérer la fonction de la protéine (Karlsson, et al. 1993b; Keller, et al. 2007). Le domaine central périplasmique est différent et la partie C-terminale, malgré une faible similarité de séquences, présente une structure superposable (Deprez, et al. 2005; Witty, et al. 2002).

Les évidences génétiques montrent que les couples TolQ-R et ExbB-D sont interchangeables. En effet la souche *exbB(D)* présente une sensibilité résiduelle aux colicines de groupe B, alors qu'une double mutation *exbB(D)-tolQ(R)* est totalement résistante aux colicines (Braun 1989). Un peu plus tard, les protéines TolQ-TolR ont été montrées capables de remplacer les protéines ExbB-ExbD dans la fonction Ton-dépendant avec 10-20% d'efficacité (Bouveret, et al. 1997; Bradbeer 1993). La surproduction des protéines TolQ et TolR dans un mutant *exbB(D)* permet de restaurer une sensibilité aux colicines du groupe B ainsi qu'à l'albomycine reflétant le transport de ferrichrome (Braun and Herrmann 1993). Dans une souche *exbBD-tolQR*, l'activité d'importation de cobalamine et des colicines est complètement abolie (Bradbeer 1993; Braun and Herrmann 1993). En outre, la surproduction de TolQ dans un mutant *exbB* ou de TolR dans un mutant *exbD* ne permet pas de complémentarité, suggérant une spécificité d'interaction entre chaque couple. Récemment, l'équipe de Larsen a confirmé ces résultats en réalisant ces expériences dans un contexte où

chaque couple (TolQR, ExbBD) était exprimé à un niveau chromosomique (Brinkman and Larsen 2008).

Malgré la similarité structurale du domaine périplasmique (Kodding, et al. 2005) et la similarité de séquence protéique de l'hélice transmembranaire entre TonB et TolA, il n'y a pas de complémentation croisée observée entre TolA et TonB. Mais La protéine fusion formée par le domaine périplasmique de TonB et l'hélice transmembranaire de TolA fonctionne avec le complexe ExbB-ExbD et avec TolQ-TolR. Néanmoins la protéine chimère fonctionne plus efficacement avec le couple TolQR qu'avec ExbBD, démontrant ainsi que les ancrs transmembranaires gardent une spécificité d'interaction avec les couples de protéines avec lesquelles elles sont naturellement en interaction (Karlsson, et al. 1993a).

Nous venons de voir les deux systèmes Tol et TonB de l'enveloppe bactérienne. Ces deux systèmes forment un moteur moléculaire qui permet la transduction d'énergie à longue distance, depuis la membrane interne vers la membrane externe. En 2001, la relation entre les protéines Tol et celles du moteur du flagelle, MotA-MotB, a été mise en évidence par un alignement de séquence (Cascales, et al. 2001). Les séquences consensus au sein des hélices transmembranaires des systèmes Tol, Mot, et TonB ont été retrouvées. Les études sur le système MotA-MotB (aussi son système paralogue PomA-PomB) s'avèrent très intéressantes pour comprendre la structure et le fonctionnement du moteur des deux autres systèmes Tol et TonB.

### III. SYSTEME MOTEUR MOTA-B (POMA-B) DU FLAGELLE

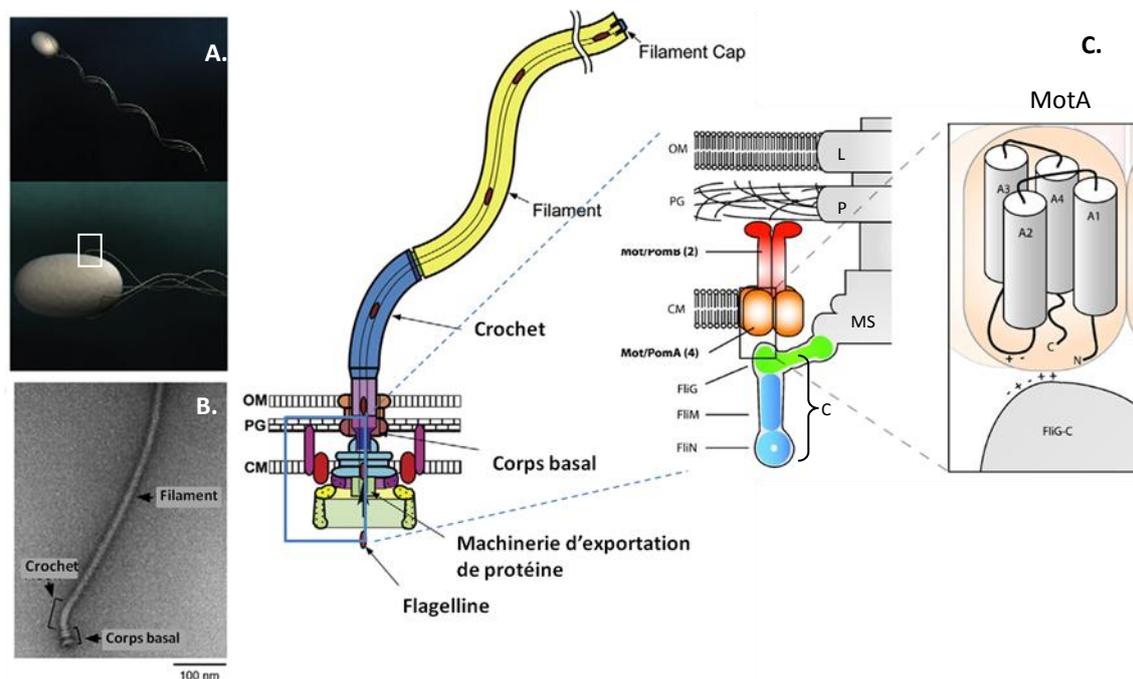
#### 1. GENERALITE

Le complexe MotA-MotB forme le moteur du flagelle. Les flagelles bactériens sont des appendices extracellulaires permettant à la bactérie de se déplacer dans son milieu environnant afin d'accéder aux nutriments. Le flagelle est un propulseur hélicoïdal ou rotor tournant grâce à des moteurs rotatifs ancrés dans l'enveloppe cellulaire qui forment le stator. L'énergie utilisée pour la rotation de ces moteurs est un gradient ionique de la membrane interne, des protons pour la plupart des bactéries neutrophiles, et des ions sodium pour les bactéries alcalophiles et les espèces *Vibrio* marines halophiles. Les flagelles peuvent tourner dans le sens horaire ou antihoraire, ce qui permet à la bactérie de s'orienter. La régulation du mouvement est complexe et nécessite des systèmes senseurs régulateurs qui contrôlent la vitesse et le sens de rotation du flagelle en fonction d'un gradient de substrat (chimiotactisme). Par une cascade de phosphorylation à partir d'un chimiorécepteur, la protéine CheY régule le sens de rotation du flagelle en se fixant sur la partie cytoplasmique du moteur du flagelle. Les signaux, les protéines impliquées et le mécanisme de régulation du chimiotactisme ne seront pas décrits dans ce manuscrit (pour revue (Minamino, et al. 2008; Terashima, et al. 2008; Thormann and Paulick 2010)).

## 2. LA COMPOSITION DU FLAGELLE

Le flagelle est composé d'un filament long et fin (environ 10 µm soit 10 fois la taille de la bactérie) dont le rôle est de convertir un mouvement de rotation en mouvement de propulsion. Ce filament est composé essentiellement par la sous-unité flagelline FliC, arrangée en 11 protofilaments. A sa base, le filament est lié à une structure légèrement plus épaisse appelée le crochet, composée essentiellement de la sous-unité FlgE. Le filament se termine par la protéine FliD dont la présence empêche la polymérisation de nouvelles sous-unités de flagelline. La jonction entre le filament et le crochet est constituée des protéines FlgK et FlgL. Le crochet est relié à l'enveloppe par le corps basal, formé d'anneaux entourant une tige. Cette tige forme un canal permettant le transit des constituants du flagelle. Les anneaux ont été baptisés en fonction de leur localisation relative dans la structure de l'enveloppe. L'anneau LP se trouve au niveau de la membrane externe (lipopolysaccharide) et du peptidoglycane, il est constitué des protéines FlgI (anneau P) et FlgH (anneau L). L'anneau MS, constitué de la protéine FliF, est présent au niveau de la membrane interne et de la face périplasmiques de la membrane interne (M, membrane; S, supra-membrane), il s'agit d'un socle essentiel pour l'assemblage de la tige et du moteur du flagelle. L'anneau C est sur la face cytoplasmique de la membrane interne. Il contient les protéines FliG, FliM, et FliN qui contrôlent la vitesse et le sens de rotation du flagelle en fonction des conditions environnementales et forment le **rotor** (ou «switch complex»); cet anneau contient également les protéines MotA et MotB formant le **stator**, dont la fonction est de coupler l'utilisation d'une source d'énergie (le potentiel de membrane) au mouvement du filament. La structure du flagelle est montrée sur la [figure 2-33](#) (Morimoto, et al. 2010; Thormann and Paulick 2010).

Le moteur de flagelle est constitué d'un rotor et un stator. FliG est la protéine rotor impliquée dans la rotation. Le domaine C-terminal de FliG interagit avec MotA (Zhou, et al. 1998a). Le stator est composé des protéines MotA et MotB (PomA et PomB chez certaines espèces marines). La délétion des gènes *mot* conduit à une paralysie de la bactérie. Les produits de ces gènes sont impliqués dans le mécanisme de rotation et n'interviennent pas dans la structure elle-même.



**Figure 2-33 : Structure de flagelle chez *Escherichia coli* D'après (Morimoto, et al. 2010; Thormann and Paulick 2010).** A : une bactérie flagellée ; B : microscopie avec la coloration négative d'un flagelle (grossissement du rectangle de l'image A) ; C : représentation schématique d'un flagelle

Il y a 2 types de moteur, qui utilisent la PMF, la plupart des flagelles utilisent des pompes à proton via le système MotA-MotB tandis que les organismes marins utilisent les pompes à sodium (PomA-PomB). Les deux systèmes sont identifiés comme paralogues.

### 3. LES COUPLES MOTA-MOTB ET POMA-POMB SONT DES PROTEINES INTEGRALES MEMBRANAIRES

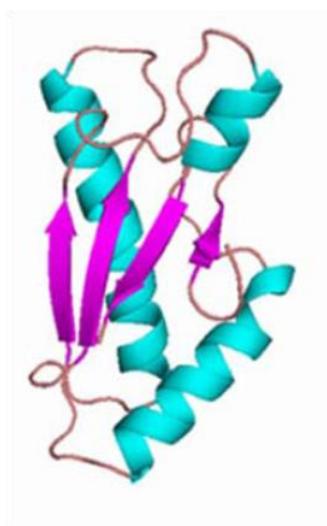
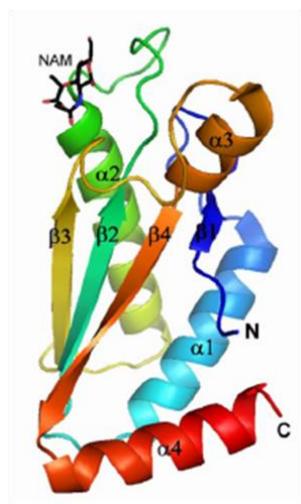
Les deux protéines MotA et MotB sont localisées au niveau de la membrane interne (Block and Berg 1984; Wilson and Macnab 1990). Elles forment une structure autour de l'anneau MS.

#### 3.1. MOTB

Chez *Escherichia coli*, MotB est une protéine de 308 résidus possédant une ancre transmembranaire. La majorité de la protéine MotB se trouve dans le périplasma (Chun and

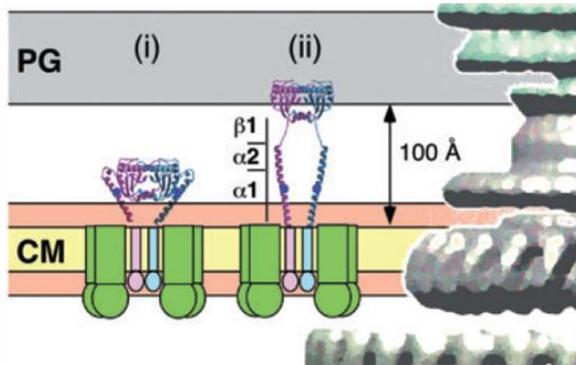
Parkinson 1988). Par ultracentrifugation différentielle analytique Kojoma *et coll.* ont montré que le domaine C-terminal de MotB forme des dimères (Kojima, *et al.* 2008a). La structure dimérique cristalline du domaine C-terminal de MotB de chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium a été résolue (Kojima, *et al.* 2009).

Trois rôles structuraux ont été attribués au domaine périplasmique de MotB. Une partie du domaine périplasmique est impliquée dans l'attachement au peptidoglycane (Blair, *et al.* 1991; McCarter 1994). Cette interaction est primordiale pour le fonctionnement du moteur puisque des mutants délétés de ce domaine sont paralysés (Muramoto and Macnab 1998). Le domaine d'interaction avec le peptidoglycane (PDB peptidoglycane binding domain), OmpA-like, de MotB chez *Helicobacter pylori* a été co-cristallisé avec l'acide N-acétyl-muramique (Roujeinikova 2008). La structure montre clairement l'association de MotB avec la molécule de NAM via son hélice  $\alpha 2$  et la boucle qui lie le brin  $\beta 2$  et l'hélice  $\alpha 2$ .



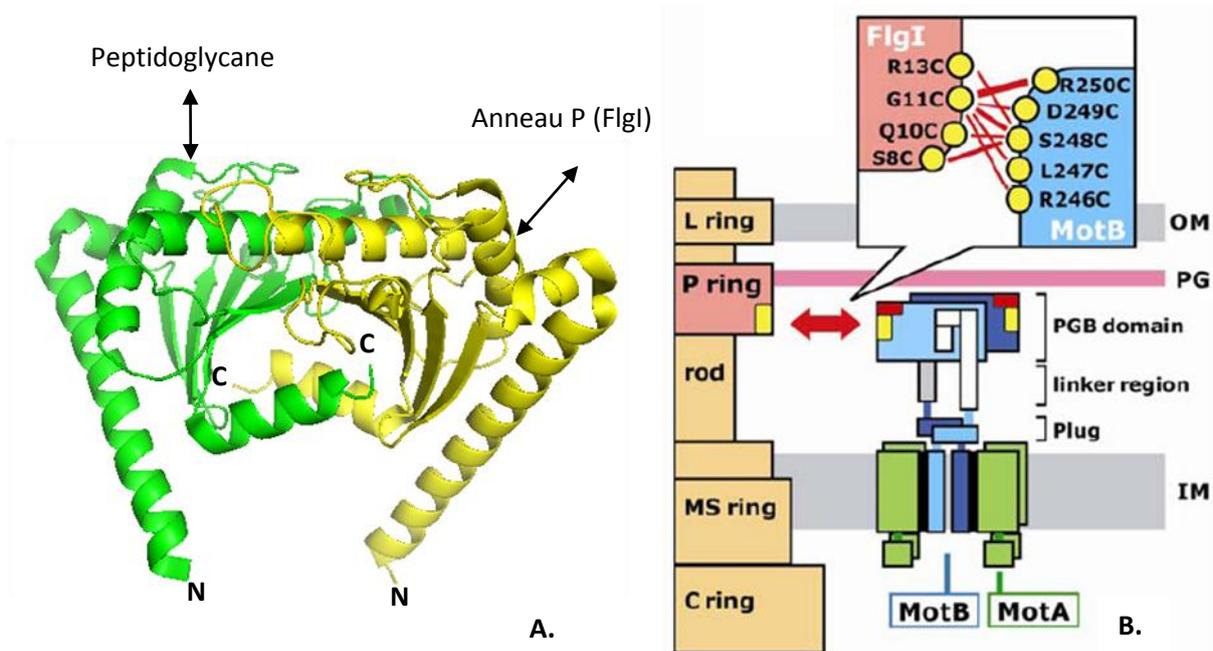
**Figure 2-34 : Structure 3D du domaine OmpA-like de MotB d' *H. pylori* (résidus 125-256) complexée avec une molécule de NAM (acide N-acétyl muramique) PDB 3CYQ résolution à 2,3Å; à gauche la structure du domaine OmpA-like de la protéine Pal d'*E. coli* D'après (Roujeinikova 2008)**

Il a été démontré que la délétion des résidus 51-70 du domaine périplasmique de MotB d'*E. coli* (résidus 51-100 chez *Salmonella* (Kojima, *et al.* 2009; Muramoto and Macnab 1998) entraîne un flux permanent de protons et l'arrêt de croissance. Cette petite région du domaine périplasmique supposée organisée en hélice  $\alpha$  interviendrait dans la régulation de l'ouverture du canal ionique formé par les protéines MotA-B, son absence provoquant un efflux massif de protons (Hosking, *et al.* 2006).



**Figure. 2-35 : Modèle pour l'activation du moteur MotAB dépendant du changement conformationnel de MotB** D'après (Kojima, et al. 2009) (i) état inactif : le canal est fermé par les hélices de MotB (ii) état actif du canal ouvert et changement de conformation du domaine C-terminal, qui interagit avec le peptidoglycane (PG).

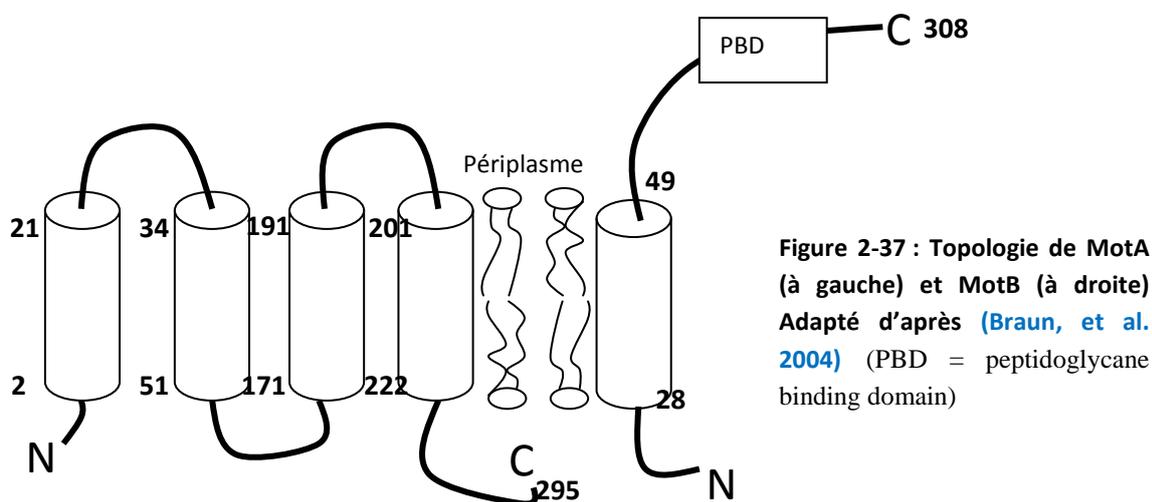
Le troisième rôle a été proposé par Hizukuri *et coll.* en 2010. Avec la substitution systématique des résidus de MotB et FlgI (la protéine forme l'anneau P) en cystéine, les auteurs ont pu identifier des zones d'interaction entre les deux protéines. Ceci suggère que le domaine périplasmique de MotB aurait aussi pour rôle de fixer le moteur au flagelle (Hizukuri, et al. 2010).



**Figure 2-36 : A. Structure dimérique du domaine C-terminal (résidus 97-273) de MotB résolue à 1,75Å.** D'après (Kojima, et al. 2009) (PDB : 2ZVY). Les deux monomères sont colorés en jaune ou en vert, les extrémités N et C terminales sont indiquées. (Les interactions sont indiquées par les flèches.) **B. Représentation des interactions identifiées par le cross-link cystéine entre MotB et FlgI.** D'après (Hizukuri, et al. 2010).

## 3.2. MOTA

En ce qui concerne la protéine MotA, les études de Dean *et coll.* (1984) prédisaient la présence de quatre segments transmembranaires, deux courtes boucles périplasmiques, et une grande boucle cytoplasmique (Dean, *et al.* 1984). La présence d'une large boucle cytoplasmique a été confirmée par des tests d'accessibilité aux protéases (Blair, *et al.* 1991). Cette topologie a été confirmée par la construction de mutants ponctuels en cystéines. Des réactifs fluorescents, se fixant sur les groupements thiol et ne pouvant traverser la membrane cytoplasmique, ont permis de déterminer les résidus présents au niveau de la face périplasmique et ceux côté cytoplasmique (Zhou, *et al.* 1995).



Les gènes *motA* et *motB* sont très conservés, à la fois chez les bactéries à Gram négatif et positif. Les deux gènes font partie du même opéron. MotB est instable en absence de MotA (Wilson and Macnab 1990). Une étude par alignements multiples et arbres phylogénétiques a permis la détermination de signatures spécifiques pour ces protéines (Nguyen and Saier 1996). Dans le cas de MotA, seize résidus sont retrouvés hautement conservés. Treize d'entre eux ont certainement un rôle structural (sept glycines, une alanine, trois résidus hydrophobes : I, L, et F, ainsi que deux prolines). Les deux prolines se retrouvent au début du troisième et à la fin du quatrième segment transmembranaire. Elles sont donc sur la face cytoplasmique, et sont supposées être à l'origine du contrôle des changements conformationnels. Ces deux prolines sont également très conservées chez les protéines TolQ et ExbB, et sont placées au

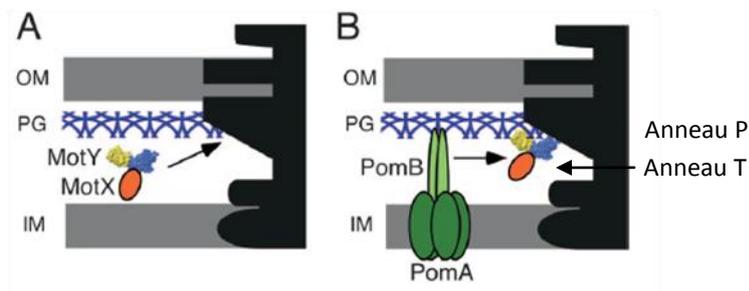
même niveau, sur le coté cytoplasmique des 2 derniers ST. Ceci suggère un mécanisme commun. Les trois autres résidus conservés sont des résidus chargés (R, E et T), deux d'entre eux se retrouvant dans la grande boucle cytoplasmique, le troisième se trouvant dans le quatrième ST. Deux signatures correspondant aux ST3 et ST4 de MotA, ont ainsi pu être identifiées. Par des alignements de séquences, Cascales *et coll.* ont mis en évidence des séquences consensus au niveau des segments transmembranaires 3 et 4 de MotA avec TolQ ou ExbB ainsi que de l'ancre transmembranaire de MotB avec celle de TolR ou ExbD (Cascales, *et al.* 2001). Ces consensus incluent les signatures de MotA établies par Nguyen et Saier (Nguyen and Saier 1996).

En 2008, Hosking et Manson ont pu identifier dans l'extrémité N-terminale de MotB un motif « KRRKAK » constitué par des résidus chargés positivement et un motif « ELEE » chargé négativement dans l'extrémité C-terminale de MotA. La neutralisation de charge (ELEE→ALAA) ou l'inversion de charge (ELEE →KLKK) de ces motifs par mutagenèse dirigée a entraîné la perte de motilité de la bactérie. Cependant des mutants suppresseurs de ces mutations non fonctionnelles ont été trouvés, dans le gène *motA* (codant pour la boucle ou la partie C-terminale cytoplasmique) ou *motB* (codant pour la partie N-terminale cytoplasmique ou dans la partie périplasmique). Ces résultats suggèrent que des effets compensatoires peuvent exister entre ces mutants suppresseurs pour permettre l'interaction avec la protéine FliG (Hosking and Manson 2008).

Chez les bactéries alkalophiles et les espèces *Vibrio* marines halophiles, il existe un autre système de moteur qui est dépendant de la force sodium motrice : le système PomA-PomB. Les deux protéines sont paralogues de MotA-MotB (Asai, *et al.* 1997).

En dehors de ces deux protéines, le moteur Na<sup>+</sup>-dépendant a besoin de deux autres protéines MotX et MotY pour ancrer le moteur dans la machinerie du flagelle (Asai, *et al.* 1997). MotX et MotY forment un anneau dénommé T, entre l'anneau P et PomB. Cet anneau connecte le moteur et la machinerie du flagelle (Okabe, *et al.* 2005; Terashima, *et al.* 2006). L'anneau T n'existe pas dans le système de moteur MotA-MotB. Comme cela a été mentionné précédemment, le domaine C-terminal de MotB assemble le moteur sur le flagelle via l'anneau P (Hizukuri, *et al.* 2010). Les protéines MotX et MotY semblent jouer un rôle dans la localisation polaire des protéines PomA et PomB et pourraient faire le lien entre l'anneau LP et le rotor. Il est intéressant de noter que la vitesse de rotation des moteurs des

bactéries de type *Vibrio* est 4 à 5 fois plus rapide que celle d'*E. coli* ou *Salmonella flagella*, qui ne possèdent pas de paralogues *motX* ou *motY*.



**Figure 2-38** : Assemblage du moteur PomA-PomB via MotX-MotY sur le flagelle D'après (Kojima, et al. 2008b)

En construisant des protéines de fusion entre les complexes Pom et Mot, il a été démontré que le domaine responsable de la spécificité des ions sodium se trouve dans le domaine C-terminal de PomB chez *Vibrio alginolyticus*. (Yorimitsu and Homma 2001). En 2009, l'Asp 24 conservée de PomB ainsi que deux autres sites de fixation de l'ion sodium, non identifiés, ont été suspectés pour intervenir dans le transit de cet ion à travers le canal PomA-B (Sudo, et al. 2009). Cependant des résultats se basant aussi sur la production de protéine chimère chez *E. coli* suggèrent que l'hélice transmembranaire de PomB serait responsable de cette sélectivité ionique (Terashima, et al. 2008).

#### 4. ORGANISATION DES ST DE MOTA ET MOTB

Le phénotype d'un mutant du moteur du flagelle correspond à l'absence de mobilité de la bactérie (ou paralysie). Ce phénotype permet donc un criblage simple et rapide lors des expériences de mutagenèse. Ainsi, de nombreux travaux de mutagenèse dirigée ou aléatoire confirment *in vivo* l'importance des résidus conservés, identifiés par les alignements de séquences.

La majorité des mutants obtenus par mutagenèse aléatoire porte une mutation au niveau des segments transmembranaires de MotA et MotB, laissant supposer qu'ils sont des composants nécessaires à la conductivité ionique (Blair and Berg 1991; Blair, et al. 1991; Togashi, et al. 1997). Nous verrons que le résidu aspartate 32 de MotB (conservé à 100%) est essentiel à la rotation du moteur et semble directement impliqué dans la protonation (Zhou, et al. 1998b). Les deux prolines (P173 et P222) situées à l'extrémité cytoplasmique des ST-3 et -4 de MotA sont également conservées et importantes pour la rotation du moteur. L'importance de ces résidus a tout d'abord été mise en évidence par mutagenèse aléatoire (Blair and Berg

1991). La mutation de chacun de ces résidus provoque un arrêt de la mobilité des cellules (Zhou and Blair 1997). En effet, la nature de ce résidu cyclique engendre des contraintes structurales particulières. Une étude poussée des phénotypes des mutations au niveau de ces deux prolines montre que ces résidus ne sont pas impliqués dans le transport des protons, mais certainement dans le mouvement du rotor (Braun, et al. 1999). Les différentes mutations du résidu proline 173 tendent à montrer que ce résidu joue un rôle dans le mouvement du rotor mais également dans la régulation du flux de proton. Récemment, les études menées sur le moteur de *Salmonella enterica* révèlent que la mutation P173A n'affecte pas l'assemblage du moteur autour du flagelle. Mais la vitesse du moteur est considérablement réduite dans des conditions de basse concentration en proton. Les auteurs suggèrent que cette mutation pourrait affecter la fréquence du changement conformationnel de MotA/B pendant la rotation du rotor à grande vitesse (Nakamura, et al. 2009). La proline 222 ne tolère aucune substitution, la contrainte imposée par la chaîne de ce résidu est donc primordiale à cette position. Cette proline pourrait réguler la conformation du complexe MotA-B et contrôler les changements conformationnels (Braun, et al. 1999). Dans le cas de PomA, la mutation de la proline 199 se trouvant dans la même position rend également les cellules *Vibrio* immobiles. Il est probable que ce résidu soit impliqué dans le même type de mécanisme moléculaire.

La partie cytoplasmique de MotA est également importante pour la fonction du moteur. Deux résidus chargés conservés (Arg90 et Glu98, chez *Escherichia coli*), localisés au niveau de la boucle cytoplasmique de MotA, sont importants pour la rotation du moteur (Zhou and Blair 1997). Ces résidus semblent avoir une fonction redondante puisque seule la double mutation abolit la rotation du flagelle. Le résidu Glu150 possède également un rôle, cependant moins essentiel, dans l'interaction avec FliG (Zhou and Blair 1997).

Parmi les résidus protonables, seul l'aspartate 32 de MotB semble être un résidu ionisé, sa mutation en glutamate affecte peu la fonction du moteur, mais le remplacement par un autre résidu bloque la rotation du flagelle (Zhou, et al. 1998b). La surproduction des protéines MotA et MotB provoque un défaut de croissance dû à la fuite de protons (Blair and Berg 1990). Or, la surproduction des mutants au niveau de l'aspartate 32 ne provoque pas de diminution de la croissance, montrant ainsi que ce résidu est impliqué dans la conduction des protons (Zhou, et al. 1998b). Dans le cas de PomB, ce résidu aspartate est également conservé (Asai, et al. 1997) et pourrait être un résidu ionisable permettant l'entrée d'ion sodium. La mutation de cet aspartate en cystéine réduit de manière significative la mobilité de la souche (Kojima, et al. 2000). D'autres résidus pourraient participer au passage d'ions au niveau du

moteur, mais les positions de ces résidus pourraient varier selon les espèces. Dans le cas de PomA, le résidu thréonine 186 au niveau du ST4 et le résidu aspartate 148 au début du ST3 semblent importants pour la fonction du moteur (Jaques, et al. 1999; Kojima, et al. 1999). La mutation de ces résidus bloque le moteur et rend les cellules résistantes aux inhibiteurs des canaux sodium tels que le phenamil. La mutation D24N de PomB peut être supprimée par la substitution N194D sur la protéine PomA (Terashima, et al. 2010). De façon tout à fait intéressante, le suppresseur du mutant tolR-D23A avait été obtenu dans le ST3 de TolQ en même position. (Goemaere, et al. 2007a).

Côté périplasmique, les protéines MotA ou PomA possèdent deux courtes boucles. La mutagenèse systématique en cystéine des boucles de PomA, montre que la boucle entre les ST3 et ST4 est accessible au solvant contrairement à la boucle entre les ST1 et ST2. D'autre part, la simple mutation des 5 des 10 résidus de la boucle entre les ST3 et ST4 abolissent la mobilité de la cellule. La première boucle pourrait être couverte par une autre protéine comme PomB, ou les protéines supplémentaires MotX, ou MotY. La seconde boucle pourrait intervenir dans la fonctionnalité du moteur (Asai, et al. 2000)

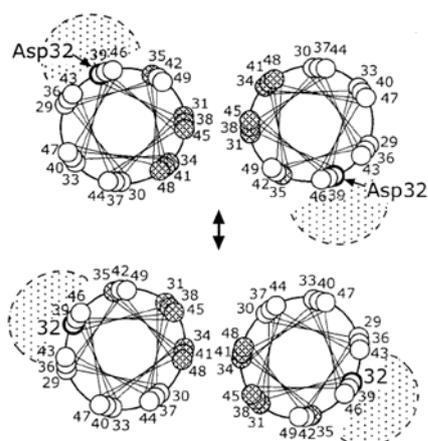
## 5. ASSEMBLAGE DU COMPLEXE MOTA-B

L'estimation de la stœchiométrie pour le complexe PomA-B a été réalisée par la purification d'un complexe fonctionnel PomA-B de 175 kDa ainsi que la construction de protéines en tandem PomA-PomA *in vitro*. Il y a quatre protéines PomA pour deux PomB (Sato and Homma 2000). La purification du complexe MotA-B a permis d'établir une stœchiométrie identique (Kojima and Blair 2004b).

Les études par mutagenèse systématique en tryptophane des résidus localisés au niveau des segments transmembranaires de MotA ont identifié les faces des hélices qui étaient dans un environnement protéique ou lipidique. En effet, les tryptophanes insérés provoquent une modification des contacts entre les hélices proches conduisant à un complexe non fonctionnel, alors que pour les faces d'hélices en contact avec les lipides, l'insertion d'un tryptophane n'a pas d'effet sur l'arrangement des hélices. Par cette technique, Sharp et collaborateurs ont montré que les ST1 et ST2 de MotA sont plus exposés aux lipides que les ST3 et ST4. En effet, les ST3 et ST4 sont beaucoup moins tolérants aux substitutions, suggérant que ces hélices sont entourées par d'autres segments transmembranaires (Sharp, et al. 1995a). Dans le

cas de MotB, l'hélice transmembranaire ne supporte aucune modification en tryptophane, suggérant que la totalité de l'hélice est entourée par d'autres segments transmembranaires (Sharp, et al. 1995b). Les premières preuves directes de l'interaction entre MotA et MotB ont été obtenues par la recherche de mutants suppresseurs. La majorité des mutations suppressives de mutants ponctuels de MotB se trouvent au niveau du ST4 et de la boucle cytoplasmique de MotA (Garza, et al. 1996a; Garza, et al. 1995). De manière réciproque, des mutants de la protéine MotA sont supprimés par des mutations de MotB (Garza, et al. 1996b). Ces travaux ont permis de montrer que l'hélice de MotB interagit avec les ST3 et ST4 de MotA et que des résidus localisés dans le domaine périplasmique de MotB (résidus 136-138) interagissent avec la partie périplasmique de l'hélice transmembranaire et la boucle périplasmique de MotA (Garza, et al. 1996b). L'interaction entre ces deux protéines a été confirmée par une approche biochimique. La protéine MotA co-immunoprécipite avec la protéine MotB et réciproquement la protéine MotB co-immunoprécipite la protéine MotA (Tang, et al. 1996).

Une étude par mutagenèse systématique en résidus cystéine des résidus du segment transmembranaire de la protéine MotB a apporté de nombreuses informations à la fois sur l'organisation et sur les changements conformationnels de la protéine MotB au sein du complexe (Braun and Blair 2001). Cette étude montre que les hélices du dimère de MotB sont dans deux conformations différentes, les deux hélices semblant tourner d'un angle  $110^\circ$  entre deux positions stables. De plus le résidu aspartate 32 n'est pas à l'interface des deux hélices, suggérant ainsi qu'il n'y aurait pas un canal central mais deux canaux distincts et symétriques.



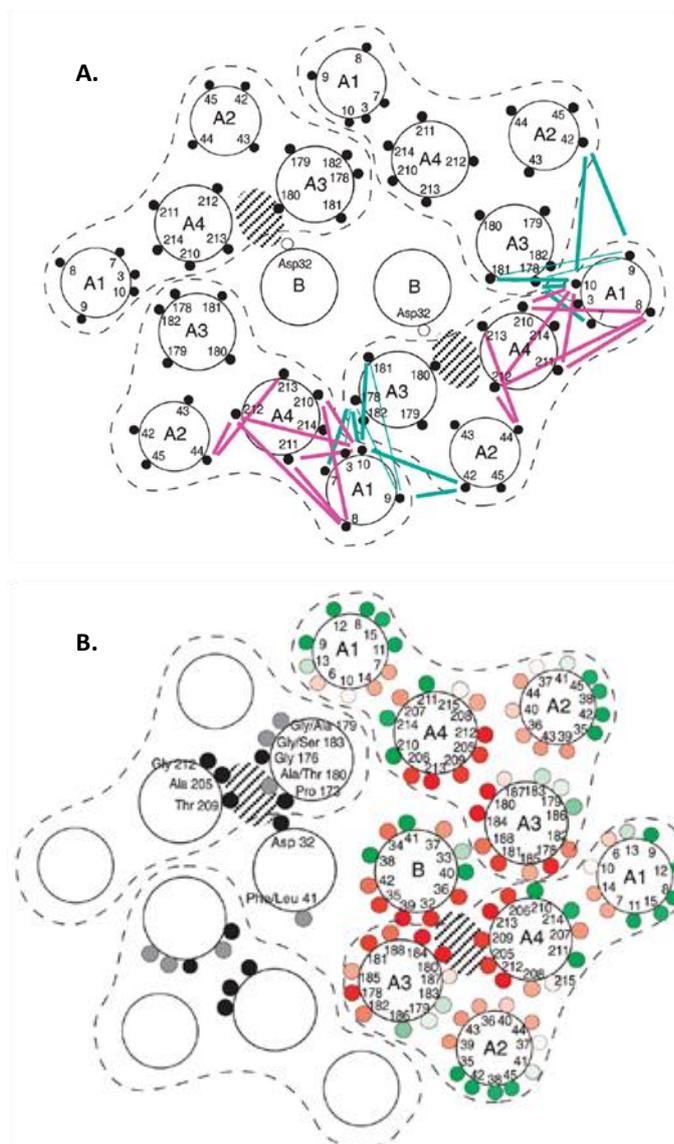
**Figure 2-39** : Les deux ST du dimère de MotB sont représentés en projection à partir du cytoplasme. Les cercles hachurés représentent les résidus pour lesquels la mutation en cystéine provoque la formation de plus de 30% d'homodimères après traitement avec un agent oxydant. La flèche indique la modification des interactions au sein des hélices du dimère provoquée par la rotation du complexe MotAB. Le demi-cercle pointillé indique la position du canal ionique. D'après (Braun and Blair 2001).

Au delà de la régulation des changements conformationnels de MotB, l'aspartate 32 semble également réguler des changements conformationnels au niveau de MotA (Kojima and Blair 2001). Par protéolyse ménagée du complexe MotA-B reconstitué dans des

protéoliposomes, Kojima et Blair ont mis en évidence une différence de profil de dégradation de MotA lorsque MotB est ou non muté sur son aspartate 32 (Kojima and Blair 2004b).

Malgré la purification et la reconstitution dans des protéoliposomes de complexes MotA-B fonctionnels, les tentatives d'analyses structurales du complexe sont infructueuses. Afin d'organiser les 18 segments transmembranaires du complexe minimal les uns par rapport aux autres, la mutagenèse systématique des résidus des segments transmembranaires en cystéine est une alternative efficace. Nous venons de voir, dans le cas de MotB, que cette approche a également fourni des informations sur les changements conformationnels de la protéine.

Dans le cas de MotA, les résidus des segments transmembranaires 3 (résidus 173 à 181) et 4 (résidus 210 à 214) ont été mutés de manière individuelle en cystéine (Braun, et al. 2004). Les auteurs ont testé la formation de ponts disulfures pour les différentes combinaisons possibles de protéines mutantes MotA et également MotB. Ce travail a permis de proposer un modèle d'organisation des segments transmembranaires 3 et 4 de MotA ainsi que de l'ancre de MotB. En 2008, Kim *et coll.* ont complété le modèle proposé pour le MotA-MotB en faisant les substitutions des résidus se trouvant sur l'hélice 1 (résidu 3 et résidus 7 à 10) et l'hélice 2 (résidus 42 à 45) de MotA en cystéine. En combinant avec les mutants utilisés par Braun *et coll.* 2004, ils ont pu localiser l'emplacement des hélices 1 et 2 de MotA dans le modèle proposé par Braun *et coll.* en 2004 (Figure 2-40) (Kim, et al. 2008). Dans leur modèle, les deux molécules de MotB dimérisent et sont localisées au centre du complexe formé par quatre molécules de MotA. Les hélices MotA3 et MotA4 et celle de MotB forment la paroi extérieure du canal dans la sous-unité. L'hélice MotA1 ne contribue pas à la fonction du canal à proton directement, mais elle se localise à l'interface entre les deux sous-unités MotA adjacentes. Le complexe pourrait être stabilisé grâce à l'hélice MotA1 et ses interactions entre les sous-unités. Le « cystéine scanning » révèle aussi qu'un résidu peut interagir avec de multiples partenaires. Ceci suggère que MotA est capable de changer de conformation au sein de la membrane pendant la transduction de proton. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus précédemment par protéolyse ménagée (Kojima and Blair 2004b).



**Figure 2-40 : A. Modèle d'organisation du complexe MotA-MotB**

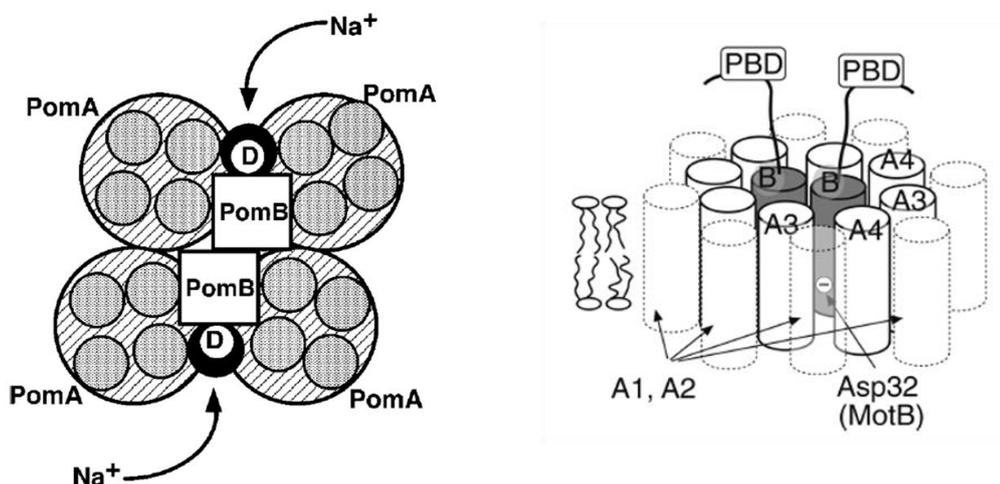
Le schéma représente une vue périplasmique des ST. Les lignes en couleur indiquent les pontages entre les hélices (cyan pour intermoléculaire et magenta pour intramoléculaire). Les données pour MotA3, MotA4 et MotB proviennent des travaux de Braun *et coll.* (Braun, *et al.* 2004) et (Braun and Blair 2001). Les données pour MotA1 et MotA2 proviennent de Kim *et coll.* (Kim, *et al.* 2008).

**B. Effets des substitutions Trp sur les résidus des ST de MotA et MotB.** Les résultats présentés dans ce schéma proviennent des travaux de Sharp *et coll.* (Sharp, *et al.* 1995a; Sharp, *et al.* 1995b). Les mutations permises en tryptophane sont colorées en vert, l'intensité de la couleur est proportionnelle à la mobilité des cellules. Les mutations abolissant la mobilité du flagelle sont en rouge, l'intensité de la couleur reflète la dominance de la mutation (la capacité de la protéine mutante à empêcher la mobilité dans une cellule exprimant le gène sauvage). A gauche (repères noirs et gris) la position des résidus conservés chez MotA et MotB. D'après (Kim, *et al.* 2008).

Le modèle d'organisation des hélices du complexe MotA-B est en accord avec les résultats préalables obtenus par Sharp *et coll.* en 1995 (a et b). Les résidus provoquant un phénotype mutant lorsqu'ils sont substitués en tryptophane sont localisés au niveau des interfaces entre hélices (Sharp, *et al.* 1995a; Sharp, *et al.* 1995b).

Nous avons vu que les ST3 et ST4 de MotA et ST de MotB contiennent des séquences conservées (Cascales, *et al.* 2001; Nguyen and Saier 1996). Il est intéressant de noter que les résidus conservés se trouvent à des endroits clés dans le modèle d'arrangement du moteur MotA-B proposé: au niveau des interfaces entre hélices au niveau du canal ionique putatif. Dans le cas des flagelles polaires des bactéries marines, le complexe PomA-B a été

reconstitué dans des liposomes et visualisé par microscopie électronique. Les auteurs distinguent deux domaines extra-membranaires: une structure d'environ 70Å disparaissant lorsque PomB est déléetée de ses 170 derniers résidus, et de l'autre coté de la membrane un domaine plus court. (Yonekura, et al. 2006).

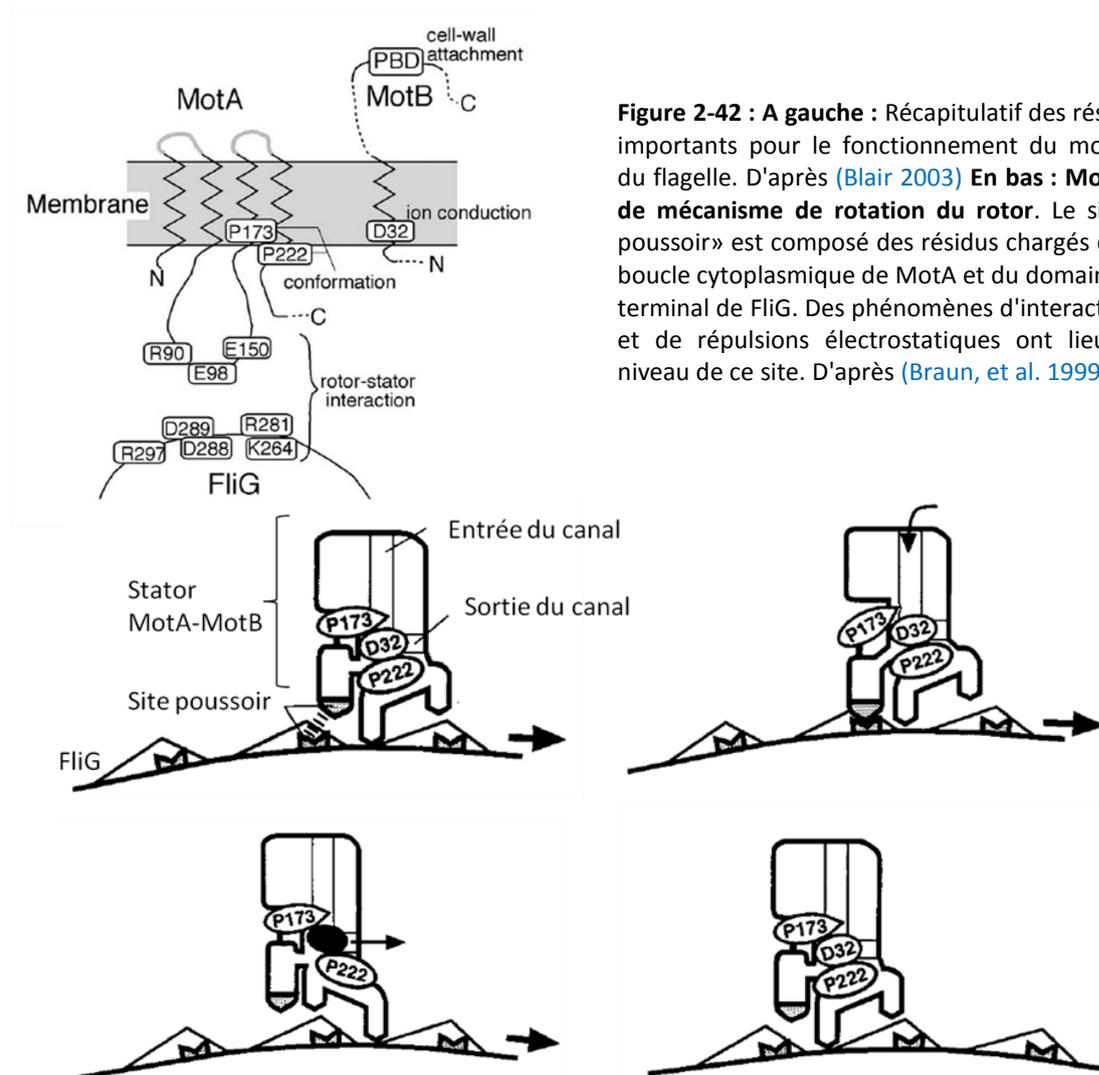


**Figure 2-41 : A gauche : Modèle de moteur formé par PomA-PomB.** Le cercle noir représente les deux canaux formés par 4PomA + 2PomB. Le seul résidu ionisable qui est impliqué dans la fixation de  $\text{Na}^+$  – Aspartate 24 est indiqué. D’après (Yorimitsu, et al. 2004).

**A droite : Modèle de moteur formé par MotA-MotB.** Le résidu D32 qui serait impliqué dans la fixation du proton est indiqué. Les domaines d’interaction avec peptidoglycane (PBD) sont indiqués. D’après (Braun and Blair 2001; Kim, et al. 2008).

L’assemblage du moteur est dynamique. Divers arguments ont été publiés : en 2006, en utilisant l’approche de « single molecule », Leake *et coll.* ont marqué MotB avec la GFP en créant une molécule fonctionnelle. A l’aide des techniques de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) et FLIP (fluorescence loss in photobleaching), les auteurs ont pu montrer la dynamique d’intégration et de désintégration de 22 copies de MotB pendant le fonctionnement du moteur du flagelle (Leake, et al. 2006). Les travaux effectués chez *Shewanella oneidensis MR-1* et *Vibrio Alginolyticus* montrent que la composition du moteur dans le flagelle polaire unique pourrait varier en fonction de la concentration de  $\text{Na}^+$ . Chez *Shewanella oneidensis MR-1*, les unités MotA-B et PomA-B peuvent s’intégrer au même flagelle. Ceci a été démontré par la co-localisation des 2 complexes au flagelle polaire. Quand la concentration en  $\text{Na}^+$  augmente, le complexe MotA-B se dissocie du flagelle, et il est remplacé par le complexe PomA-B (Thormann and Paulick 2010).

## 6. MECANISME DE ROTATION DU FLAGELLE



De nombreuses études ont permis de proposer un modèle d'organisation des composants. Les résidus clés intervenant dans l'utilisation du gradient ionique ou dans les changements conformationnels du moteur sont connus. Cependant, le mécanisme par lequel ce gradient est couplé à la rotation du flagelle reste mal connu. Des revues discutent de différents modèles (Berry 2000; Berry and Armitage 1999; Kojima and Blair 2004a; Schmitt 2003; Walz and Caplan 2000). Nous aborderons uniquement les principes communs de ces modèles. La rotation du flagelle semble provoquée par des changements conformationnels cycliques au niveau du stator. L'alternance entre deux états serait liée à la protonation et la déprotonation de l'aspartate 32 de MotB ainsi qu'aux contraintes appliquées sur les prolines 173 et 222 de

MotA. Ces changements conformationnels pourraient également réguler l'accès de l'aspartate 32 pour assurer l'entrée de proton côté périplasmique et la sortie de proton côté cytoplasmique. Les changements conformationnels au niveau du stator pourraient appliquer une force (effet poussoir entraînant la rotation du flagelle) au niveau du rotor et plus particulièrement au niveau de FliG.

## Chapitre I - Partie III : Les colicines

### 1. GENERALITE

Les colicines sont des toxines bactériennes produites par *Escherichia coli* et actives contre les autres souches d'entérobactérie. Chronologiquement, la première colicine a été découverte en 1925 par Gratia. Le nom de colicine a été donné en 1946 par Fredericq et Gratia.

**Table 3-1 : Présentation de colicines des groupes A et B (Tol- et TonB- dépendantes). D'après (Cascales et al. 2007).**

Colicine	Récepteur	Translocation	Activité
<b>Groupe A</b>			
A	BtuB	OmpF, Tol ABQR	Ionophorique
E1	BtuB	TolC, TolAQ	Ionophorique
E2-E7-E8-E9	BtuB	OmpF, Tol ABQR	Dnase
E3-E4-E6	BtuB	OmpF, Tol ABQR	16S RNase
E5	BtuB	OmpF, Tol ABQR	tRNA-(Y-H-N-D) spécifique RNase
K	Tsx	OmpF, OmpA, Tol ABQR	Ionophorique
N	OmpF	OmpF, Tol AQR	Ionophorique
U	OmpA	OmpF, Tol ABQR	Ionophorique
Cloacin DF13	IutA	OmpF, Tol AQR	16S RNase
<b>Groupe B</b>			
B	FepA	TonB-ExbBD	Ionophorique
D	FepA	TonB-ExbBD	tRNA- spécifique RNase
Ia-Ib	Cir	TonB-ExbBD	Ionophorique
M	FhuA	TonB-ExbBD	Inhibition de synthèse de muréine
5-10	Tsx	TolC, TonB-ExbBD	Ionophorique

A ce jour, une trentaine de ces protéines ont été identifiées, selon leur activité toxique, elles sont classées en 2 groupes distincts : les colicines ionophoriques et les colicines enzymatiques. Les colicines ionophoriques ou pore-formatrices dissipent le potentiel de membrane en créant un canal ionique dans la membrane interne des bactéries cibles. La plupart des colicines enzymatiques sont endonucléasiques. Une fois entrées dans la cellule cible, certaines colicines nucléasiques vont dégrader l'ADN de façon non spécifique; d'autres vont cliver l'ARN 16s ribosomal ou les ARNt et ainsi inhiber la synthèse protéique (Devanathan and Postle 2007; James, et al. 1996). La colicine M est la seule colicine découverte à ce jour qui hydrolyse la liaison ester entre la pyrophosphate et l'undecaprenol de

la molécule l'undecaprenyl pyrophosphatidyl MurNAc(-pentapeptide) GlcNAc (le lipide II) (El Ghachi, et al. 2006), pour inhiber la synthèse de peptidoglycane et l'antigène-O du LPS (Braun, et al. 2002; Harkness and Braun 1989).

Les colicines peuvent être divisées en deux groupes selon le système de translocation qu'elles utilisent :

Le Groupe A – Tol-dépendent

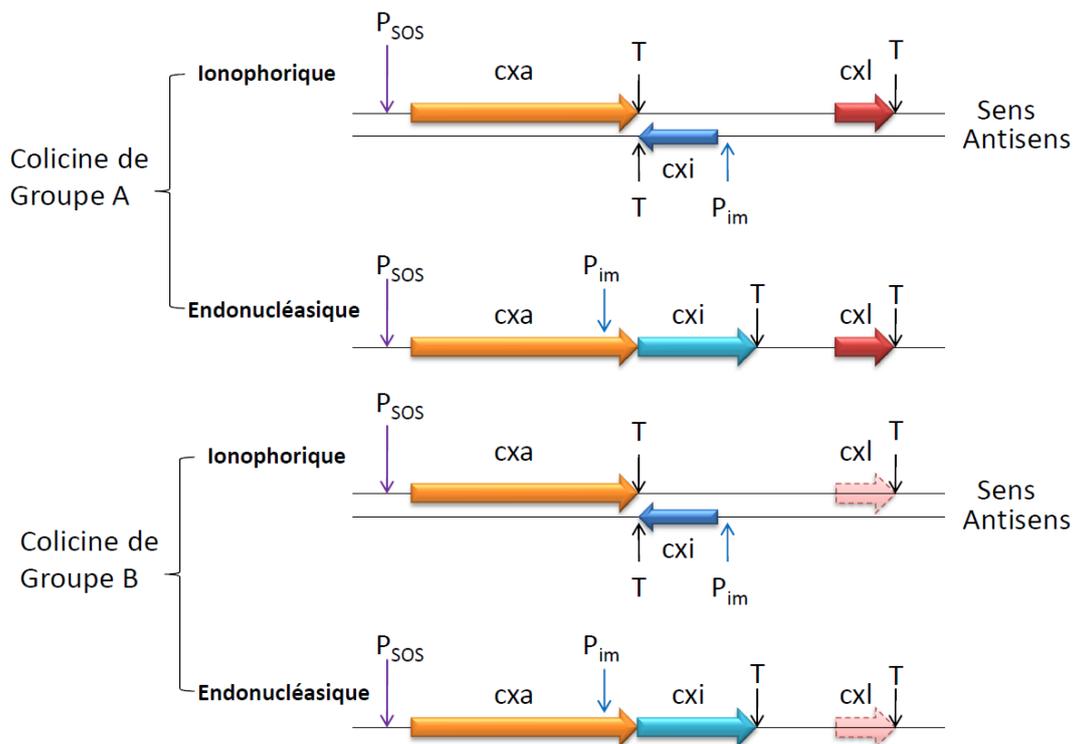
Le groupe B – TonB-dépendent (Table 3-1).

L'utilisation de l'un ou l'autre de ces systèmes de translocation est dictée par la présence de séquences consensus localisées au niveau de la région N-terminale des colicines (Cascales, et al. 2007; Devanathan and Postle 2007; Gokce, et al. 2000; Ogierman and Braun 2003; Pommier, et al. 2005).

Le rôle des colicines serait de contrôler l'intensité de la population bactérienne et aider la bactérie productrice à survivre et à conquérir une niche écologique dans des conditions de stress environnementaux. La colicine permettrait également aux souches sécrétrices de préserver leur habitat intestinal, ce qui aurait des conséquences très bénéfiques pour l'hôte. Ainsi, une étude a démontré que la présence de colicines dans le colon réduirait la fréquence d'apparition de un cancer colorectal (Bures, et al. 1986). Depuis quelques années, les colicines tout comme leurs cousines, les microcines et les pesticines sont utilisées pour élaborer des nouveaux agents antibactériens. De nombreux essais ont été réalisés afin de construire des souches probiotiques produisant naturellement des bactériocines (y compris des colicines) afin de substituer les antibiotiques dans les élevages. Certaines colicines ont montré des effets anticancéreux, notamment la colicine E3, colicine E1 (Smarda, et al. 2001) et la colicine A (Smarda, et al. 1978). Des essais cliniques ont néanmoins montré que cet effet anticancéreux était plus marquant sur les cellules cancéreuses animales que sur les cellules cancéreuses humaines. En plus de ces effets positifs, les colicines n'ont pas induit de réactions allergiques pendant le traitement chez les animaux. En effet chez les souris et certains autres animaux transplantés par le LP-2 plasmocytoma, le système immunitaire n'a pas été activé lors du traitement par la Colicine A (Farkas-Himsley and Cheung 1976).

## 2. ORGANISATION GENETIQUE

Les gènes codant pour les colicines sont portés par des plasmides colicinogéniques. Sur ces plasmides se trouve le gène *cx*a qui code pour la colicine (*cx*a pour colicin x activity), le gène *cx*i qui code pour la protéine d'immunité (*cx*i pour colicin x immunity), et enfin le gène *cx*l qui code pour la protéine de lyse (*cx*l pour colicin x lysis). Les gènes *cx*a et *cx*l sont organisés en opéron dont l'expression est régulée par les fonctions SOS de la bactérie (promoteur SOS :  $P_{SOS}$ ) qui sont activées quand la bactérie se trouve dans des conditions de stress environnemental (eg : carence en nutriment, lésion d'ADN causé par les UV ou des agents mutagènes) (Figure 3-2). La portion d'ADN entre les gènes *cx*a et *cx*l est occupée par



**Figure 3-2 : Organisation génétique des colicines.** Cxa : colicin x activity; cxi : colicin x immunity ; cxl : colicin x lysis ;  $P_{SOS}$  : promoteur SOS; T : terminateur  $P_{im}$  : Promoteur constitutif de la protéine d'immunité

le gène codant pour la protéine d'immunité qui possède son propre promoteur  $P_{im}$ .  $P_{im}$  assure une production basale de la protéine d'immunité afin de permettre une protection efficace de la bactérie contre l'action de la colicine produite. Dans le cas des colicines ionophoriques, le gène *cx*i se localise dans la zone intergénique du brin complémentaire (Lloubes, et al. 1984). Dans le cas des colicines endonucléasiques, le gène de la protéine d'immunité se localise en

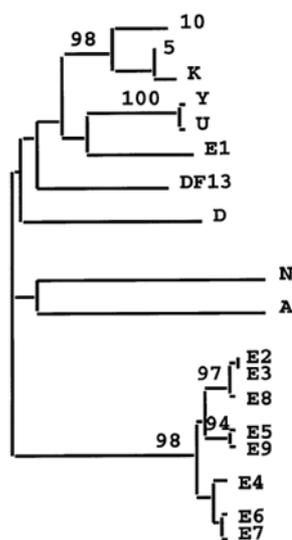
aval du gène *cx*a ce qui lui permet en plus de son propre promoteur, d'être également sous le contrôle du promoteur  $P_{\text{sos}}$  de l'opéron formé par les gènes *cx*a et *cx*l.

Une fois la synthèse des colicines déclenchée, les molécules synthétisées s'accumulent dans le cytoplasme. Les colicines endonucléasiques sont produites sous forme d'hétérodimères associés à leur protéine d'immunité. Cette dernière va empêcher la dégradation de l'ADN et l'ARN de la cellule productrice. Contrairement aux colicines endonucléasiques, la cible des colicines ionophoriques ne se trouve pas dans le cytoplasme mais dans la membrane interne. Ces colicines ne sont pas actives dans le cytoplasme et sont produites sous forme monomérique.

### 3. LE MECANISME D'IMPORTATION DES COLICINES

#### 3.1. LA LIBERATION DE LA COLICINE : PROTEINE DE LYSE

Les colicines ne possèdent aucune « séquence signal » dédiée à leur sécrétion. La



**Figure 3-3 : Alignement multiple avec des séquences des différentes protéines de lyse**

libération des colicines fait appel à un mécanisme atypique. Pour la plupart des colicines du groupe A et certaines colicines du groupe B, la libération dans le milieu extra-cellulaire est commandée par une petite lipoprotéine de 27 à 35 résidus (Cavard 1997; Cavard, et al. 1987; Oudega, et al. 1993) appelée protéine de lyse ou BRP (bacteriocin release protein). Elle est codée par le gène *cx*l (colicin x lysis) précédemment décrit. Les protéines de lyse présentent une forte homologie entre elles. (Figure 3-3). Voici un petit arbre phylogénétique des protéines de lyse des différentes colicines adaptées de Riley *et coll.* (Riley, et al. 2000). D'après cet arbre, les protéines de lyse sont regroupées en deux grands groupes : celui des colicines ionophoriques et celui des colicines

enzymatiques. Il existe néanmoins deux exceptions : la séquence primaire de la protéine de lyse des colicines D (tRNAsique) et DF13 (rRNAsique) est plus proche de celle des colicines ionophoriques.

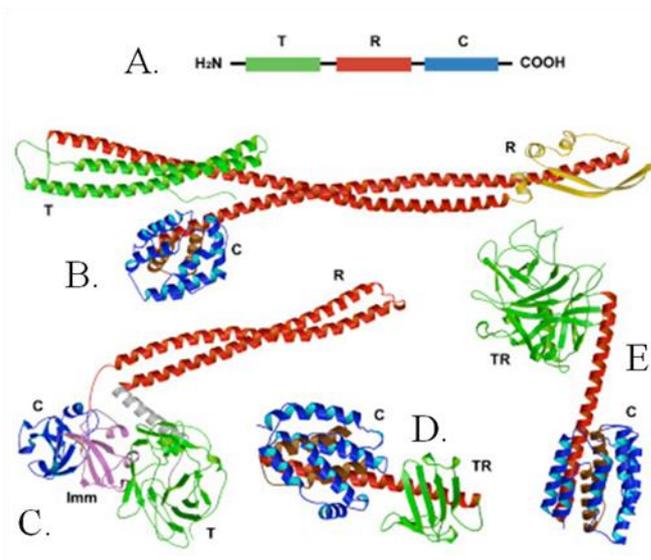
Dans une cellule dépourvue du gène *cxl*, les colicines ne sont pas libérées spontanément et demeurent dans le cytoplasme jusqu'à la mort de la bactérie. Comme cela a été mentionné au préalable, l'expression du gène codant pour la protéine de lyse est sous le contrôle du promoteur de l'opéron colicine. La quantité de protéine de lyse synthétisée après induction est comparable à la quantité de protéine Lpp présente dans la cellule (Cavard, et al. 1989). Les protéines de lyse des différentes colicines sont facilement échangeables entre elles, ce qui laisse sous-entendre un mode d'action non spécifique. En effet, la protéine de lyse augmente la perméabilité de l'enveloppe bactérienne et conduit à la lyse de la bactérie (Bénédicti and Géli 1996). Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer le mode d'action des protéines de lyse. L'une d'elle propose que la protéine de lyse forme des pores dans les membranes interne et externe de la bactérie permettant ainsi le passage des colicines accumulées dans le cytoplasme (De Graaf and Oudega 1986; van der Wal, et al. 1995). Le peptide signal hydrophobe des protéines de lyse inséré dans les membranes serait à l'origine de la formation des pores par les protéines de lyse et provoquerait l'activation d'OmpLA pour perméabiliser la membrane externe (Cavard, et al. 1987). La protéine OmpLA (Outer membrane phospholipase A) déstabiliserait ensuite la membrane externe de la bactérie, ce qui permettrait par la suite la libération des colicines dans le milieu extracellulaire. Pour étayer cette hypothèse, il a été montré que dans une souche dépourvue d'OmpLA, la colicine n'était plus libérée par la protéine de lyse (Pugsley and Schwartz 1984). Une autre hypothèse suppose que la libération des colicines se fait en deux étapes. Lors d'une première étape, la colicine passerait du cytoplasme vers le périplasme. Cette étape nécessiterait l'action de la protéine de lyse (Cavard 2004). Une fois la colicine parvenue dans le périplasme, plusieurs mécanismes participeraient à la déstabilisation de la membrane externe. Ainsi, la forme périplasmique de la colicine A pourrait interagir avec les protéines du système Tol, et provoquer l'apparition d'un phénotype similaire à celui d'un mutant *tol*. Ce phénotype se traduit par la déstabilisation partielle de la membrane externe, la formation de vésicules contenant la colicine A et la protéine de lyse (Cavard 2004). La déstabilisation de la membrane externe serait totale après l'activation d'OmpLA. Elle provoquerait la lyse cellulaire (Pugsley and Schwartz 1984) et la libération massive de la colicine dans le milieu extracellulaire.

3.2. INFECTION D'UNE CELLULE SENSIBLE PAR LA COLICINE

3.2.1. ORGANISATION MOLECULAIRE DES COLICINES

L'isolement et la caractérisation de nombreuses souches d'*Escherichia coli* mutées, insensibles aux colicines ont permis de dissocier le mode d'action de ces toxines en plusieurs étapes et de montrer que chaque étape faisait intervenir un domaine distinct de la protéine. Les structures tridimensionnelles des colicines Ia, E3 obtenues par cristallographie aux rayons X, montrent des protéines allongées organisées en 3 domaines distincts (Soelaiman, et al. 2001; Wiener, et al. 1997). Chaque domaine est responsable d'une étape dans le mode d'action des colicines :

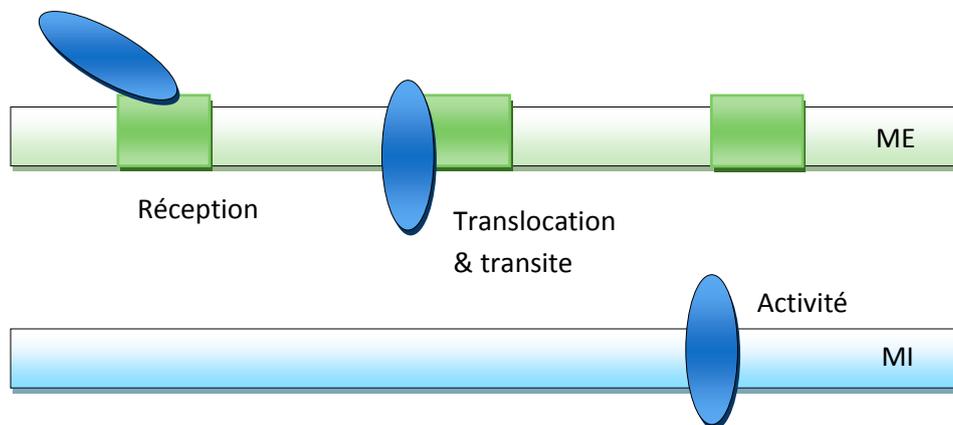
- Le domaine central permet aux colicines de se fixer sur un récepteur localisé à la surface des bactéries cibles.
- Le domaine N-terminal est impliqué dans l'étape de translocation à travers la paroi bactérienne
- Le domaine C-terminal porte l'activité létale.



**Figure 3-4 : Organisation en domaines des colicines** D'après (Zakharov, et al. 2004b).  
 A. organisation en domaine des Colicines. *T* : translocation *R* : réception *C* : activité  
 B. colicine Ia (Wiener et al. 1997)  
 C. complexe colicine E3-imm (imm : la protéine d'immunité) (Soelaiman et al. 2001)  
 D. colicine N (Vetter et al. 1998)  
 E. colicine B (Hilsenbeck et al. 2004)

### 3.2.2. LE MODE D'ACTION DES COLICINES

Malgré des activités létales variées, les différentes étapes qui permettent aux colicines d'accéder à leur cible présentent de nombreuses similitudes. La première permet à la colicine de se fixer sur la bactérie en interagissant avec un récepteur de membrane externe. La seconde assure la translocation de la colicine à travers la membrane externe et son transit à travers le périplasma de la bactérie. Cette étape nécessite l'assistance de systèmes protéiques bactériens : Tol ou TonB. La dernière étape correspond à l'activité létale exercée par la colicine (ionophorique ou bien enzymatique). Ces différentes étapes sont schématisées dans la figure suivante (Figure 3-5).



**Figure 3-5 : Représentation schématique du mode d'action des colicines.**

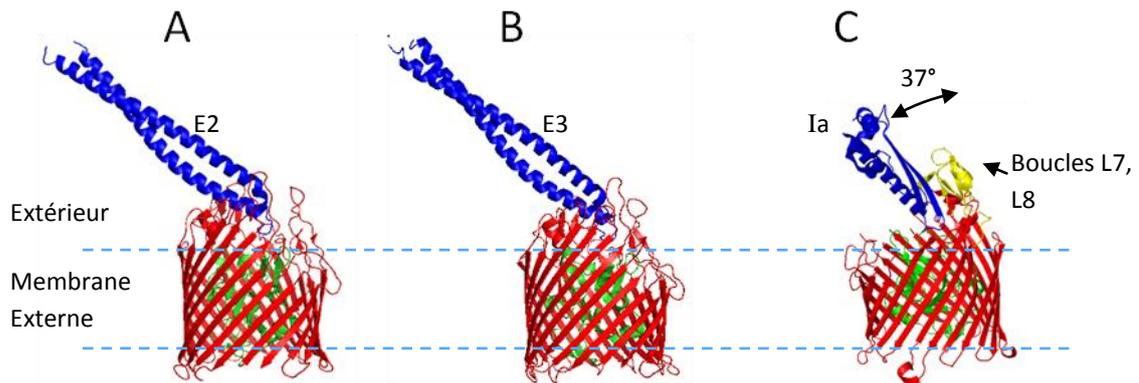
MI : Membrane interne ME : membrane externe

#### 3.2.2.1. RECEPTION

L'étape de réception concerne la fixation de la colicine sur un récepteur de la membrane externe via son domaine de réception. Cette étape est cruciale pour l'infection. L'absence de récepteur ou la présence de certaines mutations dans le domaine récepteur des colicines entraînent une résistance totale de la bactérie aux colicines concernées. Pour les deux groupes de colicines définis par le système de translocation qui utilisent le système TonB ou le système Tol, l'étape de réception est très similaire. Les colicines du groupe A utilisent BtuB (récepteur de la vitamine B12), OmpA (fonction inconnue), Tsx (récepteur de nucléotides), et

les colicines du groupe B utilisent FepA, FhuA (récepteur de sidérophores) ou Cir (récepteur des produits hydrolytiques des sidérophores (Nikaido and Rosenberg 1990))(Table 3-1).

Plusieurs co-cristallisation du domaine de réception d'une colicine et de son récepteur ont été réalisés (Buchanan, et al. 2007; Kurisu, et al. 2003; Sharma, et al. 2007). Les résultats montrent que le domaine réception de la colicine se fixe sur le récepteur avec un angle approximatif de 45°.



**Figure 3-6 :** Représentation des structures en ruban du domaine N-terminal de colicine E2, colicine E3 et colicine Ia (Bleu) avec leur récepteur respectifs (Rouge) BtuB (PDB : 1UJW (A) (Sharma, et al. 2007)) ; BtuB (PDB : 2YSU (B) (Kurisu, et al. 2003)) ; et Cir (PDB : 2HDI (C) (Buchanan, et al. 2007)) respectivement. Le domaine « bouchon » contenant la « TonB-box » des récepteurs est représenté en vert. La structure de plusieurs boucles extracellulaires du récepteur Cir n'a pas pu être déterminée due à la grande mobilité de ces boucles, les boucles L7 et L8 sont colorées en jaune.

Les colicines E2, E3 et Ia se fixent sur des larges boucles du côté extracellulaire du récepteur. Suite à la fixation des colicines, nous distinguons 2 types de changement au niveau du récepteur.

Les colicines E2 et E3 sont deux colicines homologues. La fixation du domaine central des colicines E2 et E3 n'entraîne pas de grands changements conformationnels au sein du récepteur BtuB contrairement à la fixation de la cobalamine, son substrat naturel. En effet, la fixation de la cobalamine sur BtuB entraîne une modification du récepteur. Elle se répercute au niveau du périplasma en induisant la rotation du domaine bouchon qui permet l'interaction entre la « TonB box » de BtuB (voir section 2.2.TonB) et la protéine TonB.

En opposition aux colicines E2 et E3 du groupe A, la liaison entre la colicine Ia et son récepteur provoque un changement conformationnel (rotation) des boucles L7 et L8 (en jaune dans la [figure 3-6](#)) de Cir de 37°.

La présence ou l'absence de changements conformationnels au sein du récepteur après la fixation d'une colicine, reflète une différence notable entre le mode d'action des deux groupes de colicines. Cette différence pourrait expliquer partiellement la nécessité ou non de l'apport d'une source d'énergie pour assurer la translocation des colicines.

Une autre différence remarquable est que les colicines du groupe A ont besoin d'un récepteur BtuB et d'un co-récepteur, généralement OmpF, pour franchir la membrane externe. Par contre, pour les colicines du groupe B, aucun co-récepteur n'a été isolé à ce jour. Cependant, des travaux récents ont montré qu'une même protéine, Cir pouvait jouer le rôle de récepteur et de co-récepteur pendant la pénétration de colicine Ia dans la cellule ([Jakes and Finkelstein 2010](#)).

La présence de deux récepteurs n'est pas toujours nécessaire pour permettre aux certaines colicines ionophoriques du groupe A de traverser la membrane externe. En effet, le récepteur BtuB peut être contourné dans des conditions de basse force d'ionique par la colicine A ([Cavard and Lazdunski 1981](#)).

La fixation d'une colicine sur son récepteur induit le dépliement et la dénaturation partielle de la colicine ([Benedetti, et al. 1992](#); [Duche, et al. 1994a](#); [Zakharov, et al. 2008](#)). Le dépliement de la colicine pourrait faciliter son passage à travers le pore des porines tels OmpF ou OmpC (voir section suivante).

### 3.2.2.2. TRANSLOCATION ET TRANSIT DANS LE PERIPLASME

---

#### A. COLICINES DU GROUPE A

---

##### A.1. CO-RECEPTION PAR CO-RECEPTEUR DE LA MEMBRANE EXTERNE

La plupart des colicines de groupe A ont besoin d'un corécepteur pour initier leur translocation à travers la membrane externe :

Les colicines A, E2-E9, U et Y utilisent OmpF.

La colicine E1 utilise TolC.

La colicine N n'utilise que la protéine OmpF comme protéine de membrane externe. On peut néanmoins supposer qu'elle puisse utiliser cette protéine comme récepteur et co-récepteur, comme la colicine Ia, du groupe B, le fait avec son récepteur Cir.

Contrairement aux colicines ionophoriques qui sont sécrétées sous forme monomérique, les colicines endonucléasiques sont libérées dans le milieu extracellulaire complexées à leurs protéines d'immunité. C'est donc le complexe colicine endonucléasique – protéine d'immunité qui se fixe sur son récepteur. Selon des études menées sur la colicine E9 (une colicine DNasique) par Housden *et coll.*, la fixation de la colicine sur son récepteur permet un dépliement du domaine N-terminal de la protéine qui recrute ensuite la porine OmpF. Ceci permet la formation du complexe Colicine E9-BtuB-OmpF (Housden, *et al.* 2005). Ce complexe a été appelé « translocon ». La dénaturation du domaine N-terminal semble être un pré requis pour la translocation à travers la membrane externe. Le domaine N-terminal a un diamètre (environ 20-35 Å) qui est supérieur à celui du pore formé par OmpF (11-12Å). Pour le passage du domaine C-terminal, le même processus pourrait avoir lieu. Il a été démontré que la libération de la protéine d'immunité ImE3 entraîne un dépliement partiel du domaine C-terminal de la colicine E3 qui pourrait dès lors interagir avec un des trois canaux d'OmpF (Zakharov, *et al.* 2008; Zakharov, *et al.* 2006). La libération de la protéine d'immunité surviendrait assez tardivement. En effet, la protéine d'immunité est toujours fixée sur le domaine d'activité de la colicine endonucléasique quand le domaine N-terminal de la colicine est transporté dans le périplasme à travers la porine OmpF. Pour que la protéine d'immunité

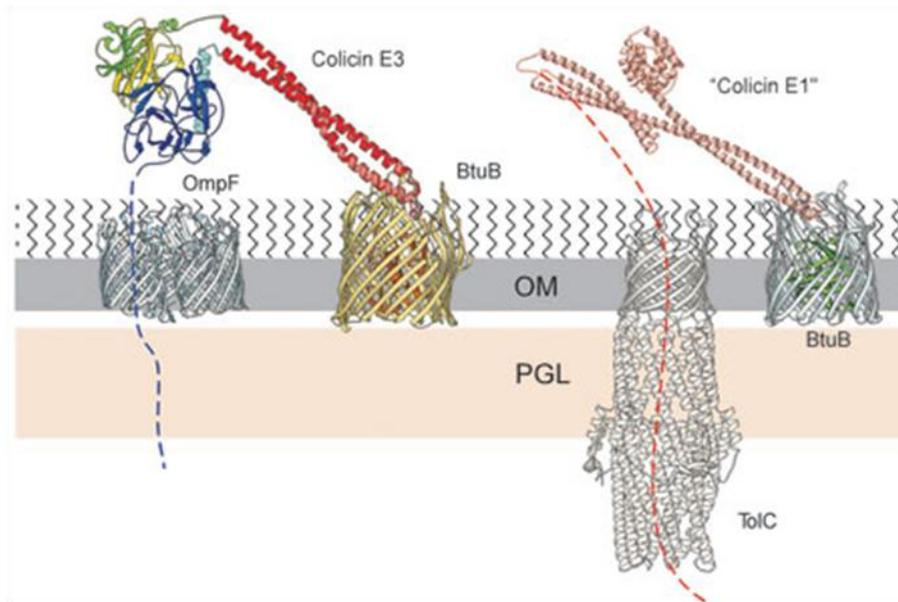
soit libérée, il faut que la colicine interagisse aussi avec les protéines du système Tol (Duche, et al. 2006; Vankemmelbeke, et al. 2009).

De façon assez surprenante, les colicines seraient toujours fixées sur leur récepteur pendant que leur domaine actif agirait sur leur cible. Ceci a été montré pour certaines colicines du groupe A, comme la colicine A (Benedetti, et al. 1992) et la colicine E2 (Duche 2007) et semble être aussi le cas pour la colicine Ia du groupe B (Buchanan, et al. 2007; Wiener, et al. 1997). Les structures tridimensionnelles des colicines E3 et Ia, montrent la présence de longues hélices de 100 Å et 160 Å de long qui relient les domaines N- et C-terminaux au domaine central. La présence de ces hélices dont la longueur avoisine celle de l'enveloppe d'*Escherichia coli* permet d'expliquer comment une colicine peut simultanément être fixée sur son récepteur et exercer son activité létale.

La membrane externe d'*Escherichia coli* possède des protéases qui assurent une protection de la bactérie contre des peptides et des protéines à activité bactéricide. C'est le cas d'OmpT (Cavard and Lazdunski 1990; Vandeputte-Rutten, et al. 2001). En 2007, Masi *et coll.* ont identifié le domaine N-terminal de la colicine E1 comme étant la cible d'OmpT (Masi, et al. 2007). En 2009, des travaux réalisés par Duché *et coll.* ont montré que la protéine OmpT pouvait également dégrader le domaine C-terminal de la colicine E2. Cette dégradation était presque totale si la colicine E2 était dépourvue de sa protéine d'immunité (Duche, et al. 2009). La cinétique du mode d'action des colicines endonucléasiques (15-30minutes) est plus longue que celle des colicines ionophoriques (de l'ordre de la minute) (Duche, et al. 2006; Krone, et al. 1986; Vankemmelbeke, et al. 2005). De ce fait, la libération tardive de la protéine d'immunité semble nécessaire pour assurer une protection efficace du domaine C-terminal de la colicine E2 contre OmpT et lui permettre ainsi d'exercer son activité létale.

En résumé, 2 modèles ont été proposés pour expliquer les translocations des colicines du groupe A à travers la membrane externe :

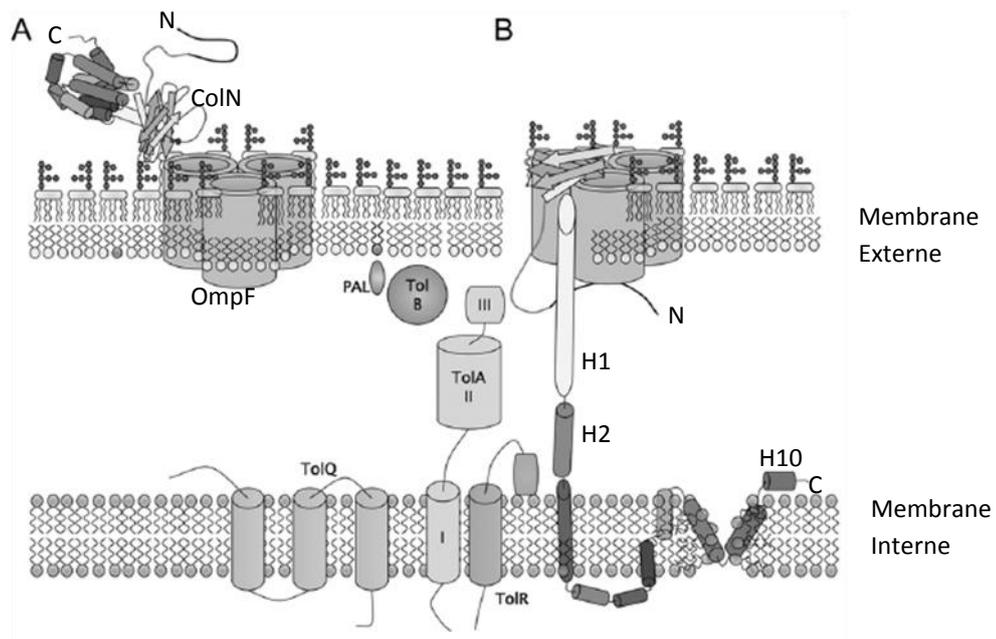
Le premier modèle est établi pour les colicines enzymatiques du groupe A (colicine E2-E9) et la Colicine E1 (ionophorique). Elles utilisent le pore formé par la porine OmpF ou TolC pour la translocation de leur domaine N-terminal (Figure 3-7) (Yamashita, et al. 2008; Zakharov, et al. 2008; Zakharov, et al. 2006).



**Figure 3-7 : Représentation de la translocation des colicines du groupe E1-E9**

A gauche : La Translocation de la colicine E3 à travers la porine OmpF ; à droite : La translocation de la colicine E1 (représentée par la colicine Ia) à travers le corécepteur TolC. D'après (Zakharov, et al. 2004a). OM : outer membrane (membrane externe) PGL : peptidoglycan layer (peptidoglycane)

Le deuxième modèle a été proposé en se basant sur les études effectuées sur la colicine N. La réception et la translocation de colicine N ne dépendent qu'une seule protéine : la porine OmpF (el Kouhen, et al. 1993). Il a été montré que la colicine N n'utiliserait pas le pore de la porine, mais qu'elle franchirait la membrane externe en déplaçant les molécules de LPS le long de la porine (Baboolal, et al. 2008; Bainbridge, et al. 1998). Toutefois avant de franchir la membrane externe, les domaines N et C terminaux doivent se déplier. La forme dépliée du domaine C-terminal de colicine N passerait par le sillon formé par deux monomères d'OmpF. Les auteurs ont aussi montré que l'hélice 1 du domaine C-terminal de colicine N interagit fortement avec la porine OmpF et serait impliquée dans la formation du complexe colicine-OmpF (Figure 3-8) (Baboolal, et al. 2008).



**Figure 3-9 : Modèle de la translocation et du mode d'action de la colicine N. D'après (Baboolal, et al. 2008).** A : Fixation de la colicine N sur un des monomères de la porine OmpF trimérique B : Translocation des domaines N et C terminaux de la colicine le long d'OmpF à travers la membrane externe. Le domaine C-terminal forme un canal ionique dans la membrane interne.

\*\*\*\*\*

Après avoir traversé la membrane externe, le domaine N-terminal des colicines transite le long du périplasma. Ce processus nécessite la présence soit des protéines du système Tol soit des protéines du système TonB. La plupart des colicines Tol-dépendantes ont besoin de la totalité des protéines du système Tol : les protéines TolABQR. Certaines sont moins exigeantes : la colicine E1 n'a besoin que de TolA et TolQ ; la colicine N n'a pas besoin de TolB.

Les régions impliquées dans l'interaction avec les protéines TolA, B et R ont été identifiées par des expériences de mutagenèse dirigée et de délétions au niveau du domaine N-terminal des colicines du groupe A (Figure 3-8).

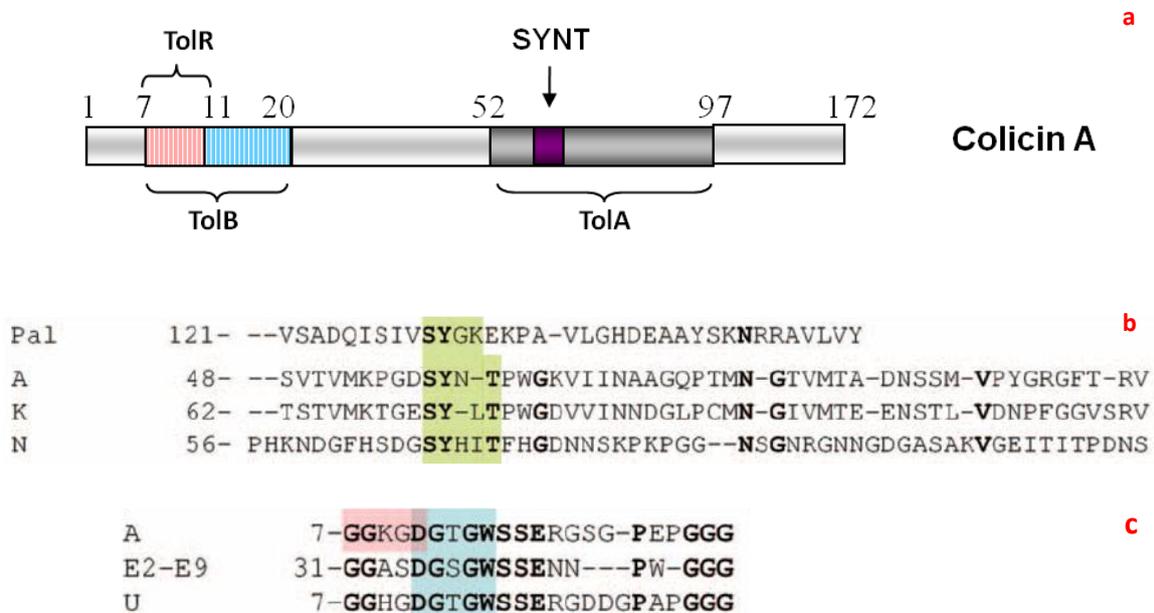


Figure 3-8 : a. Représentation schématique du domaine N-terminal de la colicine A et des 3 séquences d'interaction avec les protéines du système Tol ; b. Alignement des séquences protéiques des régions d'interaction avec TolA de Pa1, Colicine A, Colicine K, Colicine N ; c. Alignement des séquences protéiques des régions d'interaction avec TolB de Colicine A, Colicine E2-E9, Colicine U. D'après (Cascales, et al. 2007). Pour la partie b et c, Cadre en vert : région conservée d'interaction avec TolA (TolA box) ; Cadre rose : région d'interaction de TolR ; la cadre cyan : région conservée d'interaction avec TolB (TolB box).

## A.2. INTERACTION AVEC TolB

Des expériences de co-immunoprécipitation et pontage *in vitro* ont pu prouver l'interaction entre TolB et les domaines de translocation des colicines A, E3, et E7 (Bouveret, et al. 1997; Bouveret, et al. 1998; Cheng, et al. 2006). L'interaction entre le domaine D2  $\beta$ -propeller de TolB et le domaine N-terminal de la colicine E9 a été mise en évidence en utilisant la technique du double hybride en levure (Carr, et al. 2000). La structure tridimensionnelle de TolB complexée au domaine N-terminal de la ColE9 montre que le domaine N-terminal de la ColE9 se lie à la cavité centrale du domaine D2, le domaine  $\beta$ -propeller de TolB (Loftus, et al. 2006) (code des fichiers PDB : 2IVZ Loftus 2006 ; 1C5K Carr 2000). Il est important de rappeler que ce domaine D2 se lie également à la lipoprotéine Pal, expliquant ainsi la compétition entre les complexes TolB-colicine E3 ou TolB-colicine E9 et TolB-Pal (Loftus, et al. 2006). La structure cristalline du domaine N-terminal de la colicine A complexé à TolB a également été obtenue mais que très récemment par Zhang *et coll.* (Zhang, et al 2010). Les auteurs ont montré que l'extrémité N-terminal de la colicine A (incluant la « boîte TolB ») forme une épingle qui pénètre dans la cavité centrale du domaine D2 de TolB comme c'était la cas pour la colicine E9. Cependant, les modes d'interaction des colicines A et E9 avec TolB semblent différents si l'on se réfère à leur affinité respective pour TolB et à la longueur de la région impliqués dans l'interaction (Zhang, et al. 2010).

Les constantes de dissociation (Kd) de TolB avec les différents domaines N-terminaux (ou les colicines entières) déterminées par ITC ou SPR sont citées dans le [tableau 3.2](#). Les valeurs des Kd sont de l'ordre du  $\mu\text{M}$ . La colicine ionophorique (colicine A) possède une affinité plus faible pour TolB que les colicines enzymatique (E3 et E9). Ceci suggère des modes différents d'interaction entre les colicines et TolB.

En 2009 Bonsor *et coll.* ont mis en évidence par ITC (Isothermal Titration Calorimetry) que le couple colicine E9-TolB possède une constante d'affinité voisine de celle du couple TolB-Pal. La suppression de la région contenant le « TolA-box » de TolB augmente de quatre fois l'intensité de l'interaction entre le domaine N-terminal de la ColE9 et TolB. La production de la protéine TolB délétée des 12 résidus du domaine N-terminal inhibe la libération de la protéine d'immunité de la colicine enzymatique colicine E9. Ces résultats suggèrent que les 12 résidus de l'extrémité N-terminal de TolB sont essentiels pour l'activité toxique de la colicine E9 (Bonsor, et al. 2009).

### A.3. INTERACTION AVEC TOLA

La première preuve directe de l'interaction entre une colicine ionophorique et TolA a été obtenue par la technique d'«overlay» (Benedetti, et al. 1991b). Bénédicti *et coll.* ont pu montrer en transférant la protéine TolA sur une membrane de nitrocellulose que seul le domaine N terminal des colicines A et E1 été capable de se fixer sur la protéine TolA immobilisée. De la même manière, le domaine III de TolA a été identifié comme étant la région responsable de l'interaction avec les colicines A et E1. Des expériences de retard sur gel ont confirmé que TolA était capable de former un complexe avec la colicine A entière ou bien avec son domaine N-terminal purifié (Derouiche, et al. 1997). Un résultat similaire a été obtenu avec la colicin N et le domaine III de TolA (Gokce, et al. 2000; Raggett, et al. 1998). Toujours par la technique d'«overlay», Bouveret *et coll.* ont montré que le complexe TolA-colicine-TolB pouvait exister *in vitro* (Bouveret, et al. 1998).

L'interaction directe entre les colicines endonucléasiques et la protéine TolA n'a jamais pu être mise en évidence bien que ces colicines aient besoin de TolA pour infecter la cellule.

### A.4. INTERACTION AVEC TOLQR

Par des approches de pontage chimique *in vivo* et *in vitro*, l'interaction entre le domaine N-terminal des colicines A et E3 et la protéine TolR a été mise en évidence (Journet, et al. 2001). Cette interaction fait intervenir le domaine périplasmique de TolR et l'extrémité N-terminal des colicines A et E3. Une séquence de fixation de TolR a été définie dans le domaine N-terminal de la colicine A (Figure 3-8).

A ce jour, aucune donnée publiée ne montre une interaction directe entre une colicine et la protéine TolQ. Cependant, des résultats récents obtenus dans notre équipe montrent l'existence d'un complexe co-immunoprécipitable composé de la protéine TolQ et de la colicine K (Barneoud-Arnoulet, et al. 2010b).

En se basant sur la localisation des protéines Tol dans l'enveloppe bactérienne et les constantes d'affinité entre ces protéines Tol et le domaine N-terminal de certaines colicines (Table 3-2) le mécanisme d'importation des colicines pore formatrices, comme la colicine A, à travers l'enveloppe bactérienne se ferait de la façon suivante : le domaine N-terminal de la colicine émergeant de la membrane externe interagirait tout d'abord avec TolB dans le périplasme. L'affinité du domaine N-terminal étant plus forte pour TolA que pour TolB, le complexe TolB-colicine se dissocierait en faveur du complexe TolA-colicine. Cependant

l'affinité d'une colicine pour la protéine TolR est plus faible que pour la protéine TolA. Comment alors le domaine N-terminal peut-il interagir avec la protéine TolR ? Un début de réponse a été apporté par l'observation que l'interaction du domaine N-terminal d'une colicine avec TolA était suivie du clivage d'une partie du domaine C-terminal de TolA (Barneoud et al, résultat non-publié). Ce clivage libérerait le domaine N-terminal de TolA qui pourrait alors interagir avec TolR.

Sous-unité Tol	Ligand	Kd (μM)	Technique	Référence
TolAIII	ColA-T	0,2 à 0,6	SPR	Derouiche, et al. 1997, Hands, et al. 2005
TolAIII	ColE1-T	0,4	SPR	Derouiche, et al. 1997
TolAIII	ColN-T	1	ITC	Raggett, et al. 1998
TolAII-III	ColN-T	1,4	SPR	Raggett, et al. 1998
TolAII-III	ColN	18	ITC	Raggett, et al. 1998
TolB	ColA-T	10/10,5	SPR/ITC	Gokce, et al. 2000
TolB	ColE9	~1	ITC	Gokce, et al. 2000
TolB	ColE9-T	~1	ITC	Loftus, et al. 2006
TolB	ColE9-T	0,08 (+ Ca <sup>2+</sup> )	ITC	Loftus, et al. 2006
TolB	ColE3	0,9	SPR	Hands, et al. 2005
TolB	Pal	0,03	ITC	Loftus, et al. 2006
TolB	Pal	0,09 (+ Ca <sup>2+</sup> )	ITC	Loftus, et al. 2006
TolRII-III	ColA-T	>1000	SPR	Hands, et al. 2005

**Table 3.2 : Constantes d'affinité entre les composants du système Tol et les colicines du groupe A.**

#### A.5. AUTRES COMPOSANTS DU SYSTEME DE TRANSLOCATION DE COLICINE

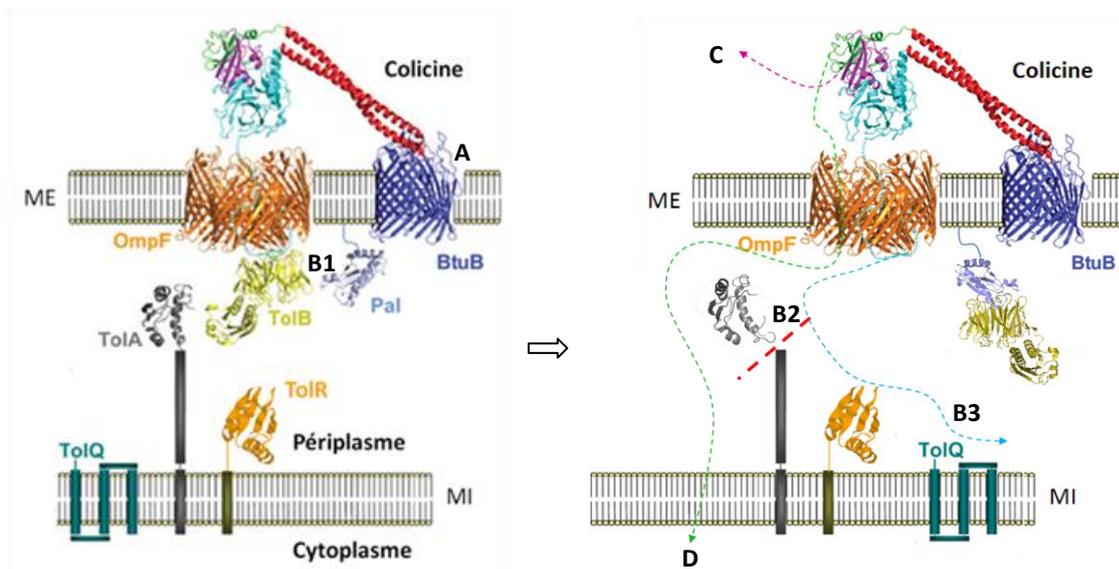
Le franchissement de la membrane interne par les colicines endonucléasiques est un processus méconnu. Cette étape est d'autant plus difficile à concevoir que des résultats antérieurs ont montré que les colicines endonucléasiques sont toujours en interaction avec leur récepteur quand elles exercent leur activité létale dans le cytoplasme de la bactérie cible (Duche 2007). Pour concilier ces deux informations, l'hypothèse d'un clivage du domaine C-terminal des colicines endonucléasiques a été postulé et quelques résultats expérimentaux semblent l'accréditer.

En 2001, la protéine LepB (leader peptidase B) a été identifiée comme étant indispensable à l'activité de la colicine D par de Zamaroczy *et coll.*. Le rôle de LepB serait de cliver le domaine C-terminal de la colicine D. Les auteurs ont montré que la colicine D incubée en présence d'un extrait cellulaire provenant d'une souche surexprimant la protéine LepB subissait le clivage de son domaine C-terminal (de Zamaroczy, *et al.* 2001). En 2005, Shi et collaborateurs mettaient également en évidence le clivage du domaine C-terminal d'une autre colicine RNAsique, la colicine E7 par une protéase périplasmique inconnue. Dans les deux cas, le clivage n'était observé que dans des conditions particulières, en incubant des quantités importantes de toxines, soit avec des extraits de cellules totales obtenus par solubilisation en présence de détergent, soit avec des fractions périplasmiques purifiées et concentrées et après des temps d'incubation pouvant aller jusqu'à 12 heures (Shi, *et al.* 2005).

Plus récemment, l'implication de la protéine FtsH dans le clivage du domaine C-terminal des colicines endonucléasiques a été avancée. Dans cette hypothèse FtsH reconnaîtrait le domaine C-terminal d'une colicine endonucléasique partiellement déplié lors de sa translocation à travers la membrane externe et le cliverait. Cette hypothèse est accréditée par l'observation qu'une souche *ftsH* est toujours sensible aux colicines ionophoriques et à la colicine M mais résistante aux colicines endonucléasiques (Walker, *et al.* 2007). Cependant des résultats différents ont été obtenus au laboratoire où une résistance partielle à la colicine A a été observée sur une souche *ftsH*. (Barnéoud-Arnoulet, résultats non publiés).

- ✓ FtsH est une Zn<sup>2+</sup>-metallo-endoprotéase de la famille AAA (pour « ATPase Associated with various cellular Activities ») qui participe au contrôle qualité du ratio LPS : phospholipide chez *E. coli*. C'est une protéine de la membrane interne. Son mode d'action est très atypique. Elle va « extraire » des protéines mal-pliées de la membrane interne et les détruire. FtsH possède une faible spécificité de clivage, son activité endopeptidase est processive (Ito and Akiyama 2005). FtsH est capable également de dégrader des protéines cytoplasmiques à courte durée de vie comme le facteur transcriptionnel  $\sigma$ 32 (Okuno, *et al.* 2004; Tomoyasu, *et al.* 1995), ou des enzymes clés impliquées dans la synthèse du lipide A comme la protéine LpxC (Ogura, *et al.* 1999). Nous noterons également que de nombreux substrats solubles de FtsH sont codés par des gènes de bactériophages et enfin que FtsH est capable d'auto-protéolyse (pour revue, (Ito and Akiyama 2005)).
- ✓ LepB est un leader peptidase de la membrane interne qui fait partie du système d'export des protéines. Le gène *lepB* est essentiel chez *E. coli* (Sung and Dalbey 1992). C'est une protéase à serine qui utilise la dyade Ser/Lys pour hydrolyser une chaîne polypeptidique (Dalbey, *et al.* 1997). Sa fonction est de cliver la séquence signal des protéines exportées comme OmpA (Wolfe, *et al.* 1982).

Les différentes étapes de la translocation des colicines du groupe A dans l'enveloppe bactérienne sont représentées dans la [figure 3-10](#).



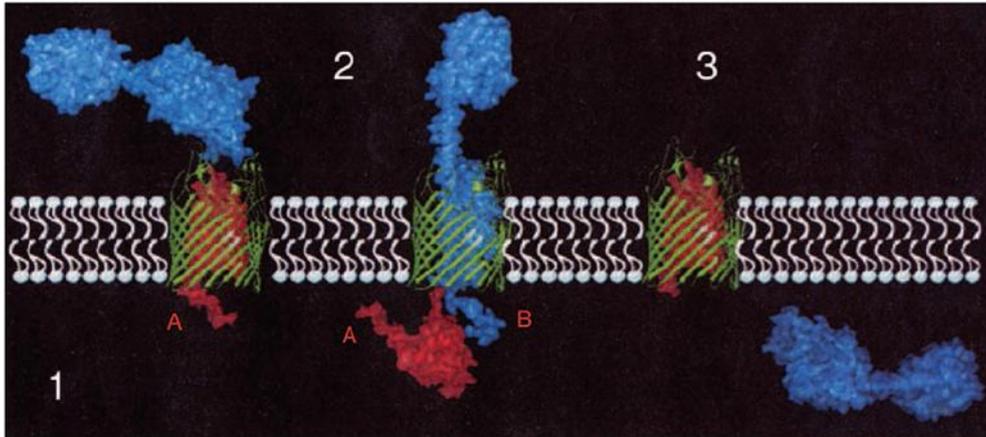
**Figure 3-10 : Modèle de l'importation d'une colicine du groupe A (Colicine E3)**

- A. Réception de la colicine sur son récepteur BtuB et recrutement de la porine OmpF (le corécepteur et translocateur). Suite de la réception, le domaine N-terminal se déplie.
- B. Translocation du domaine N-terminal de la colicine (NT) au travers du translocateur. B1 : Interaction du NT avec TolB ; B2 : Passage de TolB à TolA de NT par affinité ; B3 : Passage de TolA aux protéines TolQR, le passage nécessite probablement une dégradation de la partie C-terminale de TolA
- C. Libération de la protéine d'immunité s'il s'agit d'une colicine endonucléasique
- D. Translocation du domaine C-terminal dans le périplasma. Formation d'un canal ionique dans la membrane interne (colicine ionophorique) ou franchissement de la membrane interne (colicine endonucléasique).

## B. LES COLICINES DU GROUPE B

### B.1. TRANSLOCATION AU TRAVERS DE LA MEMBRANE EXTERNE

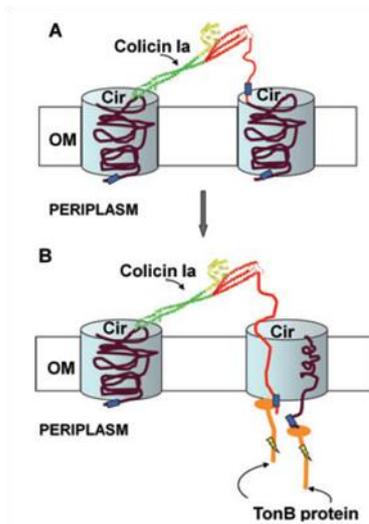
Contrairement aux colicines du groupe A, la plupart de colicines du groupe B (Sauf les colicines 5 et 10) ne dépendent que d'une seule protéine de membrane externe pour leur fixation et leur transport à travers la membrane externe ([Table 3-1](#)) ([Cascales, et al. 2007](#)). Le transport de la colicine à travers la membrane externe serait similaire au transport des sidérophores ([Figure 3-11](#)) ([Hilsenbeck, et al. 2004](#))



**Figure 3-11 : Translocation de la colicine B à travers la membrane externe via le pore de FepA.** 1. Réception de Colicine B (en Bleu indiqué par lettre B) sur FepA (en vert), l'interaction entraîne l'ouverture du pore de FepA par le déplacement du domaine central (en Rouge indiqué par lettre A). 2. La colicine B entre dans le pore et elle est transloquée à travers la membrane externe. 3. Libération de la Colicine B dans le périplasme et fermeture du pore de FepA. D'après (Hilsenbeck, et al. 2004)

Certains résultats récents ne jouent pas en faveur d'une telle hypothèse. En effet, le passage de la Colicine B à travers le pore de FepA nécessiterait au préalable le déplacement du domaine N-terminal (appelé également domaine « bouchon ») de FepA dans le périplasme. D'après les travaux de Smallwood *et coll.*, le domaine bouchon de FepA ne pénètre pas dans le périplasme lors de l'internalisation de la colicine B. Aucune des cystéines introduites par mutagenèse dirigée dans le domaine « bouchon » de FepA ne présente une augmentation d'accessibilité à une sonde fluorescente en présence de colicine B (Smallwood, et al. 2009).

Pour la colicine Ia, un modèle similaire à celui proposé pour le transport des colicines du groupe A à travers la membrane externe a été envisagé. Le récepteur de la colicine Ia, la protéine Cir jouerait à la fois le rôle de récepteur et celui d'initiateur de la translocation. La réception et la translocation d'une colicine Ia nécessiterait ainsi deux protéines Cir (Jakes and Finkelstein 2010). Les colicines 5 et 10 possèdent un récepteur (Tsx) et utilisent TolC pour leur translocation. Ces colicines pourraient utiliser une voie similaire à celle de la colicine E1 pour entrer dans le périplasme.



**Figure 3-12 : Modèle de l'importation de la Colicine la par Cir D'après (Jakes and Finkelstein 2010)**

A. Réception de la colicine la via le premier récepteur Cir, le domaine N terminal (NT) se déplie afin d'interagir avec le deuxième Cir.

B. Suite à l'interaction entre le NT de colicine la et Cir, TonB interagit avec la TonB-box (en rectangle bleu) du domaine « bouchon » de Cir (en rouge foncé) et entraîne l'ouverture du canal de Cir. Le domaine NT de la colicine la se fixe sur une autre protéine TonB via sa TonB-box. TonB importe le NT de colicine la dans le périplasma. L'énergie nécessaire à l'importation est fournie par la PMF schématisée par l'éclair jaune.

## B.2. INTERACTION AVEC TONB

Les colicines de groupe B possèdent une séquence conservée dans leur domaine N-terminal appelé « TonB box ». Ce motif est constitué de 5 acides aminés. Il est aussi présent dans les récepteurs TonB-dépendant (voir aussi le récepteur TonB-dépendant) (Schramm, et al. 1987). Selon l'alignement de séquence, ce motif est inclus dans une séquence consensus de 11 résidus : G- **(D/E)-T-M-(V/T)-V** -X-X-S-T-G où les résidus X sont des résidus hydrophobes. Excepté le cinquième résidu, la valine, les autres résidus ne sont pas strictement conservés (Mora, et al. 2005).

Des mutations ponctuelles dans la « TonB box » inactivent les colicines de groupe B sans pour autant empêcher l'étape de fixation au récepteur. Ce résultat confirme l'importance de la boîte TonB dans l'étape de translocation (Mende and Braun 1990). L'effet de ces mutations sur la colicine B (Mende and Braun 1990) ou sur la colicine D (Mora, et al. 2005) peut être supprimé par des mutations ponctuelles dans la protéine TonB. La région d'interaction de TonB avec les différentes colicines semble variable : les mutations ponctuelles sur TonB qui empêchent l'activité de la colicine D sont sans effets sur la colicine B (Mora, et al. 2005). Ce résultat est d'autant plus surprenant que les colicines B et D partagent 89% d'identité de

séquences (96% pour les 313 premiers résidus (Roos, et al. 1989)) dans la région N-terminal (Riley 1998).

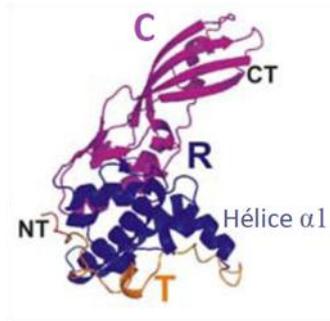
Des modèles d'importation de colicines du groupe B supposent que l'interaction entre la colicine et son récepteur provoque l'émergence du domaine « bouchon » vers le périplasme où il interagirait avec le domaine C-terminal de TonB par l'intermédiaire de sa « TonB box ». Le système ExbBD apporte alors l'énergie nécessaire à TonB pour finir l'expulsion du domaine bouchon. Le domaine « bouchon » une fois expulsé laisserait le champ libre à la colicine pour pénétrer dans le périplasme à travers le pore du récepteur (Cascales, et al. 2007; Devanathan and Postle 2007).

### B.3. INTERACTION AVEC EXBB/D

Le moteur formé par ExbB/ExbD apporte l'énergie nécessaire pour l'importation des colicines du groupe B. Les mutants *exbB* et *exbD* montrent une tolérance aux colicines et aux phages TonB-dépendant. Mais jusqu'à ce jour, aucune donnée expérimentale n'a permis de démontrer une interaction directe entre les colicines et les protéines ExbB/ExbD.

### B.4. TRANSLOCATION ATYPIQUE DE LA COLICINE M

La colicine M est la seule colicine enzymatique qui ne pénètre pas dans le cytoplasme. L'infection de la colicine M est dépendante du système TonB et du récepteur FhuA. Son activité est d'inhiber la régénération du peptidoglycane. Plus précisément, elle va hydrolyser la liaison entre le pyrophosphate et l'undecaprenol du lipide II. Le lipide II est un transporteur (navette) qui permet de véhiculer les précurseurs du peptidoglycane (N-acétyl glucosamine pentapeptide ou N-acétyl muramique pentapeptide). La structure de la colicine M a été résolue par cristallographie aux rayons X avec une résolution de 1,7Å. (Zeth, et al. 2008). Elle ne possède aucune similarité avec les structures des autres colicines connues à ce jour. La structure de colicine M est tellement compacte qu'il est difficile de distinguer les domaines classiques des colicines.



**Figure 3-13. Structure 3D cristalline de la colicine M à 1,7Å de résolution. PDB : 3DA3 D'après (Zeth, et al. 2008)**

La colicine M est une protéine singulière pour une autre raison. Elle doit interagir avec la protéine FkpA, une fois parvenue dans le périplasma pour pouvoir exercer son activité létale. FkpA possède une activité chaperonne dans sa région N-terminal et une activité *cis/trans* peptidyl-propyl isomérase dans sa région C-terminal (Saul, et al. 2004). Des résultats récents suggèrent qu'une fois parvenue dans le périplasma, la colicine M partiellement déroulée par son passage à travers la membrane externe, serait prise en charge par le domaine chaperon de FkpA. Ce dernier utilise ensuite son activité *cis/trans* peptidyl-propyl isomérase pour modifier et activer la colicine M (Barneoud-Arnolet, et al. 2010a; Barreteau, et al. 2010).

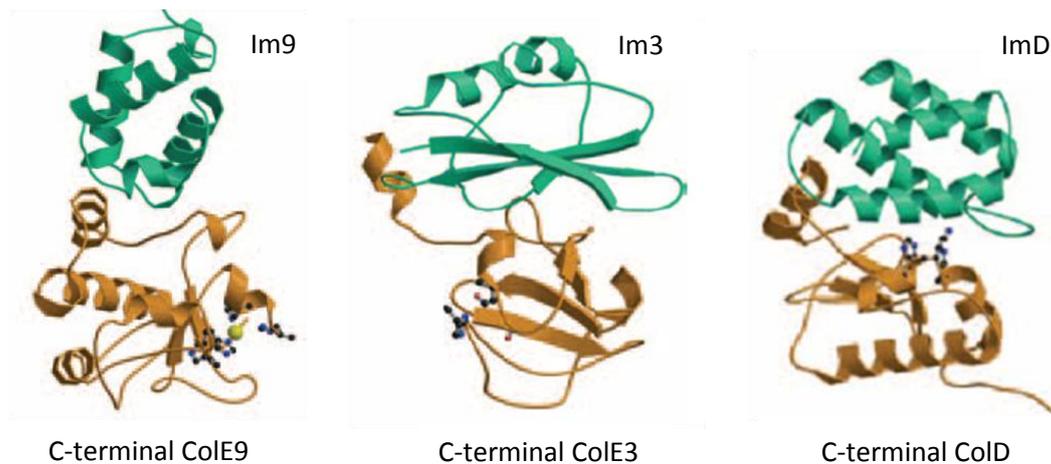
### 3.3. LE DOMAINE D'ACTIVITE DES COLICINES ENDONUCLEASIQUES ET LEUR PROTEINE D'IMMUNITE

Une fois parvenues dans le périplasma les colicines ionophoriques ou encore la colicine M peuvent atteindre la membrane interne ou le lipide II. Par contre, pour les colicines endonucléasiques, la membrane cytoplasmique doit encore être franchie. Ce processus est encore très mal connu. L'hypothèse dominante est que seul le domaine C-terminal traverse la membrane interne. Ce transport pourrait être : spontané et faire intervenir une propriété du domaine C-terminal (auto-transporteur), ou assisté et faire intervenir une machinerie ou des protéines qui restent à identifier.

Un autre modèle propose également que le domaine C-terminal soit clivé avant son passage ou lors de son passage à travers la membrane interne. Ce modèle a été développé précédemment (Section A.5)

L'hypothèse de « l'autotransporteur » résulte de travaux effectués sur certaines toxines A-B comme la toxine diphtérique. Les toxines A-B possèdent 2 domaines : A et B. Leur domaine B forme un canal à travers lequel est transporté le domaine A qui possède l'activité enzymatique. Dans le cas de la toxine diphtérique, le domaine A possède une activité ADP-ribosyl transférase (Falnes and Sandvig 2000; Oh and Amidon 1999). La capacité des colicines E9, E2, E7 et E8 à former des canaux a été démontrée *in vitro* sur des bicouches lipidiques planes reconstituées (Mosbahi, et al. 2002; Mosbahi, et al. 2004). Contrairement aux canaux formés par les colicines ionophoriques, l'ouverture des canaux formés par les colicines DNasique est aléatoire et ne dépend pas du voltage. La colicine peut potentiellement utiliser ce canal pour traverser la membrane interne. La formation du canal pourrait être initiée par l'interaction entre le domaine enzymatique de la colicine et la membrane (Walker, et al. 2007). Bien que l'interaction entre le domaine RNasique de la Colicine E3 et la membrane lipidique ait été observée, la formation d'un canal ionique par les colicines RNasique n'a jamais été rapportée (Mosbahi, et al. 2006).

Les colicines DNasiques (E2, E7, E8, E9) sont des métalloenzymes qui partagent 65% d'identité de séquence. Elles ont besoin d'un cofacteur métallique pour fonctionner efficacement. Elles sont activées par les ions bivalents tels que  $Mg^{2+}$   $Ca^{2+}$   $Ni^{2+}$   $Co^{2+}$   $Cu^{2+}$   $Zn^{2+}$  mais montrent une préférence pour le  $Ca^{2+}$  et le  $Mg^{2+}$ . Les colicines DNasiques hydrolysent préférentiellement l'ADN double brin mais peuvent également cliver aussi l'ADN simple brin *in vitro* de façon aspécifique (Pommer, et al. 2001).



**Figure 3-14 Structure hétérodimérique des domaines nucléasiques liés à leur protéine d'immunité (D'après (Cascales, et al. 2007)).** Les résidus clés du site actif sont indiqués, code couleur des atomes : N en bleu, C en noir, O en rouge. L'ion métallique du site actif de la colicine E9 est représenté en boule jaune.

Le domaine DNAsique est formé par 3 brins  $\beta$  antiparallèles, surmonté par des hélices  $\alpha$ . Le site actif est formé de 2 brins  $\beta$  et d'une hélice  $\alpha$  qui chélate un ion métal. Les 3 résidus importants dans la catalyse sont His-Asn-His. Le domaine Dnase fait partie des protéines à motif H-N-H/ $\beta\beta\alpha$ -Me.

Les colicines rRNasiques (colicine E3, E4, E6) hydrolysent la liaison entre les nucléotides A1493 et G1494 de l'ARN 16S ribosomique (Ogle, et al. 2003). Le domaine RNase de ces trois colicines partage 80% d'identité de séquence.

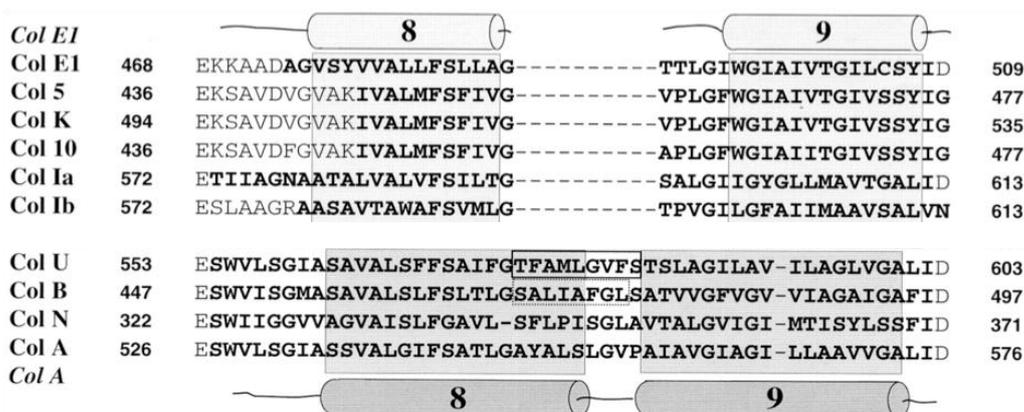
Les colicines tRNasiques (colicine D et colicine E5) hydrolysent une liaison phosphodiester dans la boucle anticodon de certain ARNt.

Les protéines d'immunité des colicines endonucléasiques se fixent sur le domaine C-terminal des colicines. Certaines créent une gêne stérique qui va empêcher la fixation de la cible. C'est le cas des protéines d'immunités des colicines Dnasiques et rRNasiques (Kleanthous and Walker 2001). D'autres se fixent sur le site catalytique et imitent l'interaction avec la cible. C'est le cas des protéines d'immunité de la colicine E5 (Im5) et de la colicine D (ImD) (Buckle, et al. 1994; Graille, et al. 2004; Luna-Chavez, et al. 2006). Une

autre caractéristique de l'interaction entre les colicines endonucléasiques et leur protéine d'immunité réside dans la très faible constante de dissociation du complexe. L'interaction entre la colicineE9 et sa protéine d'immunité, Im9, à un Kd de  $2,4 \times 10^{-14}$  M. Une valeur similaire est obtenue entre le domaine C-terminal seul et la protéine d'immunité (Wallis, et al. 1998). La force de l'interaction entre le domaine nucléasique et la protéine d'immunité est très grande, le processus de libération de la protéine d'immunité à la surface de la bactérie semble devoir nécessiter un grand apport d'énergie (Vankemmelbeke, et al. 2009). Jusqu'à présent, aucune évidence directe ne démontre la nécessité de l'apport d'énergie pour ce processus.

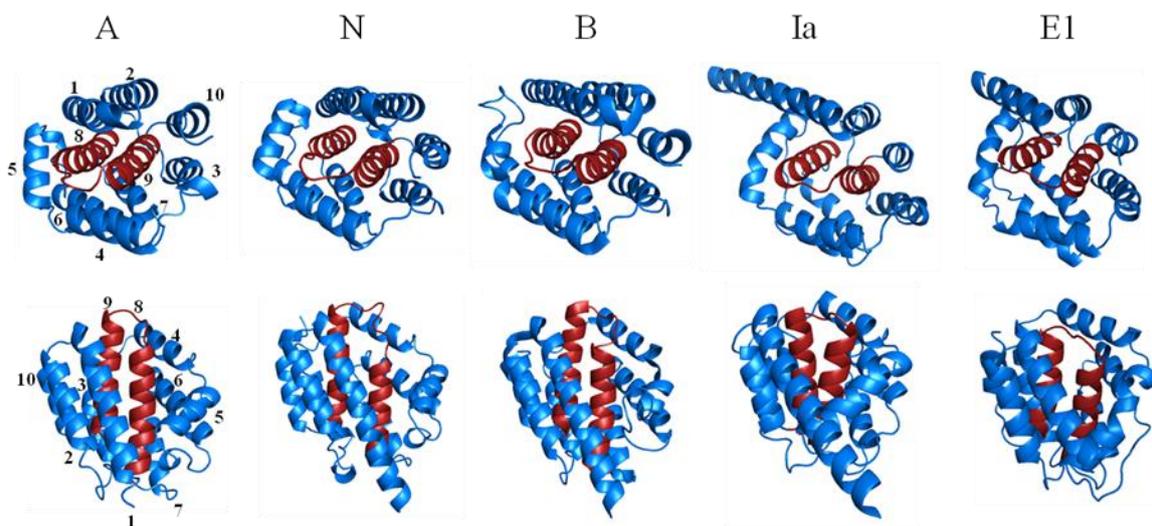
### 3.4. LE DOMAINE D'ACTIVITE DES COLICINES IONOPHORIQUES

Malgré la divergence de séquence entre les domaines N-terminaux et les domaines centraux des différentes colicines ionophoriques résultant de la différence dans le choix des récepteurs et des systèmes de translocation utilisés, les domaines ionophoriques présentent une très forte similarité structurale. En se basant sur un alignement des séquences des domaines actifs, les colicines ionophoriques sont classées en 2 groupes distincts : le groupe A (colicine A) et le groupe E1 (colicine E1)



**Figure 3-15 : Alignement des deux hélices hydrophobes du domaine C-terminal des colicines ionophoriques.** Les chiffres de chaque côté correspondent aux numéros portés par les acides aminés. Les résidus encadrés correspondent aux 9 résidus identifiés comme responsables de la spécificité d'interaction entre la protéine d'immunité et la colicine U (voir la section 3.4.2). D'après (Pils, et al. 1998).

À ce jour, la structure tridimensionnelle du domaine C-terminal de plusieurs colicines ionophoriques a été obtenue. Le domaine ionophorique des colicines A, N, B, Ia, E1 présente une forte similitude de structure. Ces domaines possèdent 10 hélices- $\alpha$  organisées en 3 feuillets. Deux feuillets externes composés d'hélices antiparallèles et amphipatiques (hélices 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10) et un feuillet interne enfoui constitué de deux hélices (8 et 9) hydrophobes. Une divergence remarquable entre ces deux groupes réside dans le cœur hydrophobe formé par les hélices 8 et 9. Ce motif en épingle-à-cheveux hydrophobe est plus long chez les colicines du groupe A (49 résidus) que chez celles du groupe E1 (35 résidus) (Davidson, et al. 1984; Pattus, et al. 1985).



**Figure 3-16 : La structure des domaines C-terminaux des différentes colicines ionophoriques A, N, B, Ia et E1.** Chaque colicine est représentée en deux orientations. Le cœur hydrophobe est coloré en rouge. Le reste des hélices est en bleu (D'après (Cascales, et al. 2007)).

La forte similarité du domaine ionophorique des différentes colicines (Tol-dépendant ou TonB-dépendantes) laisse penser que l'activité létale de ces colicines est indépendante de la voie de translocation. Ceci a été démontré par la construction de toxines chimères en échangeant par exemple le domaine actif des colicines A et B qui n'utilisent pas le même système de translocation (Geli and Lazdunski 1992), ou en fusionnant le domaine C-terminal de la colicine A à une séquence signal permettant son adressage dans le périplasme de la bactérie productrice. Le domaine C-terminal ainsi acheminé s'est révélé actif même dans des souches bactériennes ne produisant pas les protéines nécessaires à la réception et à la translocation de la colicine A (Espeset, et al. 1994a; Espeset, et al. 1996).

### 3.4.1. FORMATION DU CANAL IONIQUE PAR COLICINE

La formation du canal par les colicines ionophoriques se fait en deux étapes.

-La première étape est voltage indépendante. Elle se caractérise par une absorption du domaine C-terminal à la surface de la membrane suivie par l'insertion des hélices 8 et 9 hydrophobes dans la membrane. L'orientation des hélices 8 et 9 dans la membrane reste encore l'objet de nombreuses études. Cette conformation du domaine C-terminal associée à la membrane en absence de potentiel membranaire constitue l'état fermé du canal.

-La deuxième étape est dépendante du voltage, et consiste en l'insertion dans la membrane d'hélices sensibles au potentiel. Le canal est alors « ouvert ». L'application d'un potentiel ne s'accompagnerait pas uniquement de l'insertion d'hélices dans la membrane mais provoquerait également le passage de l'autre côté de la membrane d'une partie du domaine C-terminal de la toxine. Enfin, il est important de noter que les canaux formés par les colicines s'ouvrent à voltage positif et se ferment à voltage négatif.

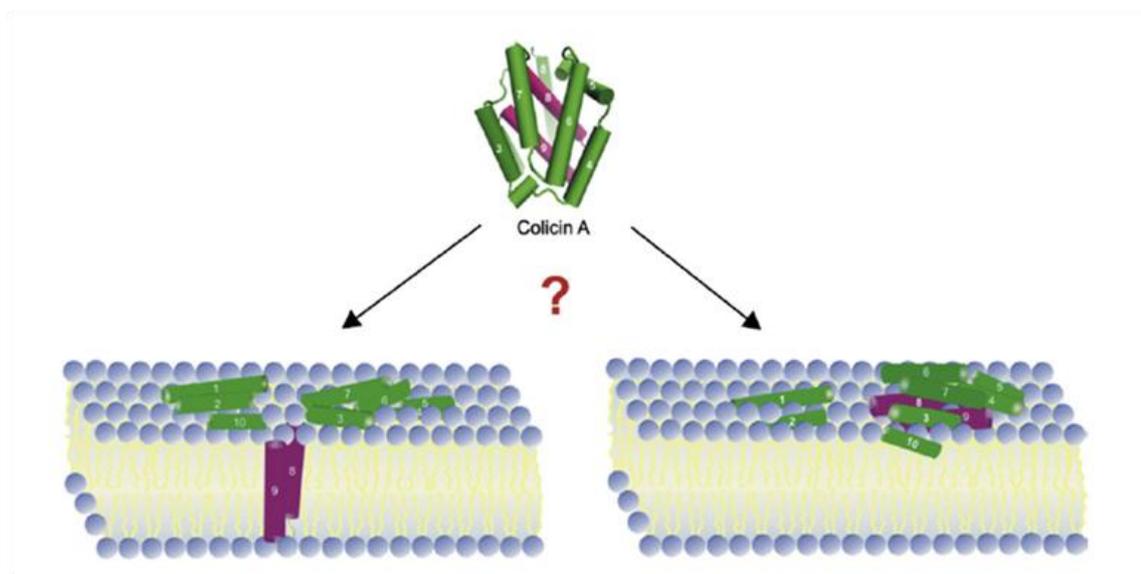
#### 3.4.1.1. MODELE DU CANAL A L'ETAT FERME

---

La première interaction entre le domaine C-terminal des colicines ionophoriques et la membrane est de nature électrostatique. Cette fixation électrostatique initiale est suivie par une fixation hydrophobe qui stabilise et rend l'interaction irréversible (Cramer, et al. 1995). En absence de potentiel membranaire, l'ensemble des hélices du domaine C-terminal de la colicine A reste à la surface de la membrane (Duche, et al. 1994a; Geli and Lazdunski 1992; Lakey, et al. 1993). Dans le cas de la colicine E1, le cœur hydrophobe (Hélice 8 et Hélice 9) adopterait une orientation perpendiculaire au plan de la membrane (Merrill, et al. 1990; Rath, et al. 1991; Shin, et al. 1993; Zhang and Cramer 1992). Lors de l'interaction avec la membrane interne, le domaine C-terminal des colicines A et B perd sa structure tertiaire pour adopter une conformation « globule fondu » qui favorise et accélère son insertion dans la membrane (Evans, et al. 1996; van der Goot, et al. 1991). Cette conformation « globule fondu » n'est pas retrouvée pour la colicine Ia (Schendel and Cramer 1994; Zakharov and Cramer 2002) ni pour la colicine N (Evans, et al. 1996).

Deux modèles ont été établis pour schématiser l'insertion membranaire des colicines.

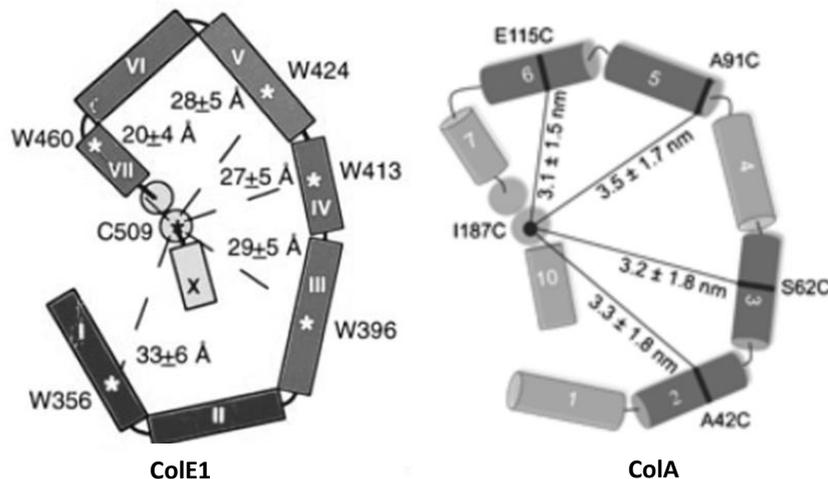
Le premier modèle, qualifié du modèle du « parapluie ouvert » (umbrella-like) a été proposé par Parker *et coll.* en 1989 à partir de la structure cristalline de la colicine A. Dans ce modèle, l'épingle à cheveu hydrophobe formé par hélices 8 et 9 s'insère perpendiculairement dans la membrane. Le reste des hélices du domaine C-terminal qui protégeaient ce cœur hydrophobe se séparent en deux parties et s'allongent à la surface de la membrane interne (Parker, *et al.* 1989). Des études de transfert d'énergie de fluorescence (FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer) entre des sondes placées dans les hélices 1, 2 et 10 du domaine C-terminal de la colicine A en présence ou en absence d'une bicouche lipidique (Lakey, *et al.* 1991; Parker, *et al.* 1992) supportent ce modèle.



**Figure 3-18.** Représentation schématique de l'insertion de la colicine A dans une membrane en absence de potentiel. Modèle du parapluie ouvert (à gauche) et modèle du couteau suisse (à droite) pour le canal fermé de la colicine A. D'après (Padmavathi and Steinhoff 2008).

Le second modèle qualifié de modèle du « couteau suisse » (penknife) est issu d'une seconde série d'études de FRET sur la colicine A (Lakey, *et al.* 1993). Dans cette étude, les sondes fluorescentes ont également été insérées dans les hélices hydrophobes 8 et 9. Dans ce modèle, les hélices H1 et H2 se séparent du reste de la molécule lors de la fixation de la protéine sur la membrane. Le reste de la molécule s'adsorbe également à la surface de la membrane avec les hélices 3 à 7 et l'hélice 10 recouvrant les hélices hydrophobes H8 et H9. Ces dernières reposent à la surface de la membrane. Ce modèle a ensuite été confirmé par l'insertion de ponts disulfures entre les différentes hélices du domaine C-terminal de la colicine A. Seuls les ponts disulfures reliant les hélices 1 ou 2 aux autres hélices empêchent l'insertion membranaire de la colicine A. Des ponts reliant les hélices 8 ou 9 aux hélices 3 à 7

n'entravent pas l'insertion de la colicine A dans la membrane prouvant que les hélices 8 et 9 ne pénètrent pas de façon perpendiculaire dans la membrane (Duche, et al. 1994a; Duche, et al. 1994b).



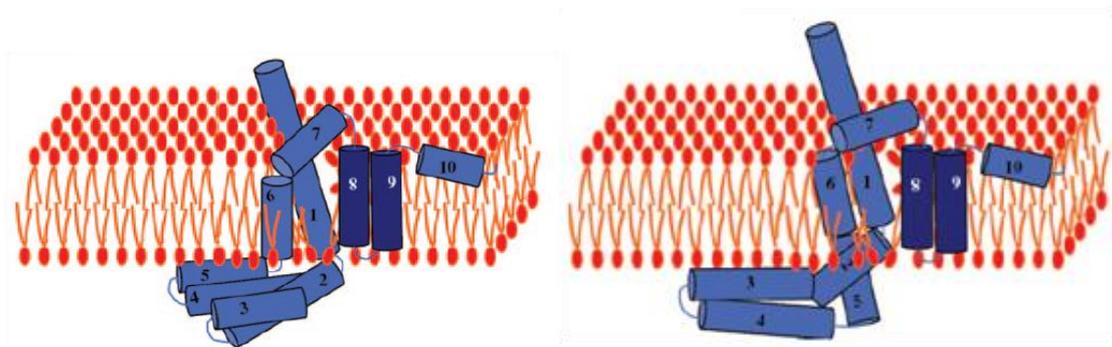
**Figure 3-19 : Modèle d'insertion de la colicine E1 et de la colicine A dans la membrane. D'après (Lindeberg, et al. 2000) et (Bohme, et al. 2009).** Les deux modèles sont fondés sur les distance mesurées entre un résidu marqué de l'hélice 9 (qui a une position centrale) et les autres résidus se trouvant sur les autres hélices. La distance mesurée est indiquée ainsi que les résidus utilisés pour le marquage et l'ordre des hélices.

Des études similaires de FRET effectuées sur la colicine E1 ont permis de mesurer la distance entre l'hélice 9 (position central) et les autres hélices. Avec ces données les auteurs ont proposé un autre modèle « parapluie » (Figure 3-18) (Lindeberg, et al. 2000). Une étude de RPE (résonance paramagnétique électronique) sur le domaine C-terminal de colicine A a été réalisée en 2009 par Bohme *et coll.* Cette étude a permis de mesurer la distance entre les hélices amphipathiques et l'hélice 9, un modèle similaire à celui proposé pour la colicine E1 a été obtenu (Bohme, et al. 2009) (Figure 3-19).

L'opinion actuelle concernant l'insertion d'une colicine ionophorique en absence de potentiel suggère qu'il s'agit d'une étape dynamique pouvant adopter plusieurs conformations. Les différents modèles proposés reflèteraient différentes étapes de l'insertion membranaire. Le modèle du « couteau suisse » serait plutôt une étape précoce dans la formation de canal, la forme « parapluie ouvert » serait l'étape finale.

### 3.4.1.2. MODELE DU CANAL IONIQUE A L'ETAT OUVERT

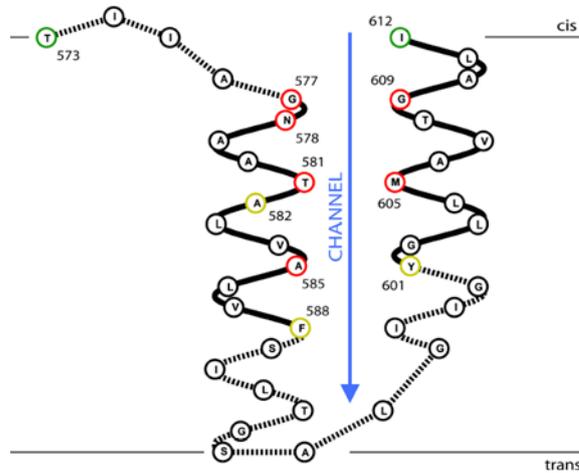
Lors de l'application d'un potentiel ( $\Delta\psi$ ) *trans*-négatif (*cis* = l'extérieur de la cellule ; *trans* = l'intérieur de la cellule), le canal ionique s'ouvre (Cramer, et al. 1990; Pattus, et al. 1990). L'ouverture du canal est induit par l'insertion de certaines hélices dans la membrane mais s'accompagne aussi du passage de l'autre côté de la membrane d'une partie de la colicine (Qiu, et al. 1994; Qiu, et al. 1996; Slatin, et al. 1994). Il a été démontré que des peptides ou des protéines de petites tailles insérées par mutagénèse dirigée entre les hélices 3 et 4 des colicines A et Ia étaient transportés de l'autre côté de la membrane lors de l'ouverture du canal (Jakes, et al. 1998).



**Figure 3-20 : Représentation schématique des hélices formant le canal ionique en position ouvert formé par les colicine A et Ia. D'après (Slatin, et al. 2004).**

L'une des questions essentielles concernant la formation du canal par les colicines ionophoriques concerne l'identification des hélices qui tapissent et forment le canal. Le domaine ionophorique des colicines est composé de 10 hélices  $\alpha$ , mais toutes ne sont pas nécessaires à la formation du canal. Des travaux de délétions au sein du domaine actif de la colicine A ont montré que les 5 dernières hélices de la colicine A pouvaient former un canal *in vivo* et *in vitro*, possédant les mêmes caractéristiques qu'un canal formé par la colicine A entière (Nardi, et al. 2001b). En se basant sur cette étude, le canal serait formé uniquement par les hélices 6-7,8 et 9 (Slatin, et al. 2002). Une récente étude combinant cystéine scanning et test d'accessibilité effectuée sur la colicine Ia, révèle l'orientation dans la membrane des hélices 8 et 9 de colicine Ia au sein du canal ionique. Les résidus engagés dans la formation du canal ionique ont été identifiés et s'organisent sur la même face des hélices (Figure 3-22). Les résidus identifiés sont supposés former l'une des faces du canal ionique qui serait délimité par

les hélices H6, H7, H8 et H9. Ces résidus seraient également impliqués dans le passage du proton du côté *cis* vers le côté *trans* (Kienker, et al. 2008).



**Figure 3-22 : Orientation des hélices 8 et 9 de la colicine Ia formant le canal ionique dans la membrane.** La position des résidus marqués par la sonde est indiquée. Les résidus marqués uniquement du côté *cis* sont en vert, ceux marqués uniquement du côté *trans* sont en jaune ; et ceux marqués des deux côtés sont en rouge. La ligne en pointillé montre que la structure secondaire de cette partie pourrait changer lors de l'ouverture du canal. D'après (Kienker, et al. 2008).

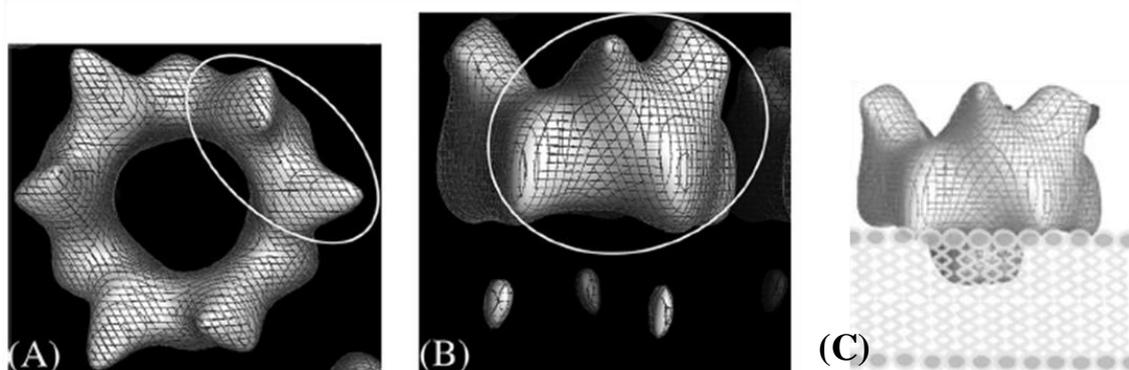
Le diamètre du canal formé par la colicine A est estimé à 10Å. Pour la colicine Ia, cette valeur est estimée à au moins 7Å (Krasilnikov, et al. 1998). Les essais avec les différents ions monovalents montrent qu'aucun de ces ions n'est trop grand pour traverser le canal (Bullock and Kolen 1995; Bullock, et al. 1992; Raymond, et al. 1985). Même le tétra-éthyl d'ammonium (TEA), un cation d'environ 8 Å avec une symétrie tétraédrique, traverse facilement le canal formé par la colicine Ia (Slatin, et al. 2008). La plupart des toxines pore-formatrices, qui ont la capacité de former des canaux ioniques de grande taille, sont oligomériques. Mais, presque tous les résultats obtenus montrent que le canal ionique formé par les colicines ionophoriques est très probablement monomérique (Lakey and Slatin 2001) (Pour revue (Lakey and Slatin 2001; Slatin and Kienker 2003)).

Comment concilier ces deux évidences à priori contradictoires ?

Une des solutions serait que les colicines recrutent des lipides pour participer à la formation du canal (Slatin 1988; Zakharov, et al. 2004b), Cette hypothèse a déjà été émise pour certaines protéines formant des pores multimériques (Lin and Baumgaertner 2000; Matsuzaki 1998; Matsuzaki, et al. 1996). Certains résultats obtenus avec la colicine E1 sont en faveur de cette hypothèse (Sobko, et al. 2004; Sobko, et al. 2006; Sobko, et al. 2010). Ils montrent que l'activité de la colicine E1 est dépendante de la composition lipidique du

système membranaire utilisé. Avec une fine membrane constituée de 1,2-dieicosenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (C20), la conductance du canal formé par la colicine E1 est de 60 pS, et sa taille est de 12 Å. Avec une membrane plus épaisse, constituée de 1,2-dierucoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (C22) la conductance est de 600 pS, et la taille du canal est alors de 16Å.

Une étude de cristallographie 2D sur la colicine Ia reconstituée dans des liposomes révèle la présence d'un complexe protéique hexagonal. Ce complexe est visualisé par microscopie électronique avec une résolution de 17Å (Figure 3-19). Tous les résultats antérieurs suggèrent que le canal est monomérique, Greig *et coll.* pense qu'une telle structure oligomérique pourrait faciliter la translocation des hélices en amont des hélices 8 et 9 au travers de la membrane (Greig, *et al.* 2009).



**Figure 3-21 : Reconstruction en image 3D des formes oligomères de la colicine Ia D'après (Greig, *et al.* 2009)** A. Vue de l'extérieur de la cellule ; B. vue de côté ; C. Modèle de reconstruction d'un oligomère dans une membrane.

L'analogie des colicines avec certaines protéines pore-formatrices n'apportent malheureusement pas des informations nous permettant de trancher sans ambiguïté entre une structure monomérique ou multimérique du canal : la structure du domaine T de la toxine diphtérique (DT) montre des similarités de structure avec le domaine C-terminal des colicines ionophoriques. La similitude a été démontrée non seulement pour la forme soluble (Choe, *et al.* 1992), mais aussi dans la topologie du canal ionique formé (Kienker, *et al.* 2000; Slatin and Kienker 2003). Les données publiées sur le canal formé par le DT sont en faveur d'un monomère (Gordon and Finkelstein 2001). (Pour revue (Wu, *et al.* 2006))

Par comparaison de séquence, d'autres analogues structuraux du domaine ionophorique des colicines ont pu être identifiés, il s'agit des protéines de la famille Bcl-2.

Dans cette famille sont regroupées des protéines impliquées dans le processus d'apoptose. La protéine Bax (Bcl2-associated X protein) est une protéine pore-formatrice pro-apoptotique mitochondriale. L'oligomérisation de la protéine Bax semble être privilégiée pour permettre la formation du pore de grande taille (Antonsson, et al. 2000; Epand, et al. 2002; Zhang, et al. 2004).

#### 3.4.1.3. LA CONTROVERSE DE LA TAILLE DU CANAL VS LA SELECTIVITE IONIQUE

---

La diversité dans la nature et la taille des molécules qui peuvent passer au travers du canal formé par les colicines laisse penser que ce canal est peu sélectif. Cependant, la perméabilité du canal pour le proton est  $10^4$  fois plus grande que pour le potassium à pH neutre (Kienker, et al. 2002). Une publication récente montre, en utilisant des protéines chimères construites à partir des colicines A, E1, et Ia, que la partie déterminant la spécificité pour le proton de la colicine A serait localisée dans ses 5 dernières hélices (Slatin, et al. 2010). Il est difficile d'expliquer comment un canal de  $10\text{\AA}$  peut avoir une telle sélectivité pour le proton ( $r = 0,25\text{\AA}$  atomique  $0,11\text{\AA}$  anionique) par rapport à l'ion potassium ( $r = 2,2\text{\AA}$  atomique  $1,38\text{\AA}$  anionique). À ce paradoxe, s'ajoute celui de la faible conductance des canaux formés par les colicines par rapport à leur diamètre plutôt élevé. De plus, il a été montré que la colicine A pouvait transporter des peptides de grandes tailles à travers la membrane (Slatin, et al. 2002; Slatin and Kienker 2003). Des résultats similaires ont montré que la colicine Ia pouvait transporter une protéine de  $26\text{\AA}$  de diamètre à travers la membrane (Kienker, et al. 2003). Le canal formé par les colicines apparaît « trop petit » par rapport aux peptides qui peuvent être transloqués et « trop grand » pour afficher une sélectivité pour le proton au détriment du potassium.

---

#### 3.4.2. LA PROTEINE D'IMMUNITE DES COLICINES IONOPHORQUES

L'immunité contre les colicines ionophoriques est conférée par des polypeptides des 11 à 18 kDa qui sont localisés dans la membrane cytoplasmique. L'étroite spécificité de la protection conférée par chaque protéine d'immunité suggère une interaction directe entre la colicine et son antagoniste.



De nombreuses études ont été menées pour déterminer les régions importantes pour le fonctionnement des protéines d'immunité sans grand succès. Pour la protéine Cai, des études de mutagenèse ont montré que la substitution non conservative des séquences de N et C terminales n'altérerait pas l'activité de celle-ci. Cai et Cbi (protéine d'immunité de la colicine B) partagent de forte similarité de séquence (38% identité de séquence et 39% de substitutions conservatrices (Geli, et al. 1989a)). La première hélice transmembranaire de Cai peut être fonctionnellement échangée avec celle de Cbi sans changer l'activité de la protéine modifiée (Geli, et al. 1988). Les boucles L2 et L3 de Cai sont riches en résidus polaires, la substitution de ces résidus diminue l'activité de la protéine. Mais le même type de substitution n'altère pas le fonctionnement de la protéine d'immunité de la colicine E1 (Cei) (Song and Cramer 1991; Zhang and Cramer 1993).

Le rôle de la boucle cytoplasmique L2 de Cai a été entrevu par Espeset *et coll.* en 1994. Les auteurs ont produit la protéine d'immunité Cai sous forme de 2 segments indépendants (H1-H2 et H3-H4) et ont remarqué l'absence de fonctionnalité de la protéine, résultant d'une incapacité des deux segments à interagir dans la membrane pour reformer une protéine fonctionnelle (Espeset, et al. 1994b). Ceci suggère que la boucle L2 joue un rôle important dans la connexion entre les hélices transmembranaires de Cai. La boucle L2 possède une concentration importante de résidus positivement chargés ce qui en ferait un déterminant topologique important (von Heijne 1992). Les boucles périplasmiques semblent importantes pour l'activité de la protéine mais ne semblent pas déterminantes pour la spécificité (Espeset, et al. 1994b).

---

#### 3.4.4. MODE D'ACTION DE LA PROTEINE D'IMMUNITE DES COLICINES IONOPHORQUES

Des travaux réalisés sur la colicine Ia ont montré que la présence de la protéine d'immunité n'empêchait pas la fixation de la colicine sur son récepteur à la surface de la bactérie (Konisky and Cowell 1972). La reconnaissance entre la protéine d'immunité et sa colicine a donc lieu au cours d'une étape ultime de son mode d'action (Konisky 1982) : l'insertion dans la membrane ou l'ouverture du canal. La construction de protéines chimères entre les colicines Ia et Ib (Mankovich, et al. 1984) et les colicines A et E1 (Benedetti, et al. 1991a) ont permis d'identifier le domaine C-terminal des colicines comme étant la région reconnue par les protéines d'immunités. La première preuve biochimique de l'interaction entre le domaine C-terminal d'une colicine et sa protéine d'immunité est venue des travaux

d'Espeset *et coll.*, en 1996. Dans ce travail, le domaine C-terminal de la colicine A, fusionné à une séquence signal procaryote, est adressé dans le périplasme de la bactérie productrice où il peut s'insérer dans la membrane interne et exercer son activité létale. La bactérie ne survit que si elle co-produit la protéine d'immunité. Dans ces conditions de co-expression, le domaine C-terminal de la colicine A peut être co-immunoprécipité avec la protéine Cai. (Espeset, *et al.* 1996). Des travaux effectués avec le domaine C-terminal de la colicine A fusionné à une séquence signal permettant son adressage dans le périplasme de la bactérie productrice apportent également un autre résultat important : Cai pouvait interagir directement sur le domaine C-terminal de la colicine A sans l'aide des protéines nécessaires à l'importation de la toxine (Espeset, *et al.* 1994b).

Ainsi à partir de ces résultats, le modèle proposé est qu'une protéine d'immunité diffuse librement dans la membrane interne jusqu'à ce qu'elle trouve le domaine C-terminal de sa colicine antagoniste et qu'elle l'inactive. Mais alors le déterminant majeur reconnu par la protéine d'immunité au sein du domaine C-terminal de sa colicine cible reste à découvrir. Le paragraphe ci-après décrit les évidences expérimentales qui suggèrent que les protéines d'immunité du groupe A reconnaissent une certaine région de leur colicines alors que celles du groupe E1, en reconnaissent une autre.

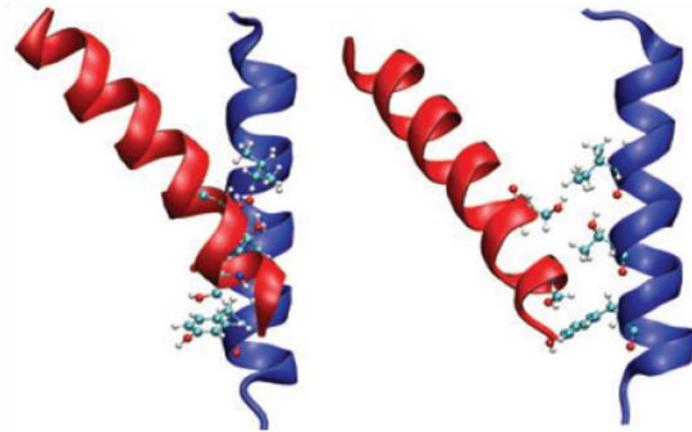
#### 3.4.4.1. PROTEINE D'IMMUNITE DU TYPE-A

---

La construction de colicines chimères entre la colicine A et la colicine B a montré que « l'épingle à cheveux » hydrophobe formée par les hélices 8 et 9 était le déterminant majeur reconnu par la protéine d'immunité. (Geli and Lazdunski 1992). Ce résultat fut confirmé quelques années plus tard en utilisant une protéine fusion contenant les hélices 8 et 9 de la colicine A insérée entre une séquence signal procaryote et la phosphatase alcaline. Cette protéine fusion pouvait en effet, être co-immunoprécipitée avec la protéine Cai (Nardi, *et al.* 2001a). L'ensemble de ces résultats a permis d'établir que la plus petite région d'une colicine du groupe A reconnue par sa protéine d'immunité était constituée des hélices hydrophobes 8 et 9. Des résultats obtenus sur la colicine U ont permis de réduire encore la région reconnue par une protéine d'immunité. En effet, la suppression des 9 résidus de la boucle entre les hélices 8 et 9 de la colicine U (Cui) empêche la protéine d'immunité Cui de reconnaître la

colicine U mutée et de l'inactiver. Lorsque les 9 résidus de la colicine U sont remplacés par ceux de colicine B (Cbi), la protéine hybride est reconnue partiellement par Cui mais également par Cbi, la protéine d'immunité de la colicine B. (PilsI, et al. 1998). Des travaux furent effectués sur les colicines A et Y dans le but d'identifier les acides aminés clés dans la reconnaissance colicine / protéine d'immunité.

La colicine Y est une colicine ionophorique (Riley, et al. 2000; Smajs, et al. 2006) ayant la séquence proche de la colicine A. La séquence protéique de son domaine ionophorique partage 68% d'identité avec celle de la colicine A (Alignement effectué avec la séquence Q9KJ98 de la colicine Y et avec la séquence Q47108 du domaine C-terminal de la colicine A, uniprot®). En utilisant des approches génétiques, Samajs *et coll.* ont pu identifier des résidus importants pour la reconnaissance et l'interaction entre le domaine ionophorique de la colicine Y et la protéine d'immunité Cyi. Ces acides aminés sont localisés dans les deux hélices hydrophobes de la colicine Y et l'hélice III de Cyi (Figure 3-24) (Smajs, et al. 2008). L'ensemble de ces résultats suggèrent que la protéine d'immunité interagit avec les hélices 8 et 9 d'une colicine du groupe A dans la membrane juste avant l'ouverture du canal.



**Figure 3-24. Modélisation de l'interaction entre l'hélice 8 du domaine ionophorique de la colicine Y (en bleu) et l'hélice III de sa protéine d'immunité Cyi (en rouge). (D'après (Smajs, et al. 2008))**

Chacune des deux hélices est composée de 8 résidus. Les résidus engagés dans l'interaction sont indiqués. Code couleur : O-rouge, C-cyan, H-blanc, N-bleu.

#### 3.4.4.2. PROTEINE D'IMMUNITE DU TYPE-E1

Les données obtenues pour les colicines du groupe E1 sont sensiblement différentes. Le déterminant majeur de la reconnaissance d'une colicine du groupe E1 par sa protéine d'immunité serait constitué d'une hélice hydrophobe et d'une hélice amphiphile sensible au potentiel de membrane (Song and Cramer, 1991; Zhang and Cramer, 1993). En effet, l'introduction de mutations ponctuelles dans les hélices hydrophobes du domaine C-terminal de la colicine E1, a permis de générer des colicines mutées capables de tuer des souches immunes. En plus des hélices hydrophobes, l'interaction entre la colicine et sa protéine d'immunité nécessiterait la présence de l'hélice amphiphile 6 du domaine C-terminal. L'interaction se ferait une fois le canal ouvert (PilsI and Braun 1995). Le changement des résidus 416 à 419 de l'hélice 6 du domaine C-terminal de la colicine 10 par les résidus correspondant de la colicine E1 augmente la reconnaissance de cette protéine hybride par la protéine d'immunité de la colicine E1 et diminue la reconnaissance par celle de la colicine 10 (Lindeberg and Cramer 2001).

Les travaux de mutagenèse dirigée effectués par Song et Cramer en 1991 sur la protéine d'immunité de la colicine E1 ont démontré qu'en plus des hélices transmembranaires, les boucles extra membranaires jouent un rôle important dans la reconnaissance de la colicine E1 (Song and Cramer 1991).

## 4. EVOLUTION DES COLICINES

Des études phylogénétiques prouvent qu'il existe de fortes similarités de séquence entre le domaine actif des différentes colicines qui n'utilisent pas le même système de translocation pour entrer dans la cellule.

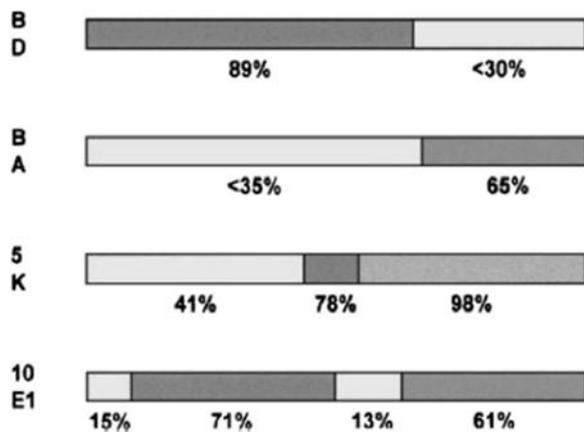


Figure 3-25. Comparaison des séquences protéiques des colicines. Les chiffres indiquent le pourcentage d'identité des séquences protéiques. D'après (Cascales, et al. 2007)

La similitude de séquence la plus remarquable concerne le couple de colicines ionophoriques colicine K et colicine 5. Ils partagent le même récepteur : la protéine Tsx. La colicine K utilise le système Tol pour entrer dans la cellule, alors que la colicine 5 nécessite la présence du système TonB-ExbB-D et la protéine TolC. Leurs domaines d'activité ionophorique partagent 98% d'identité de séquence. Mais leurs domaines N-terminal possèdent seulement 41% d'identité. Ces résultats sont cohérents avec l'observation que ces toxines n'utilisent pas le même système de translocation. Ainsi on en déduit que l'évolution des différentes colicines ionophoriques résulte d'un évènement de recombinaison au niveau de la séquence codant pour le domaine fonctionnel (Pinou and Riley 2001). Une autre étude de comparaison de séquence effectuée entre les colicines endonucléasiques *versus*/et entre leur protéine d'immunité suggère plutôt une modification co-évolutionnelle du couple colicine-protéine d'immunité. Le premier évènement est l'apparition d'une mutation dans le gène de l'immunité résultant d'un élargissement de sa fonction. La protéine d'immunité mutée a acquis la capacité d'inactiver un certain nombre de colicines similaires tout en maintenant sa capacité à inactiver sa colicine. L'apparition de cette mutation sur la protéine d'immunité est suivie de l'apparition d'une mutation cette fois sur la colicine cible. Cette paire de mutations produit une nouvelle colicine qui n'est plus reconnue par la protéine immunité initiale. Ainsi la nouvelle colicine va remplacer la colicine ancestrale en tuant les cellules productrices. Le cycle recommence. Ce processus aboutit à une famille de protéines apparentées qui ont divergé plus largement dans la région impliquée dans l'immunité et l'activité létale, comme cela a été observé pour les colicines nucléasiques (Riley 1993a; Riley 1993b). L'évolution globale des colicines résulte certainement de ces deux évènements (Riley 1998).

## **CHAPITRE II :**

### **RESULTAT**



## ARTICLE I :

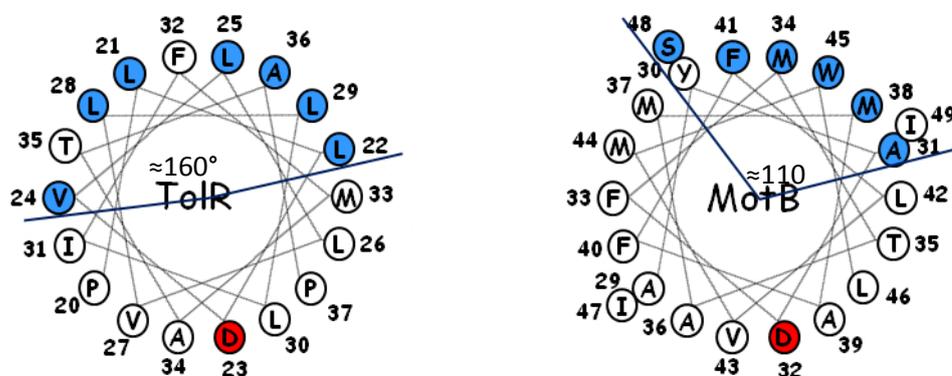
## **Cartographie des interactions entre les sous-unités Tol d'*E. coli* : Mise en évidence de la rotation de segment transmembranaire de TolR**

## INTRODUCTION :

Le système Tol-Pal joue un rôle essentiel dans la maintenance de l'intégrité membranaire pour la cellule. Les protéines TolB et Pal forment un complexe de membrane externe. Les trois autres protéines TolQ-R-A forment un complexe dans la membrane interne. Le ratio de TolA-TolR-TolQ dans le complexe est de 1 : 2 : 4-6. Dans ce modèle d'organisation minimale du moteur TolQ-R proposé, la protéine TolR est sous forme de dimère et se trouve au centre du complexe, entourée par les segments transmembranaires 2 et 3 de TolQ (Cascales, et al. 2001). Il existe des preuves directes de l'interaction entre le ST de TolR et les ST-2 et -3 de TolQ (Goemaere, et al. 2007a; Lazzaroni, et al. 1995). TolR forme des homodimères (Germon, et al. 1998), via le domaine périplasmique (Journet, et al. 1999), et interagit au niveau de son extrémité C-terminale (Goemaere, et al. 2007b). La structure RMN de ce domaine confirme aussi ces résultats (Parsons, et al. 2008). En revanche, il n'existe pas de preuve directe de l'homodimérisation de TolR au niveau de son ancre transmembranaire. Pourtant pour le moteur MotA-B, homologue à TolQ-R, l'ancre transmembranaire de MotB, est organisée sous forme de dimère pouvant adopter 2 conformations (Braun and Blair 2001). Par mutagenèse systématique en cystéine, les auteurs ont montré que les hélices transmembranaires du dimère interagissent et subissent des changements de conformation; elles semblent osciller d'un angle d'environ 110° entre deux positions stables. De plus, les deux résidus aspartate (D32) du dimère ne se retrouvent pas localisés dans l'interface des deux ancres transmembranaires, ce qui suggère la formation de deux canaux ioniques indépendants.

Par mutagenèse dirigée nous avons substitué chacun des 20 résidus formant l'hélice transmembranaire de TolR en cystéine. Nous avons alors vérifié si la protéine TolR pouvait

dimériser par son segment transmembranaire et si ce dernier adopte des conformations différentes dépendant du fonctionnement du canal ionique.



**Figure I-1 : Représentation en projection de l'hélice transmembranaire de MotB et de TolR** Vue périplasmique en projection d'une hélice parfaite de l'ancre de MotB (A) et de l'ancre de TolR. L'amplitude de rotation de chacune des hélices est représentée. Les faces de dimérisation sont colorées en bleu, le résidu aspartate conservé est en rouge. Les amplitudes de rotation de TolR et MotB sont respectivement d'environ 160 et 110°.

#### RESUME :

L'alignement multiple de séquences homologues à TolR d'*Escherichia coli* montre que l'ancre transmembranaire de TolR est hautement conservée. Cette conservation de séquence serait le reflet des interactions de l'hélice transmembranaire de TolR avec d'autres segments transmembranaires. De plus, nous savons que le résidu D23 (conservé à 100%) est essentiel au fonctionnement du canal ionique TolQ-R. Afin de détecter d'autres résidus essentiels mais aussi pour orienter la protéine TolR dans la membrane, nous avons substitué chacun des vingt résidus (I18 à P37) de l'ancre transmembranaire en cystéine. Nous avons vérifié l'expression de chacun des mutants puis réalisé les tests phénotypiques de stabilité de la membrane externe ainsi que d'import des colicines du groupe A pour déterminer leur fonctionnalité. Le phénotype des mutants est classé sous 3 groupes distincts selon la sensibilité aux colicines du groupe A et l'intégrité membranaire (Goemaere, et al. 2007a) : à l'exception des mutants L22C, D23C, et V24C, les autres mutants permettent le maintien de l'intégrité membranaire ainsi que l'import des colicines du groupe A (classe 1 : fonctionnel). La mutation D23C provoque un phénotype de classe 2 (non fonctionnel pour l'intégrité membranaire et l'import des colicines), contrairement au mutant D23A qui provoque un phénotype de classe 3

(discriminateur). Ce phénotype révèle que la substitution en cystéine au niveau de la position 23 perturbe le fonctionnement du canal mais ne semble pas affecter l'assemblage du complexe puisque les colicines sont toujours actives. De manière surprenante, les deux mutants L22C et V24C provoquent un phénotype discriminateur. Ces deux résidus semblent donc se trouver à une position clé du canal ionique. Nous avons ensuite étudié la capacité de ces mutants à former des homodimères. Les mutants L22C et V24C forment naturellement des homodimères. On constate une dimérisation à faible efficacité des mutants I18C, L21C, L25C, L28C, et L29C. La projection de l'hélice révèle que les positions 22 et 24 sont diamétralement opposées au résidu D23 et que tous ces mutants se situent sur une même face située entre les résidus L22 et V24. D'autre part puisque la double substitution L22C/V24C permet d'obtenir que des formes dimériques de TolR (pas de multimères), ce qui suggère que TolR est sous forme de dimère au sein du complexe TolAQR.

Ces résultats nous ont permis de proposer un modèle dynamique de conformation de deux ST de TolR avec deux états stables, entraînant un déplacement de l'aspartate 23. Le phénotype discriminateur observé pour les mutants L22C et V24C serait dû au blocage du moteur dans l'une ou l'autre des conformations par la formation du pont disulfure. De plus nous avons montré que l'addition d'un agent réducteur permet de restaurer un phénotype sauvage, indiquant que ce blocage est réversible.

L'ancre transmembranaire de TolR possède un second résidu polaire: la thréonine 35. Le mutant T35C provoque un phénotype sauvage; en revanche la mutation T35A provoque un phénotype discriminateur. Il semble alors que les propriétés de la chaîne latérale de la thréonine ou de la cystéine soient importantes pour assurer une fonction à cette position.

Nous nous sommes alors demandés si l'utilisation de la force proton-motrice par le complexe TolQ-R, c'est-à-dire le passage de proton au travers du canal ionique, était responsable du changement de conformation de TolR. Nous avons alors réalisé une série de double mutants, en choisissant la première mutation cystéine parmi les résidus formant naturellement des homodimères et la deuxième mutation (en alanine ou valine) au niveau des résidus importants dans la fonction du canal ionique. Les tests de dimérisation montrent qu'une mutation au niveau des résidus potentiellement ionisables du canal (TolR-D23, TolQT145, TolQ-T178) abolit la formation des dimères exceptes ceux issus des mutations L22C et V24C. En revanche, la mutation du résidu Pro187 du ST3 de TolQ, résidu important

pour la transduction d'énergie mécanique de TolQ jusqu'à TolA, n'influe pas sur les mouvements de TolR, et n'affecte pas la dimérisation. Ces résultats suggèrent une corrélation entre le passage d'ions et les mouvements de l'ancre de TolR. Lorsque le canal ionique n'est pas fonctionnel, TolR serait bloqué dans l'une ou l'autre des conformations.

# Mapping the Interactions between *Escherichia coli* Tol Subunits

## ROTATION OF THE TolR TRANSMEMBRANE HELIX\*

Received for publication, July 10, 2008, and in revised form, November 21, 2008. Published, JBC Papers in Press, December 15, 2008, DOI 10.1074/jbc.M805257200

Xiang Y.-Z. Zhang, Emilie L. Goemaere, Rémi Thomé, Marthe Gavioli, Eric Cascales, and Roland Lloubès<sup>1</sup>

From the Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires, Institut de Biologie Structurale et Microbiologie, Centre National de la Recherche Scientifique, UPR 9027, 13402 Marseille, France

The TolQRA proteins of *Escherichia coli* form an inner membrane complex involved in the maintenance of the outer membrane stability and in the late stages of cell division. The TolQR complex uses the proton motive force to regulate TolA conformation and its interaction with the outer membrane Pal lipoprotein. It has been proposed that an ion channel forms at the TolQR transmembrane helix (TMH) interface. This complex assembles with a minimal TolQ:TolR ratio of 4–6:2 and therefore involves 14–20 TMHs. To define the organization of the transmembrane helices in the membrane within the TolQR complex, we initiated a cysteine scanning study. In this study, we report results for the systematic replacement of each residue of the TolR TMH. Phenotypic analyses first showed that most of the mutants are functional. Three mutants, TolR L22C, D23C, and V24C, were shown to affect TolQR functioning. Disulfide bond complex formation further showed that two TolR anchors are close enough to interact. Two substitutions, L22C and V24C, form high level of dimers, suggesting that the TolR helix rotates as molecular gears between these two positions and that disulfide bond formation between these residues blocked the rotary motion. Mutations of critical residues located within the TolQ TMH2 and TMH3 and the TolR TMH and proposed to form the ion pathway prevent rotation between these two residues. TolR anchors may form molecular gears that oscillate in response to proton motive force to regulate channel activity.

The Tol proteins form a complex involved in the maintenance of cell envelope integrity (1, 2) and in the late stage of the cell division process (3). Three of these proteins, TolQ, TolR, and TolA interact through their transmembrane (TM)<sup>2</sup> segments in the inner membrane (4–8). In the periplasm, TolB,

the outer membrane-anchored peptidoglycan-associated lipoprotein Pal, and the C-terminal globular domain of TolA bind to each other to form a network linking the inner and outer membranes and the peptidoglycan layer (9–11). Previous studies showed that the TolQ, TolR, and TolA proteins form a complex with a 4–6:2:1 stoichiometry. The proton motive force (PMF), the TolQ and TolR proteins, and the TMH of TolA regulate the conformation of the periplasmic region of TolA and probably its subsequent interaction with Pal (10, 12, 13). The TolQ-R complex thus appears to form a molecular motor that converts chemical energy derived from the PMF to mechanical movements (12). This appears possible through the passage of ions in an aqueous lumen formed by the single TMH of TolR and two helices (TMH2 and TMH3) of TolQ (12, 14). Several residues, including the critical Asp<sup>23</sup> residue that lies within the TolR TM segment, have been shown to be necessary for the TolQR complex to function as a molecular motor. Because of the hydrophilic behavior of these residues, it has been suggested that they probably form the aqueous ion pathway. The proline residue at position 187 of TolQ (TMH3) is also essential and has been proposed to regulate conformational modifications of the TolQR complex in response to ion transit through the aqueous channel (14). Recently, a cysteine scanning study demonstrated that the C-terminal periplasmic domain of TolR forms head-to-tail homo-dimers (15), a result that has been confirmed by the NMR structure of the *Haemophilus influenzae* TolR periplasmic domain (16). Cysteine accessibility indicates that the same domain changes conformation in response to PMF and to critical residues suspected to form the ion pathway. Consequently, it has been proposed that the C-terminal domain of TolR may regulate ion entrance or ion flows through the TolQ-R TM channel (15).

The TolQ-TolR complex is homologous to the ExbB-ExbD complex that functions in membrane transport and to the MotA-MotB complex that forms the stator of the flagellar motor (12, 17, 18). Biochemical analyses on the homologous TolR and ExbD proteins using chemical cross-linkers indicated that TolR forms homo-dimers (8), whereas ExbD forms dimers and trimers (19). Determinants for TolR dimer formation mainly localize in the periplasmic domain of the protein. The three-dimensional structure of the *H. influenzae* TolR periplasmic domain confirmed the formation of homodimers with a head-to-tail conformation (16), whereas the three-dimensional structure of ExbD obtained under acid pH conditions corresponds to a monomer (20). No structural information is avail-

\* This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and a grant from Agence National de la Recherche Projet Blanc SODATOL. This work was also supported by funds from SODATOL (to X. Y.-Z. Z.) and by a Fondation pour la Recherche Médicale fellowship (to E. L. G.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed: Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires, Institut de Biologie Structurale et Microbiologie, Centre National de la Recherche Scientifique, UPR 9027, 31 chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France. Tel.: 33-491-16-46-63; Fax: 33-491-71-21-24; E-mail: lloubes@ibsm.cnrs-mrs.fr.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: TM, transmembrane; TMH, transmembrane helix; PMF, proton motive force; WT, wild type; DTT, dithiothreitol; HA, hemagglutinin; Tricine, N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycine.

## TolR Transmembrane Helix Forms Homodimers

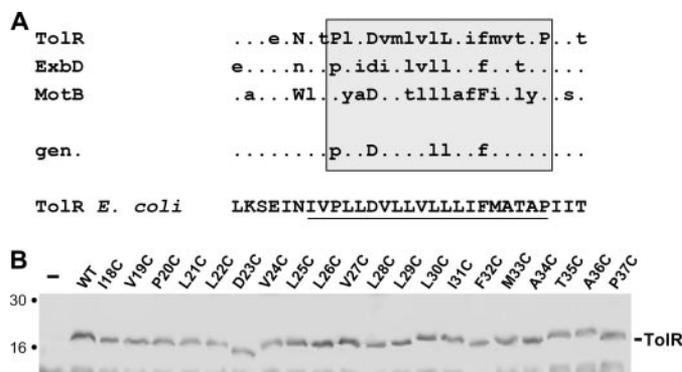
able for MotB; however, extensive mutagenesis has been performed using targeted disulfide cross-linking and evidenced that the TMHs from two MotB molecules are close enough to interact (21).

Using the whole batch of available data, an arrangement of four molecules of MotA and two MotB has been proposed in the flagellar motor (22). Based on the stoichiometry of one TolA molecule, a model for the arrangement of the TolQRA complex containing four to six TolQ and two TolR molecules has been proposed (12). Similar ratios were measured for the ExbD-TonB complex (23). This will form a minimal complex composed of 15–21 helices. To understand how the TolQRA TM segments interact in the membrane and how they mechanically respond to PMF or ion transit, we initiated a cysteine scanning approach. Herein, we performed a cysteine substitution mutagenesis of TolR TMH residues. The phenotypic consequences of residue replacements and the patterns of disulfide cross-linking obtained are consistent with an organization of two TolR TM segments in close contact through two distinct faces, suggesting helix rotation. Further experiments support the model in which ion transit at the TolQR TM helices interface induce a rotary motion of the TolR TM segment between the two faces.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Strain, Plasmid Construction, and Growth Conditions**—GM1 *Escherichia coli* K12 strain (WT), and its derivatives, TPS300 and TPS13 (*tolR*::Cm and *tolQR*, respectively) (24), were used in this study. pOK-QR was constructed by insertion of a EcoRI-BamHI fragment from pTPS304 (a ColE1 pUC19 derivatives encoding *tolQ-tolR*) (24) into the P15A derivative pOK12 vector (25). pUC-R and pOK-R constructs were obtained by deletion of the *tolQ* gene from plasmid pTPS304 and pOK-QR, respectively, using recombinant PCR (26) and oligonucleotides 5'-TTAAACTCCGCGACAATAGACTTGGGAAGCGCAGAGGCTT and 5'-GTCTATTGTTCGCGGAGTTTAAGCAATGGCCAGAGCGCGTGGACGA. In these constructs, the *tolQ* Shine Dalgarno is followed by *tolR* gene. *tolR* mutants were engineered as described previously (12), using the pUC-R or the pOK-R plasmids as templates. Site-directed substitutions were introduced by QuikChange mutagenesis PCR using complementary pairs of oligonucleotides (sequences available upon request). Plasmid pOK-Q<sub>HA</sub>, encoding a functional TolQ protein carrying a C-terminal hemagglutinin (HA) tag and compatible with the pUC-R derivatives, will be described elsewhere. pOK-Q<sub>HA</sub> carrying point mutations (T145A, T178A, and P187V TolQ mutant proteins) were constructed by QuikChange mutagenesis. All of the constructs were verified by restriction analyses and further DNA sequencing. Routinely, cells were grown aerobically in LB medium at 37 °C supplemented with ampicillin (100 µg/ml; pUC derivatives), kanamycin (50 µg/ml; pOK derivatives), or chloramphenicol (40 µg/ml).

**Assays for Outer Membrane Stability**—Outer membrane permeability was assessed by measuring the level of detergent susceptibility, as well as the level of periplasmic RNase I release in the extracellular medium. Detergent susceptibility was measured by the level of survival of the strain on 1% deoxy-



**FIGURE 1. Conservation of TolR anchor.** *A*, alignment of TolR, ExbD, and MotB N-terminal consensus sequences (from Ref. 12) (*uppercase letter*, residue conserved in >90% of the sequences; *lowercase letter*, residue conserved in >60% of the sequences; *dot*, not conserved residue). The *E. coli* TolR N-terminal sequence is indicated (*bottom row*). The frame represents the position of the TM domain. The residues mutated in this study are *underlined* in the *E. coli* TolR sequence. *B*, steady state levels of WT and mutants TolR proteins used in this study.  $0.2 \times 10^8$  cells were boiled in Laemmli buffer supplemented with  $\beta$ -mercaptoethanol, loaded onto 12.5% acrylamide Tricine SDS-PAGE, and immunodetected with anti-TolR polyclonal antibody. The molecular weight markers are indicated on the left.

cholate supplemented LB plates or on LB liquid medium containing various concentrations of SDS (as described previously) (27). In the latter case, survival is reported as the concentration of SDS sufficient to inhibit 50% of the cell growth after 3 h of cultures ( $LD_{50}$ ). RNase I leakage was measured on RNA-containing plates, as described previously (27).

**Colicin Tolerance Assay**—Colicin activities were checked by the presence of halos on a lawn of the strain to be tested, as described previously (28). The data are reported as the maximal dilution of the colicin stock sufficient for inhibiting cell growth.

**In Vivo Disulfide Bond Formation and Immunodetection**—*In vivo* disulfide bond formation was essentially carried out as described previously (15) with slight modifications.  $8 \times 10^8$  exponentially growing cells were harvested and resuspended in 1 ml of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, and then treated for 10 min with 2.5 mM *N*-ethylmaleimide (Sigma) to block reduced thiol groups. When required, the cells were treated with the oxidative catalyst copper (II) orthophenanthroline 0.3 mM (CuOP; Sigma) prior washing in sodium phosphate buffer and blocking with *N*-ethylmaleimide. After centrifugation, the cell pellets were resuspended in Laemmli loading buffer in the presence or absence of the reducing agent  $\beta$ -mercaptoethanol. *In vivo* formaldehyde cross-linking was performed as described previously (29). Proteins were separated on a 15% SDS-PAGE, and immunodetections were performed using the anti-TolR polyclonal antibody (8), secondary goat antibodies coupled to alkaline phosphatase and 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (Sigma), and nitroblue tetrazolium (Sigma).

### RESULTS

**Sequence Conservation**—The TolR, ExbD, and MotB proteins share similarities at the sequence level and probably at the structural and functional levels. Fig. 1*A* shows a sequence conservation consensus of all TolR, ExbD, and MotB TM anchors available on the protein data base. The general consensus obtained from the TolR, ExbD, and MotB consensus shows

that the aspartate residue at position 23, two leucine residues at positions 28 and 29, and a phenylalanine residue at position 32 are conserved, whereas many other positions present residue with similar hydrophobic properties (positions relative to the *E. coli* TolR sequence; Fig. 1A). However, because of the nature of a transmembrane helix and the general hydrophobicity of the residues, these residues probably act as structural determinants. The functional role of the Asp<sup>23</sup> residue has been documented in the TolR protein, as well as in the ExbD and MotB homologues. It has been proposed that this aspartate plays a central role in the PMF-dependent process and may couple ion or proton transport to mechanical movement within the TolQR-ExbBD-MotAB or PomAB complexes (12, 14, 30–33). A recent accessibility study showed that it is indeed the case because TolR C-terminal residues display different solvent accessibilities depending on PMF and residues important for channel formation, including the TolR Asp<sup>23</sup> residue (15). To understand how transmembrane helices organize together in the membrane and how PMF and hydrophilic ion channel residues regulate structural transitions, we initiated a cysteine scanning approach using site-directed mutagenesis.

**Cysteine Scanning: Mutagenesis and Expression Levels of Cys Substitutions**—To gain information about the structural organization and dynamic features of the TolR transmembrane anchor, each amino acid residue of the helix (residues 18–37) (34, 35) was individually replaced with cysteine. Mutations were introduced into the pUC-R plasmid, which expresses *tolR* at WT levels, by a recombinant PCR technique. Steady state levels of cysteine substituted TolR proteins were determined after introduction of the mutated plasmids into the *tolR* TPS300 strain. Initial studies using the polyclonal anti-TolR antibodies showed that the substituted TolR proteins migrate at the same position and accumulate at comparable levels as native TolR (Fig. 1B). However, as shown previously (5, 12), mutations of the Asp<sup>23</sup> or the Pro<sup>187</sup> residue led to migration defects on denaturing gel electrophoresis.

**Phenotypic Characterization of Single Cysteine Mutants**—The 20 singly substituted TolR mutants were tested for outer membrane stability, reflected by their capacity to grow on deoxycholate-containing plates as well as the level of periplasmic components release. Like most transmembrane helices, the TolR transmembrane segment was shown to be remarkably tolerant to cysteine substitution because all but three mutants displayed WT phenotype (Table 1). As expected, the strain producing the D23C TolR protein released RNase I in the medium and did not grow in presence of deoxycholate. Similar phenotypes were observed when the L22C and V24C *tolR* alleles were expressed. The TolR protein is also parasitized by bacterial toxins, called colicins, to penetrate and kill the target cell (for a review, see Ref. 36). We then tested the collection of substituted TolR mutants for group A colicin uptake, a process independent of PMF (36). All the strain producing the TolR mutants, except D23C, were killed by the Tol-dependent colicins (Table 1). We further tested the *tolR* substitutions for the uptake of group B colicins after introduction of the mutated plasmids into the *exbBD-tolQR* strain expressing *tolQ* (from the pOK-Q<sub>HA</sub> plasmid). In contrast to group A colicins, group B colicins, except colicins 5 and 10, require energy from the ExbBD-TonB

TABLE 1

## Phenotypes of strains producing Cys-substituted TolR proteins

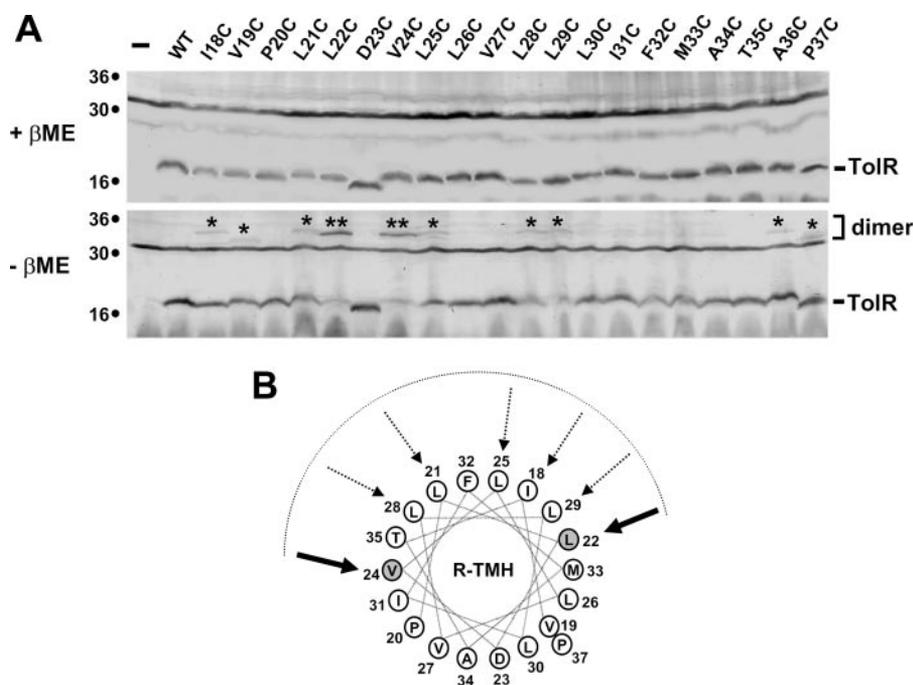
TPS300 (*tolR*) cells expressing WT *tolR* or *tolR* cysteine mutants were tested for level of import of group A colicins A, N, and E2 (*tolR*-dependent colicins) and group B colicin D (*tol*-independent), susceptibility to deoxycholate (DOC), and leakage of the periplasmic RNase I. Colicin sensitivity was tested on bacterial lawns by the spot dilution assay. The number indicated represents the maximal 10-fold dilution of the colicin stock (1 mg/ml) still able to kill the strain tested (R, resistant; S, sensitive; 4, sensitive to 10<sup>4</sup> dilution). Deoxycholate resistance was tested by 100-fold dilutions of the strain on 1% DOC LB plates. The number indicated represents the maximal dilution for which the strain still grows. RNase I leakage was estimated on RNA containing LB plates (–, no leakage; +, low levels of leakage; ++, high levels of leakage). Identical results were obtained using *tolR* cysteine mutants expressed from the pOK-R plasmid (data not shown).

	Colicin				DOC	RNase
	A	N	E2	D		
None	R	R	R	S	S	++
WT	4	4	4	S	4	–
I18C	3	3	3	S	4	–
V19C	3	3	3	S	4	–
P20C	3	3	4	S	4	–
L21C	3	3	4	S	4	–
L22C	3	3	3	S	S	++
D23C	R	R	R	S	S	++
V24C	3	3	3	S	S	++
L25C	4	4	4	S	4	–
L26C	4	4	4	S	4	–
V27C	3	3	4	S	4	–
L28C	4	3	4	S	2	–
L29C	3	3	4	S	4	–
L30C	3	3	4	S	2	+
I31C	3	3	4	S	4	–
F32C	3	3	4	S	4	–
M33C	4	3	4	S	4	–
A34C	3	3	4	S	3	–
T35C	3	3	4	S	3	–
A36C	3	3	4	S	4	–
P37C	3	3	4	S	3	–

or the chimera TolQR-TonB complex (a phenomenon known as “cross-complementation”), to penetrate the cell (36).<sup>3</sup> Production of TolQ and the TolR<sub>D23C</sub> protein in the *exbBD-tolQR* strain renders cells resistant to all group B colicins tested (B, D, Ia, M, 5, and 10), whereas the L22C and V24C mutations prevented cell killing by group B colicins except colicins 5 and 10 (data not shown). These results confirmed that the D23C mutation abolishes all TolR functions (outer membrane stability and colicin import), whereas the L22C and V24C mutations specifically blocked the PMF-dependent TolR function (outer membrane stability) but not the energy-independent colicin import process. Taken together, the phenotype analysis suggests that the TolR Cys substitutions lie within the three previously characterized classes (Ref. 14 and Fig. 2): functional mutants (class I; all except L22C, D23C, and V24C), nonfunctional mutants (class II: D23C), and discriminative mutants (class III: L22C and V24C). This latter category includes mutations affecting TolQR channel activities, either at the level of channel formation (14) or prevention of conformational changes through disulfide bond formation between cysteine residues (15). Because of the nature of these substitutions, we suspected the L22C and V24C TolR proteins to dimerize. However, as seen on the helical wheel projection (Fig. 2), the Leu<sup>22</sup> and Val<sup>24</sup> residues are located on opposite faces, suggesting that if the TolR TMH dimerizes, helix rotation should occur. Alternatively, these

<sup>3</sup> E. L. Goemaere, L. Journet, I. Schalk, R. Lloubes, and E. Cascales, unpublished results.





**FIGURE 3. TolR residues involved in homodimer formation.** A,  $0.2 \times 10^8$  cells of the indicated strain were boiled in Laemmli buffer in presence of  $\beta$ -mercaptoethanol (+ $\beta$ ME, upper panel) or in absence of reducing agent ( $-\beta$ ME, lower panel), loaded onto 12.5% acrylamide SDS-PAGE, and immunodetected with anti-TolR polyclonal antibody. The positions of TolR and TolR dimers are indicated on the right. \*, low levels of dimerization; \*\*, high levels of dimerization. The molecular weight markers are indicated on the left. B, representation of results from A on a helical wheel projection. The interface of dimerization is indicated by the dotted line. Arrows indicate positions of substitutions that form dimers (solid arrows, high levels; dotted arrows, low levels).

and that rotation between the two helices is induced by torque generation by the TolQR ion channel.

## DISCUSSION

The TolQ, TolR, and TolA proteins form a complex at the inner membrane, interacting through their transmembrane segments, as evidenced using chemical cross-linking or isolation of allele-specific suppressive mutations (5–8, 12, 14). These led to the conclusion that the transmembrane helix of TolR is at the proximity of the helices II and III of TolQ, whereas TolQ transmembrane III contacts the transmembrane I, which is in interaction with the transmembrane anchor of the TolA protein. Stoichiometry analyses showed that the ratio of the TolQ-TolR-TolA complex is 4–6:2:1 (4, 12), adding further complexity in helix organization. However, trying to reconcile all the results and the faces of transmembrane segments in interaction has been shown to be difficult, raising the possibility that structural modifications and movements of helices during functioning may occur. The idea that the TolQRA complex undergoes conformational changes was first suggested by the observation that TolA interacts with the outer membrane-anchored peptidoglycan-associated lipoprotein Pal in a PMF- and TolQR-dependent manner (10, 12). Structural modifications of TolA dependent on PMF and on the TolQ and TolR proteins were demonstrated using protease accessibilities (13). Recently, we demonstrated using cysteine accessibilities that the C-terminal periplasmic domain of the TolR protein is subjected to structural modifications (15).

The observation that the TolQ and TolR helices share similarities, not only with the homologous ExbB and ExbD proteins

but also with the flagella stator components MotA and MotB, led to the idea that these three couples of proteins may share a common mechanism of energy transfer (12, 17, 18). This was exemplified by the presence of a conserved aspartate residue with TolR, ExbD, and MotB, which is critical for function (12, 30–32, 38). Following these studies, it has been proposed that the three helices (TolR, TolQ-II, and TolQ-III) may delimit a channel by which ions transit and that a “signal” is then transmitted to the TolA protein via the TolQ-I segment. An analysis of TolQ transmembrane residues further demonstrated that short length side chain residues are involved in helix packing, whereas hydrophilic residues may participate in the energy transduction mechanism (14). In the current model, which is actively tested in our laboratory, a dimer of TolR anchors is surrounded by four to six TolQ molecules, thus allowing the formation of four to six ion path-

ways, for which channel activity may be regulated by mechanical movements.

To determine how the TolQRA helices interact and how they undergo structural modifications, we performed a systematic cysteine scanning of the TolQRA helices. Here, we reported results obtained for the TolR TM helix. Our results clearly showed that cysteines from two distinct monomers are close enough to efficiently form a disulfide bond dimer without the aid of an oxidative agent. Similar results were obtained in a systematic cysteine scanning study of the flagellar MotB protein TMH (21). In the case of the TolR protein, this is clearly shown for the L22C and V24C mutants. Disulfide bond formation blocks TolR dimers, which prevents function of the Tol system and growth in presence of detergent. Interestingly, this phenotype is reversed by the addition of reducing agent in the medium, as shown for cysteine mutations occluding the SecY protein channel (39). On a perfect helical wheel projection of the TolR TMH, the Leu<sup>22</sup> and Val<sup>24</sup> residues are separated by an angle of  $\sim 160^\circ$ . In between, most substitutions form dimers, albeit at lower levels. These results raise the hypotheses (i) that the TolR transmembrane helix rotates between the two “extreme” positions (Leu<sup>22</sup> and Val<sup>24</sup>) using the “intermediate” positions such as molecular ratchet gears or cogwheels or (ii) that the transmembrane helix is subject to physical torsions or constraints in such a way that all these residues (intermediate and extreme) are located on a reduced, unique face. The first model has been proposed in light of similar results using the MotB transmembrane anchor as model system (21). In the case of MotB, projection on a similar wheel than the one used in Fig. 2 shows that the angle between the two extreme residues is

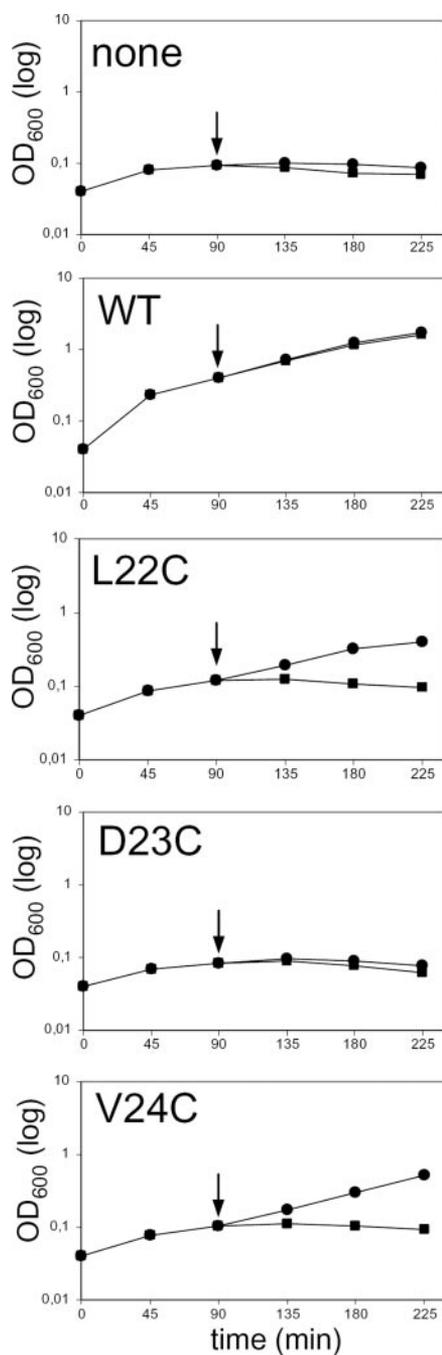


FIGURE 4. TolR functioning is specifically prevented by disulfide bond formation.  $10^9$  bacteria of the indicated strain were inoculated in 10 ml of medium in presence of 0.25% SDS, and growth was monitored by measuring absorbance at 600 nm every 45 min. After 90 min of culture, DTT was added (closed circles) or not (closed squares) to the final concentration of 5 mM (arrow).

~110°. However, these results cannot discriminate between the two hypotheses. One may hypothesize that in the absence of movement, the TolR dimer rotation will be stopped in both of the extreme positions (hypothesis (i) above), whereas all extreme and intermediate substitutions will still promote helix dimerization (hypothesis (ii) above). Our results using mutations that affect residues that regulate ion transit favor the first hypothesis. It seems thus likely that the two TolR helices from a dimer oscillate between two extreme conformations (Fig. 6). Alternatively, because the 4–6:2 stoichiometry of the TolQR

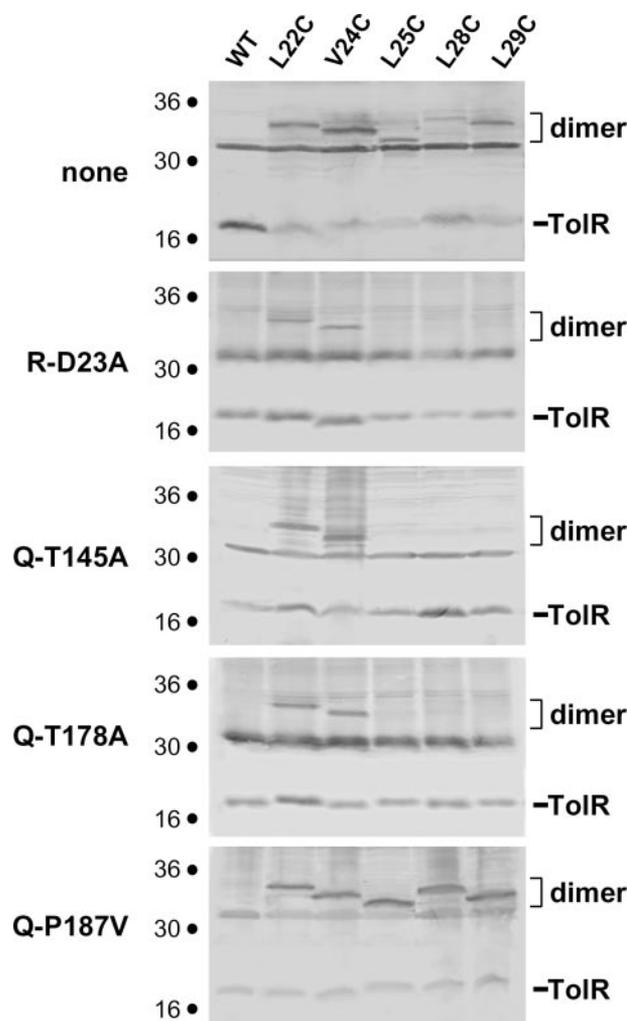
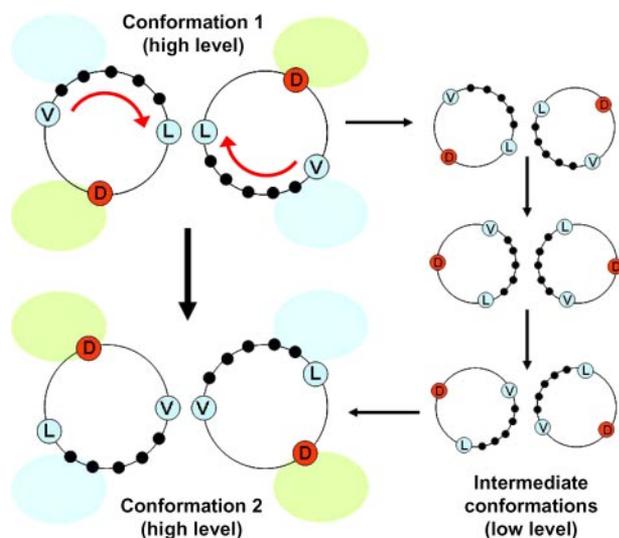


FIGURE 5. TolR anchor rotations depend on key residues of the ion pathway.  $0.2 \times 10^8$  cells producing the indicated TolR Cys substitution (lanes) in combination with the TolR or TolQ mutations (panels), treated with the oxidative agent copper (II) orthophenanthroline to increase dimer formation, were boiled in Laemmli buffer in absence of reducing agent, loaded onto 12.5% acrylamide SDS-PAGE, and immunodetected with anti-TolR polyclonal antibody. The positions of TolR and TolR dimers are indicated on the right. The molecular weight markers are indicated on the left. The mutant names on the top and on the left indicate positions of primary and secondary mutations, respectively.

complex represents the “minimal complex,” one may hypothesize that TolR form tetramers. In this case, both L22C and V24C substitutions may form disulfide bonds independently of helix rotation. However, this hypothesis can be ruled out because the L22C/V24C TolR double mutant only forms dimers as single substitutions do (data not shown).

The Asp<sup>23</sup> residue, which has been proposed to be critical for ion conduction, is located ~100° from either Leu<sup>22</sup> or Val<sup>24</sup> on a helical wheel projection (Fig. 2). Using the rotary motion, the Asp<sup>23</sup> residue may thus alternate between two different ion channels, as suggested for MotB. Such a rotation may thus place the Thr<sup>35</sup> residue at the position previously occupied by the Asp<sup>23</sup> residue in the channel. The presence of a hydrophilic residue at that position may thus stabilize the putative aqueous channel. The TolR T35C mutant displayed a WT phenotype, but mutation of the Thr<sup>35</sup> residue by an alanine confers cell sensitivity toward deoxycholate, but cells remain sensitive to



**FIGURE 6. A model for the TolR anchor rotary motion.** The TolR anchors from two distinct TolR molecules are represented at the extreme positions of the dimerization interface (corresponding to high levels of dimerization) and thus oscillate between conformations 1 and 2 (red arcs). This may involve passage through a number of intermediate conformations (corresponding to low levels of dimerization) such as molecular gears. The aspartate residue then oscillates between two channels, regulating opening (green areas, open or active channels) or closure (blue areas, closed or inactive channels).

colicins (data not shown), classifying such a mutation as discriminative (class III), suggesting a functional role of this residue in response to PMF. This implies that rotation of the TolR anchor is functionally important, which is confirmed by the fact that disulfide bond formation with TolR L22C or V24C lead to cells that are impaired in membrane integrity but still sensitive for colicin import (Tables 1 and 2).

Because the level of dimerization of the TolR L22C and V24C is higher than for the intermediate position, one may hypothesize that the time necessary to reach one extreme position from the other is fast and that the rotary motion stops transiently at the extreme positions. However, the TolR F32C and T35C mutant do not dimerize, even if these residues are located between the two extreme positions. This may suggest that the two TolR helices from a dimer are not close together on the whole length but rather are closer at the cytoplasmic side than at the periplasmic side of the inner membrane. This may account for the strong dimerization of Leu<sup>22</sup> and Val<sup>24</sup> residues, which are situated at the cytoplasmic side of the membrane; however, the Ile<sup>18</sup> and Leu<sup>21</sup> residues, which are located at the cytoplasmic side of the TolR helix, have intermediate dimerization properties. Our results showed that, similarly to TolR C-terminal domain movement (15), TolR helix rotation is regulated by three channel residues, the TolR Asp<sup>23</sup> residue and the Thr<sup>145</sup> and Thr<sup>178</sup> residues located on helices II and III of TolQ, respectively. In the case of the MotAB complex, it has been shown using protease accessibilities that MotA conformation is regulated by the MotB Asp residue (17). The discriminative mutation P187V does not abolish rotation, a result consistent with the observation that this residue does not regulate TolR C-terminal conformational modification (15). The TolQ Pro<sup>187</sup> residue has been shown to be required for the Tol complex functioning and has been suggested to couple ion transit to conformational changes (14). Our results suggest that TolR

anchors rotate independently of Pro<sup>187</sup>, which thus may regulate conformational modifications of TolQ.

Overall, our results showed that two helices from two different TolR molecules are close to each other in the TolQR complex. These two TolR TMHs rotate as molecular gears between two positions, L22C and V24C. This rotation is functionally important for activity of the TolQR ion channel.

*Acknowledgments*—We thank Denis Duché, Philippe Roche, Christophe Meynier, and members of the Llobès, Sturgis, and Bouveret teams for helpful discussions Denis Duché and Laure Journet for critical reading of the manuscript; and Cécile Ancieux for encouragement.

## REFERENCES

1. Webster, R.E. (1991) *Mol. Microbiol.* **5**, 1005–1011
2. Llobès, R., Cascales, E., Walburger, A., Bouveret, E., Lazdunski, C., Bernadac, A., and Journet, L. (2001) *Res. Microbiol.* **152**, 523–529
3. Gerding, M. A., Ogata, Y., Pecora, N. D., Niki, H., and de Boer, P. A. (2007) *Mol. Microbiol.* **63**, 1008–1025
4. Guihard, G., Boulanger, P., Benedetti, H., Llobès, R., Besnard, M., and Letellier, L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 5874–5880
5. Lazzaroni, J. C., Vianney, A., Popot, J. L., Benedetti, H., Samatey, F., Lazdunski, C., Portalier, R., and Geli, V. (1995) *J. Mol. Biol.* **246**, 1–7
6. Déroutiche, R., Bénédetti, H., Lazzaroni, J. C., Lazdunski, C., and Llobès, R. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 11078–11084
7. Germon, P., Clavel, T., Vianney, A., Portalier, R., and Lazzaroni, J. C. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 6433–6439
8. Journet, L., Rigal, A., Lazdunski, C., and Bénédetti, H. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 4476–4484
9. Bouveret, E., Déroutiche, R., Rigal, A., Llobès, R., Lazdunski, C., and Bénédetti, H. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 11071–11077
10. Cascales, E., Gavioli, M., Sturgis, J. N., and Llobès, R. (2000) *Mol. Microbiol.* **38**, 904–915
11. Walburger, A., Lazdunski, C., and Corda, Y. (2002) *Mol. Microbiol.* **44**, 695–708
12. Cascales, E., Llobès, R., and Sturgis, J. N. (2001) *Mol. Microbiol.* **42**, 795–807
13. Germon, P., Ray, M. C., Vianney, A., and Lazzaroni, J. C. (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 4110–4114
14. Goemaere, E. L., Cascales, E., and Llobès, R. (2007) *J. Mol. Biol.* **366**, 1424–1436
15. Goemaere, E. L., Devert, A., Llobès, R., and Cascales, E. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 17749–17757
16. Parsons, L. M., Grishaev, A., and Bax, A. (2008) *Biochemistry* **47**, 3131–3142
17. Kojima, S., and Blair, D. F. (2001) *Biochemistry* **40**, 13041–13050
18. Zhai, Y. F., Heijne, W., and Saier, M. H., Jr. (2003) *Biochim. Biophys. Acta* **1614**, 201–210
19. Higgs, P. I., Myers, P. S., and Postle, K. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 6031–6038
20. Garcia-Herrero, A., Peacock, R. S., Howard, S. P., and Vogel, H. J. (2007) *Mol. Microbiol.* **66**, 872–889
21. Braun, T. F., and Blair, D. F. (2001) *Biochemistry* **40**, 13051–13059
22. Braun, T. F., Al-Mawsawi, L. Q., Kojima, S., and Blair, D. F. (2004) *Biochemistry* **43**, 35–45
23. Higgs, P. I., Larsen, R. A., and Postle, K. (2002) *Mol. Microbiol.* **44**, 271–281
24. Sun, T. P., and Webster, R. E. (1987) *J. Bacteriol.* **169**, 2667–2674
25. Vieira, J., and Messing, J. (1991) *Gene (Amst.)* **100**, 189–194
26. Ansaldi, M., Lepelletier, M., and Méjean, V. (1996) *Anal. Biochem.* **234**, 110–111
27. Cascales, E., and Llobès, R. (2004) *Mol. Microbiol.* **51**, 873–885
28. Journet, L., Bouveret, E., Rigal, A., Llobès, R., Lazdunski, C., and Bénédetti, H. (2001) *Mol. Microbiol.* **42**, 331–344
29. Cascales, E., Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J. C., and Llobès, R.

## ToIR Transmembrane Helix Forms Homodimers

- (2002) *J. Bacteriol.* **184**, 754–759
30. Braun, V., Gaisser, S., Herrmann, C., Kampfenkel, K., Killmann, H., and Traub, I. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 2836–2845
31. Zhou, J., Sharp, L. L., Tang, H. L., Lloyd, S. A., Billings, S., Braun, T. F., and Blair, D. F. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 2729–2735
32. Kojima, S., Shoji, T., Asai, Y., Kawagishi, I., and Homma, M. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 3314–3318
33. Kojima, S., and Blair, D. F. (2004) *Int. Rev. Cytol.* **233**, 93–134
34. Kampfenkel, K., and Braun, V. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 4485–4491
35. Muller, M. M., Vianney, A., Lazzaroni, J. C., Webster, R. E., and Portalier, R. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 6059–6061
36. Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., and Cavard, D. (2007) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 158–229
37. Duché, D., Baty, D., Chartier, M., and Letellier, L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 24820–24825
38. Blair, D. F., Kim, D. Y., and Berg, H. C. (1991) *J. Bacteriol.* **173**, 4049–4055
39. Saparov, S. M., Erlandson, K., Cannon, K., Schaletzky, J., Schulman, S., Rapoport, T. A., and Pohl, P. (2007) *Mol. Cell.* **26**, 501–509

---

## CONCLUSION ET DISCUSSION

Ce travail démontre l'organisation de l'ancre transmembranaire de TolR en homodimères.

Nous avons mis en évidence une face d'interaction des hélices, opposée à celle de l'aspartate 23. De plus, nous pouvons proposer un modèle d'organisation dynamique oscillant entre deux conformations extrêmes. La protéine TolR est bloquée dans l'une ou l'autre de ces conformations lorsque que le canal ionique TolQ-TolR est bloqué par la mutation de chacun des résidus ionisables. De plus l'effet d'un réducteur durant la culture des cellules produisant TolR-L22C et -V24C a permis d'obtenir la réversibilité du phénotype mutant (discriminateur) en sauvage et de rendre la souche résistante aux détergents ajoutés dans le milieu de culture.

Ces deux conformations extrêmes de TolR pourraient se traduire par l'état ouvert ou fermé des canaux ioniques dans le modèle de moteur moléculaire TolQ-R-A proposé. Cette étude montre que les mouvements observés au niveau de l'extrémité C-terminale de TolR ([Goemaere, et al. 2007b](#)) sont en synergie avec ceux de l'ancre transmembranaire puisqu'ils sont dépendants des mêmes résidus ionisables.

Ces résultats sont en accord avec le modèle TolQ-TolR proposant 4 canaux ioniques: deux dans un état ouvert où se positionnerait l'aspartate 23 de TolR permettant ainsi le passage d'ions, et deux dans un état fermé. Nous avons vu que la thréonine 35 de l'ancre transmembranaire de TolR semble jouer un rôle dans la fonction du complexe TolQ-TolR ; en effet, sa mutation en alanine provoque un phénotype discriminateur. Ce phénotype n'a pas été observé pour le mutant T35C (sauvage), tout comme le cas du résidu Thr 145 du ST2 de TolQ : un phénotype différent est observé pour les mutations T145A (discriminateur) et T145C (sauvage) ([Goemaere, et al. 2007a](#)). Il semble alors que les propriétés de la chaîne latérale de la thréonine ou de la cystéine soient importantes pour assurer une fonction à cette position 35. La thréonine 35 serait donc un nouveau résidu important pour le fonctionnement du canal ionique. Ce résidu se trouve dans l'aire du canal ionique putatif en position fermée, il pourrait alors y assurer un rôle stabilisateur pour l'ouverture ou la fermeture du canal par l'interaction avec d'autres résidus. Il est intéressant de noter que ce résidu thréonine fait partie du consensus de TolR et ExbD (conservé à plus de 60%) ; pour MotB, on trouve une sérine (conservée à plus de 60%) un tour d'hélice plus haut.

La rotation des hélices transmembranaires l'une par rapport à l'autre entraînerait l'ouverture et la fermeture des canaux. Les deux mutants L22C et V24C entraînent une

dimérisation plus importante que les autres mutants de la face de dimérisation. Elle se traduit par un phénotype discriminatoire qui signifie que le moteur TolQ-R est bloqué. Ce phénotype n'est pas observé pour les autres mutants de la face de dimérisation, ce qui suggère que l'évènement de dimérisation n'est pas assez fréquent pour entraîner le blocage d'une quantité suffisante de moteur TolQ-R pour observer un phénotype discriminatoire. La différence observée entre les mutants L22C et V24C, et les autres mutants de la face de dimérisation indiquerait que le passage d'une conformation extrême à l'autre est un évènement rapide et qu'il y a un temps d'arrêt dans l'une ou l'autre de ces conformations.

Tout comme MotB, TolR interagit de manière dynamique au niveau de son segment transmembranaire. Cependant, ce travail nous montre une variation de l'amplitude de rotation entre les deux positions extrêmes:  $\approx 110^\circ$  pour MotB et  $\approx 160^\circ$  pour TolR. Ainsi, la face d'interaction des ancras de TolR est plus large et diamétralement opposée à l'aspartate 23. De plus, nous avons pu mettre en évidence un blocage du segment transmembranaire de TolR dans les conformations extrêmes. Ce blocage est dépendant des résidus clés du canal ionique (TolR-D23, TolQ-T145, TolQ-T178). Par des expériences de dégradation à la trypsine, il a été montré que la protonation de l'aspartate 32 de MotB induit un mouvement jusqu'à MotA (Kojima and Blair 2001; Kojima and Blair 2004a). En effet, le profil de dégradation de MotA est différent lors de la mutation de l'aspartate 32 de MotB, suggérant que le blocage du mouvement de MotB se répercute sur MotA. Pour le système Tol, le blocage pourrait se répercuter au niveau de TolA via le ST-1 de TolQ. Il a été montré que l'interaction TolA-Pal et le changement conformationnel de TolA sont tous deux dépendants du complexe TolQ-TolR et de son fonctionnement (Cascales, et al. 2000). Il est intéressant de noter que le blocage de TolR n'a pas lieu lors de la mutation de la proline 187 du ST-3 de TolQ qui pourtant possède un rôle essentiel pour le fonctionnement du moteur. Ce résultat rejoint l'hypothèse du rôle de ce résidu dans la transduction d'énergie mécanique et non d'un rôle direct au niveau du canal ionique.

Les informations recueillies à l'aide des études par « cystéine scanning », c'est-à-dire les interactions entre hélices au niveau de certains résidus, ainsi que l'accessibilité au solvant des résidus, pourront être appliquées à ce modèle. Les contraintes artificielles appliquées au modèle combinées à celles naturelles liées à la séquence des protéines devraient amener à un modèle d'organisation des hélices du moteur moléculaire TolQ-R dans la membrane.

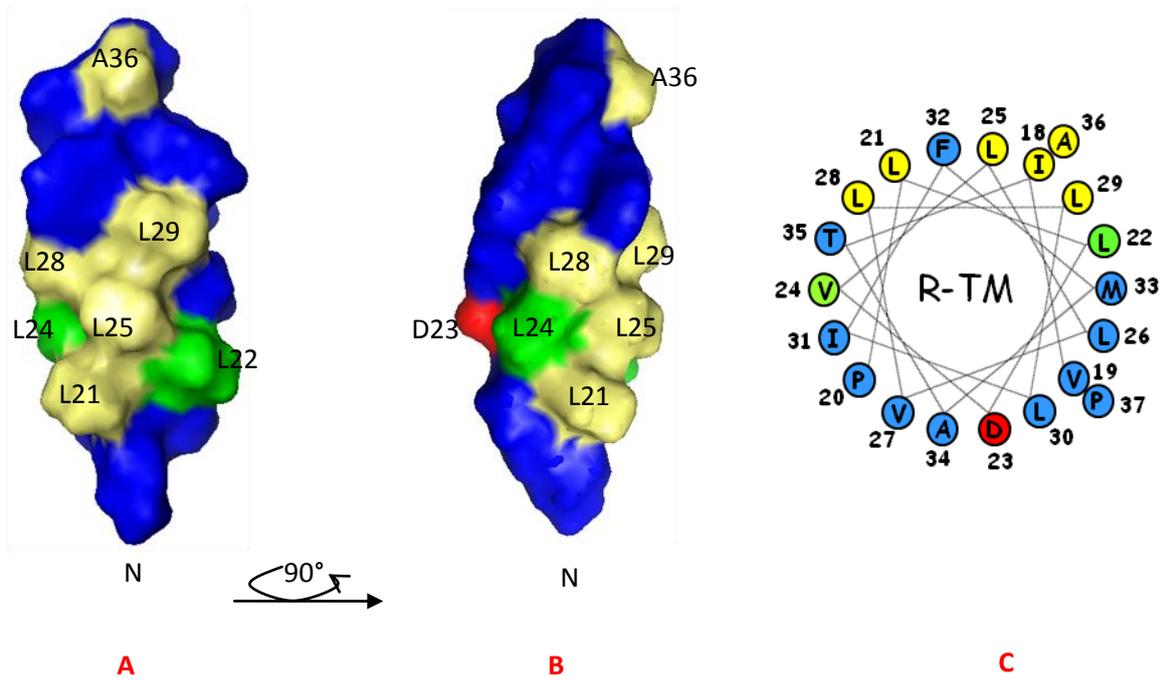
L'étude par cystéine scanning, nous révèle que le tiers supérieur de l'hélice (côté périplasmique), n'est pas impliqué dans la dimérisation de TolR (figure I-2). Cette information pourrait signifier que les ancres de TolR sous forme de dimère ne sont pas orientées de manière parallèle, mais plus rapprochées côté cytoplasmique, et plus éloignées côté périplasmique. Les études de « Tryptophane scanning » de MotB ont montré que la substitution est plus tolérante du côté périplasme que du côté cytoplasmique (Sharp, et al. 1995b). Ceci pourrait signifier que les hélices ne sont pas orientées de façon parallèle dans la membrane, et que l'angle entre l'axe de l'hélice et la surface de la membrane pourrait ne pas être 90°.

Cinq résidus ont été identifiés comme conservés selon l'alignement des séquences des 23 espèces de MotB, ExbD et TolR dans les différentes espèces. Sauf l'aspartate 23, la substitution des autres 4 résidus n'a pas eu d'impact sur le fonctionnement de TolR. Parmi les 4 résidus, L28 et L29 sont engagés dans l'interface de dimérisation. La proline 20 (n'est pas conservée chez système MotB) et la phénylalanine 32 (conservée parmi les 3 systèmes Tol, Mot et TonB) semblent de ne pas intervenir dans aucun de ces processus. Le rôle de ces deux résidus est à déterminer.

L'étude de l'orientation de l'ancre transmembranaire de TolR combinée à celle de son extrémité C-terminale nous montre que cette protéine est organisée en dimère dynamique. Le passage d'ions au travers du canal TolQ-TolR est corrélé à ce mouvement.

La protéine TolQ est importante pour ce complexe à plusieurs niveaux: deux de ces segments transmembranaires sont impliqués dans la formation du canal ionique; dans notre modèle, elle est le pivot de la transduction d'énergie vers TolA. En effet, le résidu P187 devrait jouer un rôle mécanique essentiel à la fonction du système Tol-Pal.

L'organisation de TolQ dans ce complexe reste à définir. L'objectif du travail suivant sera focalisé sur l'orientation des trois segments transmembranaires de TolQ et aussi sur l'organisation des protéines TolQ les unes par rapport aux autres.



**Figure I-2 : A, B : modélisation de l'hélice transmembranaire de TolR par Pymol®. C. Représentation en projection de l'hélice de TolR La surface d'hélice est colorée différemment afin de montrer les différentes interfaces C. Représentation de l'hélice transmembranaire de TolR en projection (vue du cytoplasme).**

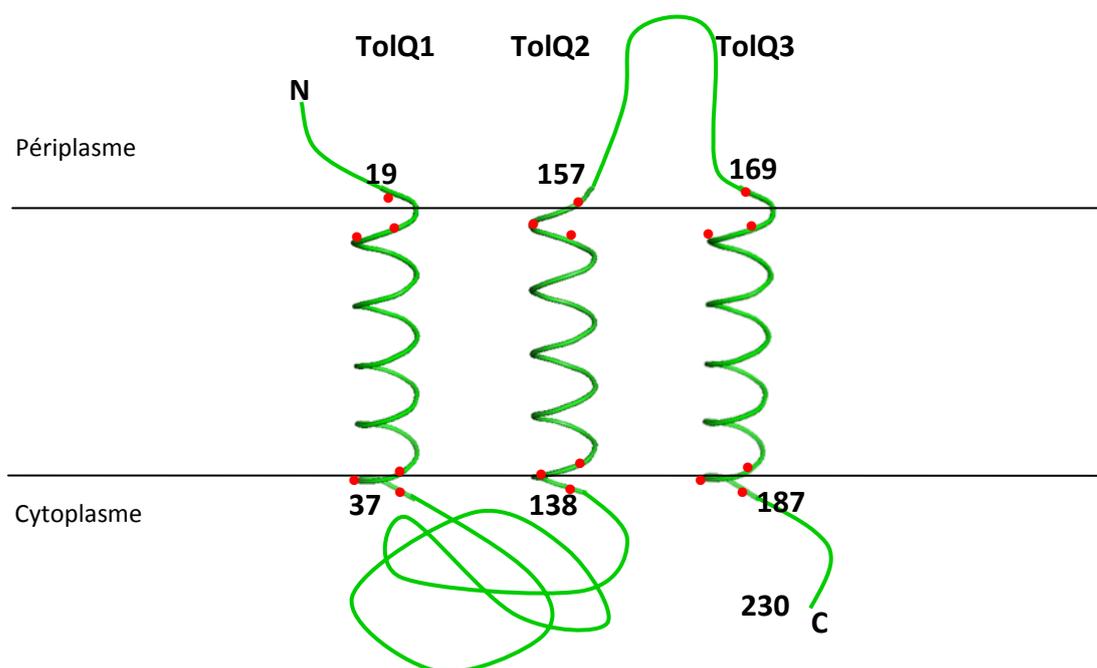
## ARTICLE II :

## Cartographie des interactions entre les sous-unités Tol d'*E. coli* :

### Interactions entre les segments transmembranaires de TolQ

## INTRODUCTION :

TolQ est une protéine intégrale de membrane qui possède 3 hélices transmembranaires avec son extrémité N-terminale localisée dans le périplasme et C-terminale dans le cytoplasme. Elle possède une petite boucle périplasmique et une grande boucle cytoplasmique formée d'environ 100 résidus (Bourdineaud, et al. 1989; Kampfenkel and Braun 1993; Vianney, et al. 1994). Un modèle a été proposé où elle formerait avec la protéine TolR un canal ionique au travers la membrane interne selon une stœchiométrie de 4-6 TolQ : 2 TolR. (Cascales, et al. 2001).



**Figure II-1 : Représentation en hélice de la structure de la protéine TolQ.** Les positions des résidus localisés aux extrémités des STs sont indiquées.

L'interaction des ST-TolQ1 et ST-TolQ3 a été validée par l'obtention d'un suppresseur L19P du mutant TolQ-177V (Lazzaroni, et al. 1995) ; celle des ST-TolQ2 et ST-TolQ3, par le couple mutant / suppresseur G144N / A184G (Goemaere, et al. 2007a). L'interaction entre les ST-TolQ2 et ST-TolQ3 fait intervenir un motif de petits résidus conservés G141xxG144xxxG148 sur une face de TolQ2 et deux résidus alanine (A177 et A184) sur une face de TolQ3. Ces faces d'interactions asymétriques ont été baptisées faces «Gly » et «Ala-Gly».

Cependant, il n'y a pas de preuve directe de la formation de dimère de TolQ. Si TolQ est bien sous forme multimérique, les données actuelles nous ne nous permettent pas de déterminer si les hélices en contact appartiennent à une même protéine TolQ ou à deux protéines TolQ en complexe. Toutefois, dans le cas du système TonB, des complexes homo-dimériques et trimériques d'ExbB ont été détectés (Higgs, et al. 1998). Pour MotA nous avons vu précédemment que son homo-dimérisation a été élucidé grâce à l'approche du « cystéine-scanning » (Braun, et al. 2004). Après avoir déterminé l'organisation de l'ancre transmembranaire de TolR sous forme d'homo-dimère (Article 1), nous avons poursuivi ce travail avec les 3 ST de TolQ. Nous avons réalisé dans un premier temps une série de simple mutant « cystéine » et caractérisé leur phénotype. A partir de ces premiers mutants nous avons alors choisi les résidus localisés au niveau de l'interface avec le périplasme et également avec le cytoplasme pour réaliser des doubles mutants cystéine.

---

**RESUME :**

En l'absence d'un anticorps efficace contre TolQ, une étiquette hémagglutinine (HA) a été insérée à l'extrémité C-terminale de TolQ afin de faciliter la détection de la protéine (Article 1 et cette étude). Une autre version étiquetée en C-terminal, TolQ-8His, a aussi été construite. Les tests de complémentation montrent que ces protéines TolQ étiquetées sont fonctionnelles.

Par pontage chimique *in vivo*, nous avons montré pour la première fois la formation de dimère de TolQ. Cette dimérisation est en accord avec le modèle d'organisation du complexe TolQ-R-A. Cependant nous n'observons pas de complexe de plus haut poids moléculaire, contrairement à ce que laisse supposer le modèle. Néanmoins, nous avons pu déterminer la

formation d'hétéro-dimères TolQ/TolR. La formation de ces hétérocomplexes est confirmée par la variation de migration observée à partir de mutants *tolR*.

Afin de comprendre l'organisation de TolQ dans la membrane, chaque résidu appartenant aux 3 STs de TolQ a été substitué par un résidu cystéine pour tester les interactions intermoléculaires.

Après avoir vérifié la production de chaque protéine mutée, leur implication dans la stabilité membranaire et l'importation des colicines a été testée. Chaque protéine mutée est finalement classée dans les trois catégories précédemment décrites.

Le phénotype des simples mutations en cystéine révèle que 4 substitutions donnent le phénotype non fonctionnel : Gly 141 et Gly 144 (ST-TolQ2), Leu 182 et Glu 173 (ST-TolQ3).

Gly141 et Gly144 font partie d'un motif GxxG étant identifié comme un motif d'interaction hélice-hélice (Bowie 2005; Curran and Engelman 2003). L'importance de ces deux résidus a été démontrée par Goemaere *et coll.* en 2007. Le résidu Glutamate 173 est localisé au niveau inférieur de ST-TolQ2. Le défaut phénotypique de cette substitution montre son rôle important dans la transduction des ions et aussi dans l'assemblage du complexe TolR-TolQ. Le résidu Leucine 182 se trouve sur une face de ST-TolQ3 contenant des mutations discriminatrices. Ce résultat propose que cette face soit importante pour la fonction du canal ionique.

A l'exception de trois résidus, la substitution des résidus de TolQ1 en cystéine ne perturbe pas sa fonction. Ces trois résidus conférant des mutations discriminatrices, se trouvent sur la même face de TolQ1 (Figure II-2). En 1998, Germon *et coll.* ont identifié des mutations suppressives des résidus du motif SHLS de TolA au niveau de l'hélice I de TolQ suggérant qu'une face d'hélice TolQ1 soit en interaction avec TolA.

Les résultats des tests de dimérisation de TolQ montrent que les doubles mutants Q37C/I185C, Q37C/P186C et L36C/P138C, L36C/P139C, L36C/P140C forment des ponts intramoléculaires ; le mutant I20C/A155C forme un dimère entre TolQ1 et TolQ2. Autrement dit au sein d'une même molécule, le segment transmembranaire TolQ1 interagit avec TolQ2 et TolQ3; de plus, TolQ1 interagit avec TolQ2 impliquant deux molécules TolQ.



Il est intéressant de noter que la mutation G157C provoque la formation d'un dimère, la double mutation G157C/P169C donne naissance à des formes multimériques. Deux hypothèses peuvent nous permettre d'expliquer la formation de multimères. La première hypothèse serait que la dimérisation de G157C favorise l'interaction entre deux P169C de TolQ3.. Cette hypothèse oriente les interactions hélices de TolQ en -(TolQ3-TolQ2)-(TolQ2-TolQ3)-... La deuxième hypothèse est que G157C soit pontée avec P169C. Cette interaction donnerait la configuration suivante : -(TolQ2-TolQ3)- (interaction hétéro-cystéines). Pour choisir entre ces deux hypothèses, nous avons construit les doubles mutants Y139C/P187C et G157C/I186C. Les résultats montrent que seul G157C/I186C est capable de former un dimère et ne multimérise pas. Ceci est en faveur de la 2<sup>ème</sup> hypothèse et permet de maintenir le modèle proposé par Cascales *et coll.* (2001) où l'on suppose que l'interaction homo-cystéine TolQ2-TolQ2 aurait lieu entre les complexes TolQ-TolR. D'autres expériences seront nécessaires pour valider ou invalider ce modèle.



# MAPPING THE INTERACTIONS BETWEEN *Escherichia coli* TolQ TRANSMEMBRANE SEGMENTS

Xiang Y.-Z. Zhang, Emilie L. Goemaere, Nadir Seddiki,

Hervé Célia, Marthe Gavioli, Eric Cascales and Roland Lloubes

Laboratoire d'Ingenierie des Systemes Macromoleculaires UPR9027

CNRS-Aix-Marseille Université, 31 chemin Joseph Aiguier

13402 Marseille cedex 20, France

Running head : TolQ membrane helix organization

Address correspondence to: Roland Lloubes, Laboratoire d'Ingenierie des Systemes

Macromoleculaires UPR9027, CNRS-Aix-Marseille Université, 31 chemin Joseph Aiguier

13402 Marseille cedex 20, France

Phone. 33 491 16 45 61; Fax. 33 491 71 21 24; E-Mail: roland.lloubes@ifr88.cnrs-mrs.fr

The *tolQRAB-pal* operon is conserved in Gram-negative genomes. The TolQRA proteins of *Escherichia coli* form an inner membrane complex in which TolQR uses the proton-motive force to regulate TolA conformation and its *in vivo* interaction with the outer membrane Pal lipoprotein. This complex is suspected to form a (minimal) TolQ: TolR ratio of 4-6:2 with one TolA molecule, therefore involving interactions between multiple transmembrane helices (TMHs) which correspond to one TolR, one TolA and three TolQ TMHs. It has been proposed that an ion channel forms at the interface between two TolQ and one TolR TMHs involving TolR-Asp23 and TolQ-Thr145 and TolQ-Thr178 residues. To define the organization of the TMHs of the TolQR complex, we constructed epitope-tagged versions of TolQ. Immunodetection of *in vivo* and *in vitro* chemically cross-linked TolQ proteins

showed that TolQ exists as multimers in the complex. To understand how TolQ multimerizes, we initiated a cysteine-scanning study. Results of single and tandem cysteine substitution suggest a dynamic model of helix interactions in which the hairpin formed by the two last TMHs of TolQ change conformation while the first TMH of TolQ forms intramolecular interaction. These results associated with those related to genetic and biochemical interactions previously deciphered on the TolQ-TolR TMHs suggest that ionic channel depends on TolQ and TolR TMHs movements.

The Tol-Pal proteins of the *Escherichia coli* cell envelope are critical for maintenance of outer membrane stability (1, 2). In many bacteria, including pathogenic strains, mutations within the genes encoding these proteins display a lethal phenotype,

suggesting that the Tol-Pal proteins fulfill essential function in the bacterial cell (1). A role of this system in the late stages of cell division has been proposed (3). *pal* is currently an essential gene in *Caulobacter crescentus* which product has been suspected to anchor the BAM complex to the peptidoglycan layer (4). Recently, Yeh and coworkers (5) showed that the Tol-Pal proteins of *C. crescentus* mediates the localization of a polar factor through TolA-Pal-TipN interactions and suggested that Tol-Pal complex is a key component of cell envelope structure and polar development. Two proteins, TolB and Pal, form a complex associated to the outer membrane (6-8). TolQ, TolR and TolA locate in the inner membrane. TolR and TolA possess one transmembrane helix (TMH) with the bulk of the protein protruding in the periplasm (9, 10). TolQ has three TMHs (11). The three inner membrane proteins TolQ, TolR and TolA interact through their TMHs with a stoichiometry of 4-6:2:1 (12, 13). Pairwise interactions have been detected using chemical cross-linking or isolation of suppressive mutations (12, 14-18). Taken together, these results enabled the building of a first model of organization of the Tol TMHs in the inner membrane. In addition, the observation that TolR TMH and TolQ TMH2 and TMH3 share residue conservation with respectively ExbD TMH and ExbB TMH2 and TMH3 and with MotB TMH and MotA TMH3 and TMH4, suggested that these couples may share similar mechanisms (12, 19, 20). ExbBD and MotAB have been shown to convert the chemical energy from the ion or proton gradient of the

IM to mechanical movements that lead to import of siderophores and to flagellar rotation respectively (for reviews, see (21, 22)). Conformational changes within the complex or associated proteins have been demonstrated in the case of TonB or MotA (23, 22). Similarly, TolA has been shown to change conformation and to interact *in vivo* with Pal in response to proton-motive force (PMF) in a process dependent on TolQ and TolR (12, 24, 25). Parallel studies on the TolQR, ExbBD and MotAB complexes have suggested the existence of a ion channel delimited by three helices corresponding to TolR, TolQ-II and TolQ-III in the case of the TolQR complex (12, 14, 26-28). Hydrophilic residues that lie within this channel include a conserved aspartate residue in TolR and two threonine residues in the case of TolQ (12, 29). The model is even more complex since these proteins display structural modifications in response to PMF. Ion transit in this channel regulates TolR/MotB anchor rotation (19, 30) and subsequent movement of the TolR C-terminal periplasmic domain (29) or interaction of the ExbD periplasmic domain with TonB (31). No structural information is currently available for the TolQ-TolR, ExbB-ExbD or MotA-MotB membrane complexes but the three-dimensional structures of the soluble periplasmic regions of ExbD and TolR have been reported (32, 33). To gain insights on the organization of the TM segments within the complex, we started a systematic cysteine-scanning approach. This technique has been widely used, mainly to understand how inner membrane complexes organize in the



are reported as the maximal dilution of the colicin stock sufficient to inhibit cell growth. (colicin dilutions between  $10^{-6}$  to  $10^{-9}$  M).

*In vivo disulfide bond formation and immunodetection.* Cysteine scanning was essentially carried out as previously described (29, 30) with slight modifications.  $8 \times 10^8$  exponentially growing cells were harvested and resuspended in 1 ml of 20 mM sodium phosphate buffer (PBS) pH6.8 and then treated for 10 min with 2.5 mM N-ethylmaleimide (NEM; Sigma) to block reduced thiol groups. When required, cells were treated with the oxidative catalyst copper (II) orthophenanthroline 0.3 mM (CuOP; Sigma) prior washing in sodium phosphate buffer and blocking with NEM. After centrifugation, cell pellets were resuspended in Laemmli loading buffer in presence or absence of the reducing agent  $\beta$ -mercapto-ethanol. To ensure similar oxidized environmental conditions for cysteines at the periplasmic and cytoplasmic sides of the TMH, cells were broken and membrane were recovered under two conditions. Cell suspensions were either sonicated or 4 times frozen and thawed. In the first case the membrane pellet was resuspended in PBS buffer and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  before use while in the second case membrane suspension was treated by NEM before analyses.

*In vivo cross-linking and immunodetections.* Formaldehyde cross-linking was performed as previously described (15). Proteins were separated on an SDS-PAGE and immunodetections were performed

with the indicated pAb or the anti-HA (Roche) or the anti-His-5 (Quiagen) mAbs and secondary antibodies coupled to alkaline phosphatase using 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate (Sigma) and nitroblue tetrazolium (Sigma).

*Protein purifications.* 8His-TolQ and 8His-TolQ-G157C were purified from membrane fractions treated by Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Membrane proteins were extracted using 1% n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (DDM), 20mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM NaCl buffer. Purification was performed using Nickel resin (Quiagen) and IMAC procedures. The working buffer used for purifications correspond to same buffer but lowered to 0.1% DDM. Eluted material was checked by SDS-PAGE analyses and imidazole was removed from purified proteins either using dialysis or anion exchange chromatography.

## RESULTS

*Tagged TolQ is functional.* Because of the lack of availability of specific anti-sera, the TolQ protein has never been immunodetected using western-blot, precluding any characterization. Interactions involving TolQ have been identified through cross-linking and immunodetection using anti-TolR or anti-TolA polyclonal antibodies (15-17). The plasmids pOK-QHA and pQ8R encoding TolQ fused with a C-terminal hemagglutinine (HA) epitope or a 8His tag were constructed. Immunoblot analyzes were performed on cell

extracts of strains expressing TolQHA from pOK-QHA or TolQ8H from pQ8R. We detected a protein of ~ 30 kDa, consistent with the predicted TolQ molecular mass. To determine whether the addition of the C-terminal tags affected TolQ function, outer membrane stability was assayed by the level of periplasmic release and of deoxycholate (DOC) sensitivity of *tolQR* TPS13 strain expressing TolQHA and TolR (from the compatible plasmid pUC-R) or expressing TolQ8H and TolR (from pQ8R). Colicin import was assayed by the level of sensitivity to the TolQ-dependent colicins A, E3 and E9. The HA-tagged TolQ or 8His-TolQ protein were found fully functional for both properties (data not shown).

*In vivo cross-linking identifies specific TolQ complexes.* To determine whether interactions involving the TolQ protein might be visualized upon chemical cross-linking, we treated living cells expressing TolQHA with formaldehyde (FA) as described in Material and Methods. Two major complexes containing the TolQHA protein were observed, with relative migrations of ~43 kDa (complex 43) and ~ 52 kDa (complex 52). According to their apparent molecular masses, and with the observation that complex 43 disappeared in cells which do not produce the TolR protein, these complexes may correspond to TolQHA-TolR and TolQHA homodimers respectively (Fig.1A). These complexes involve transmembrane or cytoplasmic segments since utilization of the membrane-impermeant chemical cross-linkers ethylene glycol-

bis(succinimidylsuccinate) (EGS), dithiobis(succinimidylpropionate) (DSP), and dimethyl apimidate (DMA) did not allow complex formation (data not shown). All these complexes were not observed with TolQ expressed instead of TolQHA. However, immunodetections using various mutants indicated that none of these complexes contained the TolA, TolB or the Pal subunits (data not shown). Two other high molecular weight complexes are also observed (a and b marks in Fig. 1A) and are suspected to associate TolR with TolQ multimers since they disappear in cells which do not produce the TolR protein. To determine whether TolQ interacts with itself, we cloned the *tolQ* gene fused to a C-terminal 8-histidine tag, and both TolQ8H and TolQHA were produced into the same cell. Co-immunoprecipitation and pull-down experiments using anti-HA beads demonstrated that TolQ8H and TolQHA interact (Fig. 1C). Results leading to similar conclusions were found using metal affinity beads (data not shown). To confirm these results, we purified the TolQ8H protein from membrane solubilized with DDM and tested for its capacity to form multimers *in vitro* upon formaldehyde cross-linking. Results displayed in Figure 1B showed that TolQ8H dimerizes.

*Cysteine scanning of the TolQ TMHs identifies homodimers.* To determine how TolQ interacts with itself in the membrane, we performed a systematic cysteine scanning study substituting each residue of the TolQ TMHs. Total membrane extracts were treated with the thiol-blocking agent N-ethyl

maleimide (NEM) and analyzed using non-reducing SDS-PAGE. The results of western blotting indicated that all the TolQ mutants could be detected easily and that two residues, I154C and G157C, present on the same face of TMH2, separated by one helix turn, and close to the periplasmic side, formed homodimers (Fig. S1). These dimers were not observed in presence of reducing agent (not shown). Because the experiments were performed with membrane suspensions and could reflect artifactual cysteine oxidizations, the experiments were repeated with cell producing TolQHA or overproducing TolQ8H that were directly treated by NEM. The construction of the TolQ8H variants was restricted to residues located at the extremities of TolQ TMHs and to the additional 154 and 155 residues present in TolQ TMH2. The results of cysteine interactions on intact cells overproducing or not TolQ, confirm that TolQ-I154C or -G157C formed homodimer whereas TolQ-A155C remained as a monomer. The addition of oxidizing agent copper-orthophenanthroline (Cuop) resulted in an increase of homodimer formation (Cys154 and Cys157) but Cuop had no effect to cross-link the other residues except the TolQ-P169C, on intact (Fig. 2A) or disrupted cells (not shown). Moreover, Coomassie blue staining of purified TolQ-G157C further indicated that the amount of dimer was significant even in absence of Cuop (Fig. 2B). The absence of homodimer formation under oxidizing conditions of residues located close to the cytoplasmic side of TMH2 suggest that two TMH2 contact each other by the same face of the periplasmic side

of the TMH but either TolQ TMH2 is kinked or that two TMH2 are not organized in parallel in the membrane.

The phenotypes of the *tolQ* mutants were analyzed by testing i) their sensitivity to colicin (two group A colicins A and E2 and one group B colicin D, and ii) the outer membrane integrity using bacterial growth on deoxy-cholate (DOC) plates (Table 1). The results are summarized in Figure 3 according to a color code: absence of defective phenotype (blue; wild-type phenotype), outer membrane defect and colicin resistance (red; *tol* phenotype), and OM defect and colicin sensitivity (cyan; discriminative phenotype) (14). The outer membrane integrity being dependent on a functional TolQRA complex as a pmf-driven motor, the mutant phenotype might be due to Tol proteins stability or assembly defects. Group A colicin import being independent of the TolQRA functioning as a pmf-driven motor, discriminative mutations are obtained when the Tol proteins are produced and assembled, but affected at the level of ion transit, conformational modification, or blockage in constrained conformation (14). Most cysteine substitutions that confer *tol* and discriminative phenotypes are located on one discrete face of TMH1 close to the cytoplasm (S28-S31-I35), two discrete faces of TMH2 (G141-G144-G148 and Y139-L142-V146), also close to the cytoplasm, and distributed all along TMH3 (Fig. 3A). The results of this cysteine scanning study were compared with those of TolQ site directed mutagenesis which specifically modified small lateral chains and hydrophilic residues (14).

Comparable phenotypes were obtained for substitutions except few mutations for which the bulk or the charge of the lateral chains differ from that of a cysteine (Fig. S2).

*Tandem cysteine cross-linking identifies intra- and inter-molecular interactions between TolQ TM segments.* To define the overall organization of TolQ multimers, we performed a tandem cysteine scanning of residues belonging to two different TMHs (Fig. 3B). Combinations between three residues located at the cytoplasmic side and three at the periplasmic side led to 54 double Cys substitutions (Fig. 4A). These TolQ cysteine mutants were further tested for their ability to form disulfide bonds (Fig. S3). Membrane extracts were treated with NEM and the results of the western-blot revealed four immunodetection profiles of TolQHA: i) monomer, ii) dimer (inter-molecular S-S bridge), iii) high-order multimers and iv) slight aberrant TolQHA gel shift mobility. Migration of these samples in reducing conditions led to immunodetection of TolQHA monomers and to normal mobility of the class (iv) (Fig. 4B). This latter class therefore reflects intra-molecular disulfide bond formation.

Western blot immunodetections of TolQHA double cysteine mutants revealed intermolecular interactions between TMH2 and TMH3 residues located at the cytoplasmic (Y139-A185, Y139-I186 and I140-A185) or at the periplasmic sides (A155-P169, G157-P169 and G157-G170). Cysteine residues 155 and 157 were also able to form dimers with the remaining cysteine residues present on the

other TMH (A155-G170, -I171; G157-I171) but at very low level compared to those described before. Weak dimers are also observed at cytoplasmic and periplasmic interfaces (L156-P169, -G170, and -I171; I20-A155; Q37-Y139 and -I140). Intramolecular interactions were detected between TMH1 and TMH2 (I36-P138, -Y139 and -I140), as well as between TMH1 and TMH3 (Q37-A185 and -I186) (Fig. S3). In some cases, weak dimers were also observed in association with strong intramolecular interactions (Q37-I186; I36-P138 and -Y139). Importantly, no intra-molecular disulfide bridge between TMH2 and TMH3 could be detected as no aberrant mobility was observed for the corresponding tandem substitution. Since G157C substitution alone resulted in homodimer formation, the dimers that contain G157C were not considered, except for the double substitution G157-P169 for which gave multimers.

To avoid oxidation artefacts due to membrane preparation in absence of NEM, we reproduced the experiments with whole cells. Cells were washed in presence of NEM to block all sulfhydryl groups prior to resuspension in loading buffer. In these conditions, cysteine residues located at the periplasmic side were able to cross-link as well as observed with membrane preparation, while no cross-link was detected for cysteines that are close to the cytoplasmic side, as expected from the natural reducing environment conditions of the cytoplasm (data not shown). To verify that multimer formation was not an artefact due to the tag, as reported for ExbB (31), we constructed a T7 vector encoding

TolQ8H-G157C-P169C and TolR. Similarly, both TolQ proteins overproduced in the BL21(DE3) strain, multimers were observed under NEM treatment indicating that multimerization did not result from oxidation artefact. While four high molecular weight multimers can be detected under basal production (Fig. 4B) an additional multimer was obtained under overproduced conditions (Fig. 4C). The effect of CuOP on intact cells overproducing TolQ8H-G157C-P169C resulted in lowering the amounts of TolQ8H monomer and dimer, and increasing the signal of higher multimeric forms with the addition of one supplementary band (Fig. 4C). Thus, TolQ forms high multimeric complexes that are maintained under overproduced conditions. These stable multimers (between four to six multimers) were obtained under heat denatured SDS-PAGE conditions. According to their molecular masses, they may correspond to interacting TolQ subunits present in one Tol complex or in adjacent Tol complexes. Beside their strong multimerization process, it appears that these double Cys substitutions confer strong defective phenotypes as indicated thereafter.

It is interesting to point out that while the G157C mutation confer little membrane defect (see DOC results in Table 1), the addition of P169C mutation (discriminative mutant) increases colicin and membrane phenotypes (giving *tol* mutant). This indicated that double cysteine substitution results in an additive defective phenotype which either depend on individual mutation or/and on disulfide bridge formation. In general, we

observed that the phenotypic effects of the tandem substitutions (Table 2) could result from additive effects.

To understand how the TolQ double Cys substitution interacts, we checked whether overproduced TolQ8H-G157C-P169C multimers result from i) homo-cysteine interactions in which the TolQ-G157C homodimers (TMH2-TMH2 interaction) may induce TolQ-P169C homodimerization (giving TMH2-TMH2 and TMH3-TMH3 multimers), or ii) hetero-cysteine interactions between G157C and P169C (giving TMH2-TMH3 multimers). Thus, we checked if a second cysteine substitution present on a same face of the helix, but located at the other side was able to form multimers and constructed the *tolQHA-G157C-P187C* mutant. We further check multimer formation of the TolQHA-Y139C-I186C (clearly observed upon oxidized condition, not shown) and constructed the *tolQHA-G157C-I186C* variant. Cells producing these TolQHA double Cysteine mutations were broken by freeze and thaw and further treated by NEM before analyses. Resuspended membranes were subjected to western-blotting immunodetections using anti-HA as previously performed. No multimer could be observed with both TolQHA-G157C-I186C and TolQHA-Y139C-I186C (Table 2). Accordingly, while TolQ-G157C induces TMH2-TMH2 dimerization, all the results argue in favor of multimers that are formed by cysteine residues belonging to TMH2-G157C and TMH3-P169C and between those of the TMH2-Y139C and TMH3-I186C giving TMH2-TMH3 multimers.

## DISCUSSION

The TolQRA proteins of the Tol-Pal system form a complex in the inner membrane. Evidences from genetic and biochemical studies have demonstrated pairwise interactions between transmembrane segments. Using formaldehyde cross-linking, TolR has been shown to form dimers and to interact with both TolQ and TolA (17). TolA has been shown to interact with both TolQ and TolR using similar approaches (15). Isolation of suppressive mutations also brought information on heterodimer formation. Suppressive mutations of the non functional TolQ mutants, A177V (TMH3) (18) or T145A (TMH2), were found in TolR anchor whereas a suppressive mutation of the TolR D23A mutant was isolated in TolQ TMH3 (14). The TolA TMH segment interacts with TolQ TMH1, as shown by suppressive mutation of the conserved His22 residue of TolA TMH (16). Within TolQ, a number of other intragenic suppressive mutations were identified, including the couples Gly144 (TMH2) / Ala184 (TMH3) and Ala177 (TMH3) / Leu19 (TMH1) (14, 18). The lack of effective TolQ antibody prevented studies on this protein. Using functional tagged TolQ we were able to demonstrate that TolQ interacts with TolR and with itself. Formation of TolQ multimers was confirmed by co-immunoprecipitation and *in vitro* cross-linking experiments using purified His-tagged TolQ protein. Formation of homodimers or homotrimers had been previously shown for

the homologous ExbB protein using formaldehyde cross-linking (42) and ExbB has recently been shown to form a stable oligomer in the membrane containing 4-6 molecules (43). Using same cross-linking technique, we were able to detect complexes involving at least two TolQ associated with TolR molecules.

To determine the overall organisation of TolQ helices, we performed a cysteine-scanning approach on the residues present in the three transmembrane segments. The results indicate that two residues Ile154 and Gly157 located on a same face at the periplasmic side of TMH2 and separated by one turn of helix were involved in dimer formation. The same dimers were detected on intact cells (NEM treated) overproducing TolQ variants, or both TolQ variants and TolR. Then, results indicate that TolQ homodimerization is TolR independent and may reflect an interaction of TolQ TMH2 either within a same TolQR complex, or between two adjacent TolQR complexes. To broaden the homo-cysteine dimerization results observed in TolQ-TMH2, we performed cysteine substitutions on the same conserved residue of ExbB. Then, we compared dimerization between overproduced ExbB and TolQ. The I157C and A160C residue substitutions of ExbB-TMH2, corresponding respectively to Ile154 and Gly157 residues of TolQ, were also able to form dimer while no dimerization was observed for ExbB-G158C (not shown) that would correspond to TolQ-A155C. These results indicate that TolQ and ExbB proteins are both able to interact and form homo-

cysteine dimer through a homologous face of the TMH2. These results appear to have a link with those of the cysteine scanning of the PomA TMH3-TMH4 hairpin which were found to homodimerize suggesting an adjacent location of two PomA subunits (44).

As for the MotA TMHs of the flagellar motor (27, 45), we investigated tandem cysteine mutations. We limited our study to three residues located at the cytoplasmic or periplasmic sides of the TMHs and constructed 54 mutants that we analyzed for their interaction and cell phenotypes. As discussed below, because of the large number of helices involved in TolQ-TolR complex assembly, and of their probable conformational changes, a model is difficult to draw. The results presented here bring new information that we will use to tentatively draw an overall organization of the TMHs. As well, the results obtained from genetic, cysteine or tryptophane-scanning approaches on the MotAB complex are difficult to reconcile all together in a simple, static model (45). We try to show TMHs organization taking into account all the previous suppressor studies and the present cysteine scanning results in a minimal model of organization of the TolQR TMHs (Fig. 5). In a first study, we reported a minimal model formed by four TolQ molecules and two TolR molecules (12). In the new model TolR harbors the two helix conformations previously described (30) and two TolQ conformations that accommodate most of the interactions described previously and in this study. Then, the putative channels formed by the TolQ TMH2-TMH3 and TolR TMH are shown

under four different states. As we suspected dynamic movements for TolQ TMHs, we tried to reverse the negative phenotypic effects suspected to be induced by cysteine disulfide bridges. For this purpose, we added the DTT reducing agent on bacteria grown in liquid LB medium containing 0.5% SDS, as previously performed with cells producing TolR dimers (29, 30). We used two double cysteine *tolQ* mutants for which tandem cysteine mutations increased phenotypic defects and resulted in disulfide bridge formation, G157C-P169C and I140C-A185C (for which no detectable cysteine cross-link is observed in the cytoplasmic environment). In both cases the addition of up to 5 mM DTT was found to maintain bacterial growth inhibition effect of SDS (not shown). Then, as opposed to TolR, the absence of reversible effect may be explained either by i) the additional phenotypic defects of two TolQ cysteine substitutions which cannot be overcome by disrupting disulfide bridge, or ii) the difficulty to reduce TolQ cysteine cross-link under liquid growth conditions.

Sequence conservation between the TolQR, ExbBD and MotAB (or PomAB) TMHs of various Gram negative bacteria harboring polar residues have been described (12). Recently, Terashima *et al.* (46) added new interest on this comparison as they identified the PomB D24N suppressor in PomA-TMH4 exactly at the same residue position than the TolR D23A suppressor found in the TolQ TMH3 (14). In the TolQ-TolR model, three residues are good candidates to trap ion at the periplasmic side of the putative

channel. These residues correspond to His151, Glu173 of TolQ and Thr35 of TolR. Because E173L or E173Q mutations are deleterious for membrane integrity and that these mutations were suppressed by the H151E second mutation, the results of Goemaere *et al.* (14) indicate that the presence of an acidic residue is required for Tol function. It is noteworthy that the conserved Glu176 residue of ExbB-TMH3 (same than Glu173 of TolQ-TMH3) has also been shown essential for TonB function (28). In addition, the Thr-35 residue of TolR TMH is important for membrane integrity according to the phenotype of the T35A mutation residue which confers cell sensitivity toward deoxycholate (discriminative phenotype, 30). Moreover, this Thr residue is conserved in the ExbD and TolR sequences (>60% conservation) deduced from various genomes (12)

The four channels previously hypothesized are shown in the minimal TolQ-TolR model (12) but in the present model these they are shown under nonconductive conformations (Fig.5). The TolR-TMH, TolQ-TMH2 and TMH3 may arrange conformational transitions to allow ionic pathway from the periplasm to the cytoplasm. At the periplasmic side, three residues, TolR-T35, TolQ-H151 and TolQ-E173, may form one ion binding pocket (“a” chamber in Fig. 5) followed by a second one containing the TolQ-T145, TolQ-T178 and TolR-D23 residues (“c” chamber in Fig. 5) which may be involved in ion transit and release. In such model, the GxxxG motif involved in the TMH2-TMH3 hairpin interaction of TolQ molecule (14) may adopt

conformational changes. Either this motif may interact differently to allow TMH2 and TMH3 rotations as cog-wheels, or either the hairpin conformation remains dynamic. This transit can be compared to that shown in the model of Lauger (47) proposed by Kojima and Blair for the MotAB in which the stator adopts protonated and unprotonated conformational changes (48). It is of interest to mention that concerted conformational changes and rotation mechanism have been described for energy driven systems such as the efflux pump and AcrB protein (38) or the F1Fo ATPase (49).

Under aerobic cell growth condition and basal production, TolQ multimers were detected by SDS-PAGE in absence of reducing treatment with the G157C-P169C, G157C-G170C and A155C-P169C substitutions as well as with overproduced TolQ-G157C-P169C. Previous data suggested a ratio of 4 to 6 TolQ and 2 TolR for one TolA molecule (13, 12). Under various iron growth conditions, a ratio of 7:2:1 has been measured for the ExbB-ExbD-TonB complex (50) while a 4:2 stoichiometry has been proposed for the MotAB complex (22). The minimal model containing four TolQ and two TolR molecules (Fig. 5) suggest that dynamic movement may be involved to reconcile all the interaction and particularly the TolQ-G157C homodimer interaction. This TMH2-TMH2 interaction could be improved either by adding TolQ subunit(s) or by adding an adjacent TolQR complex in the TolQR model. The minimal model presented here gives a recent and visual map of all the interaction of the inner membrane Tol complex. Future experiments

devoted to biochemical knowledge of purified of the complex or if Tol complexes can  
 or reconstituted Tol proteins and Tol complex associate.  
 are required to define the precise stoichiometry

## REFERENCES

1. Lloubès, R., Cascales, E., Walburger, A., Bouveret, E., Lazdunski, C., Bernadac, A., and Journet, L. (2001) *Res. Microbiol* **152**, 523-529
2. Lazzaroni, J. C., Germon, P., Ray, M. C., and Vianney, A. (1999) *FEMS Microbiol. Lett* **177**, 191-197
3. Gerding, M. A., Ogata, Y., Pecora, N. D., Niki, H., and de Boer, P. A. J. (2007) *Mol. Microbiol* **63**, 1008-1025
4. Anwari, K., Poggio, S., Perry, A., Gatsos, X., Ramarathinam, S. H., Williamson, N. A., Noinaj, N., Buchanan, S., Gabriel, K., Purcell, A. W., Jacobs-Wagner, C., and Lithgow, T. (2010) *PLoS ONE* **5**, e8619
5. Yeh, Y., Comolli, L. R., Downing, K. H., Shapiro, L., and McAdams, H. H. (2010) *J Bacteriol* [online] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20693330> (Accessed September 14, 2010).
6. Bouveret, E., Derouiche, R., Rigal, A., Lloubès, R., Lazdunski, C., and Bénédicti, H. (1995) *J. Biol. Chem* **270**, 11071-11077
7. Cascales, E. and Lloubès, R. (2004) *Mol. Microbiol* **51**, 873-885
8. Bonsor, D. A., Hecht, O., Vankemmelbeke, M., Sharma, A., Krachler, A. M., Housden, N. G., Lilly, K. J., James, R., Moore, G. R., and Kleanthous, C. (2009) *EMBO J* **28**, 2846-2857
9. Levengood-Freyermuth, S. K., Click, E. M., and Webster, R. E. (1993) *J. Bacteriol* **175**, 222-228
10. Muller, M. M., Vianney, A., Lazzaroni, J. C., Webster, R. E., and Portalier, R. (1993) *J. Bacteriol* **175**, 6059-6061
11. Vianney, A., Lewin, T. M., Beyer, W. F., Lazzaroni, J. C., Portalier, R., and Webster, R. E. (1994) *J. Bacteriol* **176**, 822-829
12. Cascales, E., Lloubès, R., and Sturgis, J. N. (2001) *Mol. Microbiol* **42**, 795-807
13. Guihard, G., Boulanger, P., Bénédicti, H., Lloubès, R., Besnard, M., and Letellier, L. (1994) *J. Biol. Chem* **269**, 5874-5880
14. Goemaere, E. L., Cascales, E., and Lloubès, R. (2007) *J. Mol. Biol* **366**, 1424-1436
15. Derouiche, R., Bénédicti, H., Lazzaroni, J. C., Lazdunski, C., and Lloubès, R. (1995) *J. Biol. Chem* **270**, 11078-11084
16. Germon, P., Clavel, T., Vianney, A., Portalier, R., and Lazzaroni, J. C. (1998) *J. Bacteriol* **180**, 6433-6439
17. Journet, L., Rigal, A., Lazdunski, C., and Bénédicti, H. (1999) *J. Bacteriol* **181**, 4476-4484
18. Lazzaroni, J. C., Vianney, A., Popot, J. L., Bénédicti, H., Samatey, F., Lazdunski, C., Portalier, R., and Géli, V. (1995) *J. Mol. Biol* **246**, 1-7
19. Braun, T. F. and Blair, D. F. (2001) *Biochemistry* **40**, 13051-13059
20. Zhai, Y. F., Heijne, W., and Saier, M. H. (2003) *Biochim. Biophys. Acta* **1614**, 201-210
21. Postle, K. and Kadner, R. J. (2003) *Mol. Microbiol* **49**, 869-882
22. Kojima, S. and Blair, D. F. (2004) *Biochemistry* **43**, 26-34
23. Larsen, R. A., Thomas, M. G., and Postle, K. (1999) *Mol. Microbiol* **31**, 1809-1824
24. Germon, P., Ray, M. C., Vianney, A., and Lazzaroni, J. C. (2001) *J. Bacteriol* **183**, 4110-4114
25. Cascales, E., Gavioli, M., Sturgis, J. N., and Lloubès, R. (2000) *Mol. Microbiol* **38**, 904-915
26. Blair, D. F. and Berg, H. C. (1991) *J. Mol. Biol* **221**, 1433-1442
27. Braun, T. F., Al-Mawsawi, L. Q., Kojima, S., and Blair, D. F. (2004) *Biochemistry* **43**, 35-45
28. Braun, V. and Herrmann, C. (2004) *J. Bacteriol* **186**, 4402-4406
29. Goemaere, E. L., Devert, A., Lloubès, R., and Cascales, E. (2007) *J. Biol. Chem* **282**, 17749-17757
30. Zhang, X. Y., Goemaere, E. L., Thomé, R., Gavioli, M., Cascales, E., and Lloubès, R. (2009) *J. Biol. Chem* **284**, 4275-4282
31. Ollis, A. A., Manning, M., Held, K. G., and Postle, K. (2009) *Mol. Microbiol* **73**, 466-481
32. Garcia-Herrero, A., Peacock, R. S., Howard, S. P., and Vogel, H. J. (2007) *Mol. Microbiol* **66**, 872-889
33. Parsons, L. M., Grishaev, A., and Bax, A. (2008) *Biochemistry* **47**, 3131-3142

34. Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H. R., and Iwata, S. (2003) *Science* **301**, 610-615
35. Ding, P. Z., Weissborn, A. C., and Wilson, T. H. (2001) *J. Membr. Biol* **183**, 33-38
36. Hermolin, J., Dmitriev, O. Y., Zhang, Y., and Fillingame, R. H. (1999) *J. Biol. Chem* **274**, 17011-17016
37. Lee, G. F., Dutton, D. P., and Hazelbauer, G. L. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **92**, 5416-5420
38. Seeger, M. A., von Ballmoos, C., Eicher, T., Brandstätter, L., Verrey, F., Diederichs, K., and Pos, K. M. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol* **15**, 199-205
39. Sun, T. P. and Webster, R. E. (1986) *J. Bacteriol* **165**, 107-115
40. Barnéoud-Arnoulet, A., Gavioli, M., Lloubès, R., and Cascales, E. (2010) *J Bacteriol* [online] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870776> (Accessed September 30, 2010).
41. van den Ent, F. and Löwe, J. (2006) *J. Biochem. Biophys. Methods* **67**, 67-74
42. Higgs, P. I., Myers, P. S., and Postle, K. (1998) *J. Bacteriol* **180**, 6031-6038
43. Pramanik, A., Zhang, F., Schwarz, H., Schreiber, F., and Braun, V. (2010) *Biochemistry* [online] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20799747> (Accessed September 30, 2010).
44. Yorimitsu, T., Asai, Y., Sato, K., and Homma, M. (2000) *J. Biol. Chem* **275**, 31387-31391
45. Kim, E. A., Price-Carter, M., Carlquist, W. C., and Blair, D. F. (2008) *Biochemistry* **47**, 11332-11339
46. Terashima, H., Koike, M., Kojima, S., and Homma, M. (2010) *J Bacteriol* [online] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20729351> (Accessed September 14, 2010).
47. Läuger, P. (1988) *Biophys. J* **53**, 877-884
48. Kojima, S. and Blair, D. F. (2004) *Int. Rev. Cytol* **233**, 93-134
49. Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R., and Walker, J. E. (1994) *Nature* **370**, 621-628
50. Higgs, P. I., Larsen, R. A., and Postle, K. (2002) *Mol. Microbiol* **44**, 271-281

#### FOOTNOTES

We thank Denis Duché, James Sturgis and Jean-Pierre Duneau for helpful discussions, Marthe Gavioli for technical help and Denis Bars for encouragements. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and a grant from the Agence National de la Recherche (SODATOL [ANR-07-BLAN-67]). X.Z.-Y.Z. is supported by SODATOL, and E.L.G was supported by a Fondation pour la Recherche Medicale (FRM) one year fellowship.

Table 1: Phenotypes of strains producing Cys-substituted TolQ proteins.

TPS13 cells expressing wt *tolR* from pUCR plasmid and *tolQ* derivatives from pOK compatible plasmid were tested for the import of group A colicins A and E2 (Tol-dependent) and group B colicin D (Ton-dependent), and susceptibility to deoxycholate (DOC). Colicin sensitivity was tested on bacterial lawns by the spot dilution assay. The number represents the maximal 10-fold dilution of the colicin stock still able to kill the strain (R, resistant; killing dilution value between 1 to 4) while underlined numbers correspond to turbid halo of cell lysis. Deoxycholate resistance was tested by 10-fold dilutions of the strain and the corresponding numbers represent the maximal dilution able to form colonies on 1% DOC LB plates (R, resistant; S, sensitive; or dilution value). Homodimer formation is indicated by + and the mutation phenotype: B (blue) wt, C (cyan) *tol* and R (red) for discriminative mutants.

Mutation	colicin activities			OM stability DOC	dimer	phenotype
	A	E2	D			
WT	4	4	4	R	-	B
No TolQ	R	R	4	S	-	R
L19C	4	4	4	R	-	B
I20C	4	4	4	R	-	B
M21C	4	4	4	R	-	B
L22C	4	4	4	R	-	B
I23C	4	4	4	3	-	B
L24C	4	4	4	3	-	B
I25C	<u>4</u>	<u>4</u>	4	3	-	B
G26C	4	4	4	R	-	B
F27C	4	4	4	R	-	B
S28C	4	4	4	1	-	C
I29C	4	4	4	3	-	B
A30C	<u>4</u>	4	4	3	-	B
S31C	<u>3</u>	<u>3</u>	4	1	-	C
W32C	4	4	4	R	-	B
A33C	4	4	4	3	-	B
I34C	4	4	4	3	-	B
I35C	4	4	4	1	-	C
I36C	4	4	4	3	-	B
Q37C	<u>4</u>	4	4	3	-	B

Mutation	colicin activities			OM stability	dimer	phenotype
	A	E2	D	DOC		
P138C	4	4	4	1	-	C
Y139C	4	4	4	S	-	C
I140C	4	4	4	R	-	B
G141C	R	R	4	S	-	R
L142C	4	4	4	1	-	C
F143C	4	4	4	3	-	B
G144C	R	R	4	S	-	R
T145C	4	4	4	R	-	B
V146C	3	4	4	1	-	C
W147C	3	4	4	R	-	B
G148C	<u>2</u>	<u>2</u>	4	S	-	C
I149C	4	4	4	3	-	B
M150C	4	4	4	1	-	C
H151C	4	4	4	R	-	B
A152C	4	4	4	3	-	B
F153C	4	4	4	2	-	C
I154C	4	4	4	R	+	B
A155C	3	4	4	3	-	B
L156C	<u>3</u>	<u>4</u>	4	3	-	B
G157C	4	4	4	3	+	B

Mutation	colicin activities			OM stability	dimer	phenotype
	A	E2	D	DOC		
P169C	3	4	4	1	-	C
G170C	4	4	4	R	-	B
I171C	2	3	4	3	-	B
A172C	4	4	4	R	-	B
E173C	R	R	4	1	-	R
A174C	4	4	4	1	-	C
L175C	3	4	4	S	-	C
I176C	4	4	4	R	-	B
A177C	<u>3</u>	<u>3</u>	4	S	-	C
T178C	4	4	4	1	-	C
A179C	4	4	4	R	-	B
I180C	4	4	4	R	-	B
G181C	<u>4</u>	<u>4</u>	4	1	-	C
L182C	R	R	4	S	-	R
F183C	4	4	4	3	-	B
A184C	4	4	4	R	-	B
A185C	4	4	4	R	-	B
I186C	3	3	4	1	-	C
P187C	4	4	4	S	-	C

Table 2: TolQ double Cys mutations.

Same legend than Table 1 except the complex formation lane with x, in and (di) that correspond respectively to multimer, intramolecular and weak intermolecular interactions.

Mutation periplasmic side	colicin activities			DOC	complex formation	phenotype
	A	E2	D			
WT	4	4	4	R	-	B
No TolQ	R	R	4	S	-	R
L19C / A155C	4	4	4	3	-	B
L19C / L156C	4	4	4	3	-	B
L19C / G157C	4	4	4	R	(di)	B
L19C / P169C	<u>3</u>	<u>3</u>	4	S	-	C
L19C / G170C	4	4	4	3	-	B
L19C / I171C	4	4	4	R	-	B
I20C / A155C	4	4	4	3	(di)	B
I20C / L156C	4	4	4	1	-	C
I20C / G157C	4	3	4	S	di	C
I20C / P169C	<u>3</u>	<u>3</u>	4	S	-	C
I20C / G170C	4	4	4	2	-	C
I20C / I171C	4	4	4	3	-	B
M21C / A155C	4	4	4	3	-	B
M21C / L156C	4	4	4	3	-	B
M21C / G157C	4	4	4	1	di	C
M21C / P169C	R	R	4	S	-	R
M21C / G170C	4	4	4	1	-	C
M21C / I171C	4	4	4	3	-	B
A155C / P169C	<u>3</u>	<u>3</u>	4	S	x	C
A155C / G170C	4	4	4	S	(di)	C
A155C / I171C	4	4	4	1	(di)	C
L156C / P169C	<u>3</u>	<u>3</u>	4	S	(di)	C
L156C / G170C	<u>2</u>	<u>2</u>	4	S	(di)	C
L156C / I171C	4	4	4	1	(di)	C
G157C / P169C	R	R	4	S	x	R
G157C / G170C	<u>4</u>	<u>4</u>	4	1	x	C
G157C / I171C	4	4	4	1	(di)	C

Mutation cytoplasmic side	colicin activities			DOC	complex formation	phenotype
	A	E2	D			
I35C/P138C	<u>4</u>	<u>4</u>	4	1	-	C
I35C/Y139C	<u>4</u>	<u>4</u>	4	1	-	C
I35C/I140C	4	4	4	2	-	C
I35C/A185C	<u>4</u>	<u>4</u>	4	1	-	C
I35C/I186C	4	4	4	1	-	C
I35C/P187C	<u>3</u>	<u>3</u>	4	1	-	C
I36C/P138C	4	4	4	2	in-(di)	C
I36C/Y139C	4	4	4	1	in-(di)	C
I36C/I140C	4	4	4	3	in	B
I36C/A185C	4	4	4	1	-	C
I36C/I186C	<u>3</u>	<u>2</u>	4	1	-	C
I36C/P187C	<u>4</u>	<u>3</u>	4	2	-	C
Q37C/P138C	4	4	4	2	-	C
Q37C/Y139C	<u>3</u>	<u>3</u>	4	1	(di)	C
Q37C/I140C	4	4	4	2	(di)	C
Q37C/A185C	4	4	4	R	in	B
Q37C/I186C	<u>3</u>	<u>2</u>	4	2	in-(di)	C
Q37C/P187C	<u>4</u>	<u>2</u>	4	2	(di)	C
P138C/A185C	<u>3</u>	<u>3</u>	4	2	-	C
P138C/I186C	4	4	4	1	-	C
P138C/P187C	R	R	4	S	-	R
Y139C/A185C	4	4	4	1	di	C
Y139C/I186C	3	2	4	S	di	C
Y139C/P187C	<u>3</u>	<u>2</u>	4	1	-	C
I140C/A185C	4	4	4	1	di	C
I140C/I186C	3	2	4	S	-	C
I140C/P187C	<u>4</u>	<u>3</u>	4	S	-	C
<b>Supplementary mutation</b>						
G157C/I186C	R	R	4	1	di	R
G157C/P187C	2	2	4	1	di	C

## FIGURE LEGENDS

Fig. 1. TolQ forms multimers. (A) *In vivo* formaldehyde (FA) cross-linking of *tolQ* cells harboring the indicated plasmids. About  $0.4 \times 10^8$  cells were pelleted, resuspended in Laemli buffer, heated, loaded on SDS-PAGE (12% acrylamide) and immunodetected using anti-HA monoclonal antibody (mAb). The complexes 43, 52, a and b are indicated. (B) Purified TolQ8H extracted in DDM (concentration at about 0.1 mg/ml) was treated or not with FA and immunodetected using anti-His5 mAb. (C) The immunoprecipitation of TolQHA from membrane extracts of *tolQ* cells producing TolQ8H, TolQHA and *tolQ* cells producing both proteins simultaneously was immunodetected using anti-HA mAb (top figure) or anti-His5 mAb. Positions of prestained molecular mass markers of 16, 30, 36, 50, 64 and 98 kDa are indicated on the left of the A and B pannels.

Fig. 2. TolQ TMH2 dimerization. (A) About  $0.4 \times 10^7$  cells, heat treated in Laemli buffer, were loaded on SDS-PAGE (12% acrylamide) and analyzed by western-blot immunodetections using anti-His5 mAb. Tuner (DE3) cells producing the indicated TolQ variants were treated with 0.2 mM IPTG for 4 hours at 25°C. Cells resuspended in PBS were treated or not by 0.3 mM Cuop followed with 2.5 mM NEM. (B) Coomassie blue stained SDS-PAGE of TolQ-G157C purified from DDM solubilized membranes of Tuner (DE3) cells. - / + correspond to  $\beta$ -mercapto-ethanol reducing treatment. Prestained molecular mass markers of 30, 36, 50, 64 and 98 kDa are indicated

Fig. 3. Summary of TolQ cysteine substitutions phenotypes. (A) The TolQ TMHs residues are shown on a helical wheel projection from the periplasmic to the cytoplasmic side. Residue numbered on the outside of the wheel and continuous line are located on the periplasmic side while residue numbered inside and dashed lines correspond to the cytoplasmic side. The three colors code describes the phenotype: blue for wt, cyan for discriminative (non functional for the PMF-dependent outer membrane integrity and functional for group A colicin import) and red for *tol* mutant. Only the residues used in the tandem cysteine scanning are indicated, except the I154C residue. The cysteine scanning results of the THM of TolR (30) are depicted with the same color code. (B) Schematic lateral view of TolQ and TolR TMHs in wich residues used for tandem cysteine scanning are indicated in orange. Residues that are suspected to be involved in ion transit are dashed.

Fig. 4. Tandem cysteine scanning of TolQ TMHs. (A) Residues present at the cytoplasmic and periplasmic extremities of the TolQ TMHs. All the combinations of two residues present at the cytoplasmic or periplasmic side substituted by cysteine were checked. (B) Heat denatured samples corresponding to about  $0.4 \times 10^8$  cells were loaded on a 12% SDS-PAGE and analyzed by western-blot immunodetections using anti-HA mAb. Exponentially growing TPS13 pUC-R-pOK-QHA cells

producing TolQHA variants were broken by sonication. The membrane pellets were resuspended and treated by NEM before analyses. TolQ multimers are shown by arrows or by an asterisk in case intramolecular S-S bond. The TolQ cysteine variants correspond to: wt, TolQ157, TolQ157-169 and TolQ37-186 (lanes 1 to 4, respectively). Bottom panel corresponds to the same samples treated with reducing agent,  $\beta$ -mercapto-ethanol. (C) About  $0.4 \times 10^7$  Tuner (DE3) pOKT7Q8Rs IPTG induced cells were treated or not by CuOp and further analyzed by western blot immunodetection using anti-His5 mAb. Prestained molecular mass markers of 30, 36, 50, 64 and 98 kDa are indicated on the left and arrows on the right show the TolQ monomeric and multimeric forms.

Fig. 5. Summary of the TolQ and TolR TMH interactions. All the TolQ-TolR residues in interaction are shown in the minimal model formed by four TolQ and two TolR molecules. Continuous lines correspond to interactions located at the periplasmic side, dashed lines at the cytoplasmic side. Thin black lines represent suppressors of TMH3-A177V. Black lines, red and magenta lines correspond respectively to suppressors and to inter and to intra-molecular disulfide bridges. The THM2-TMH2 interaction is indicated by a double line. TolQ TMH2-TMH3 and TolR TMH form four different channel conformations (a-d resulting from the combination of two TolQ and two TolR conformations). TolR residues that form homodimers (30) are shown by black dots. Each residue presented in the model is define in the respective TMH. A summary of all known suppressors and cysteine dimers is shown in the table are referenced on the model.

Figure 1

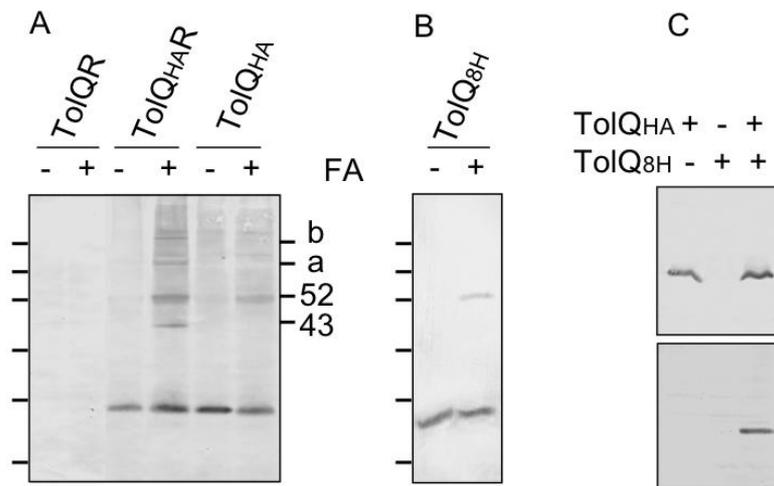


Figure 2

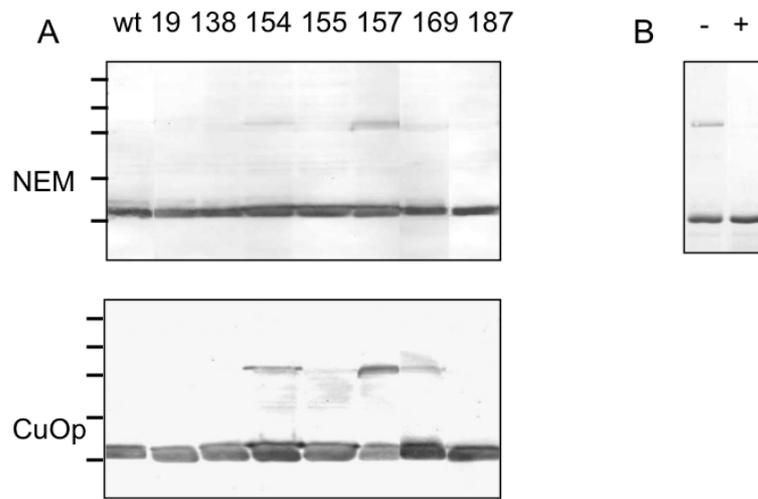


Figure 3

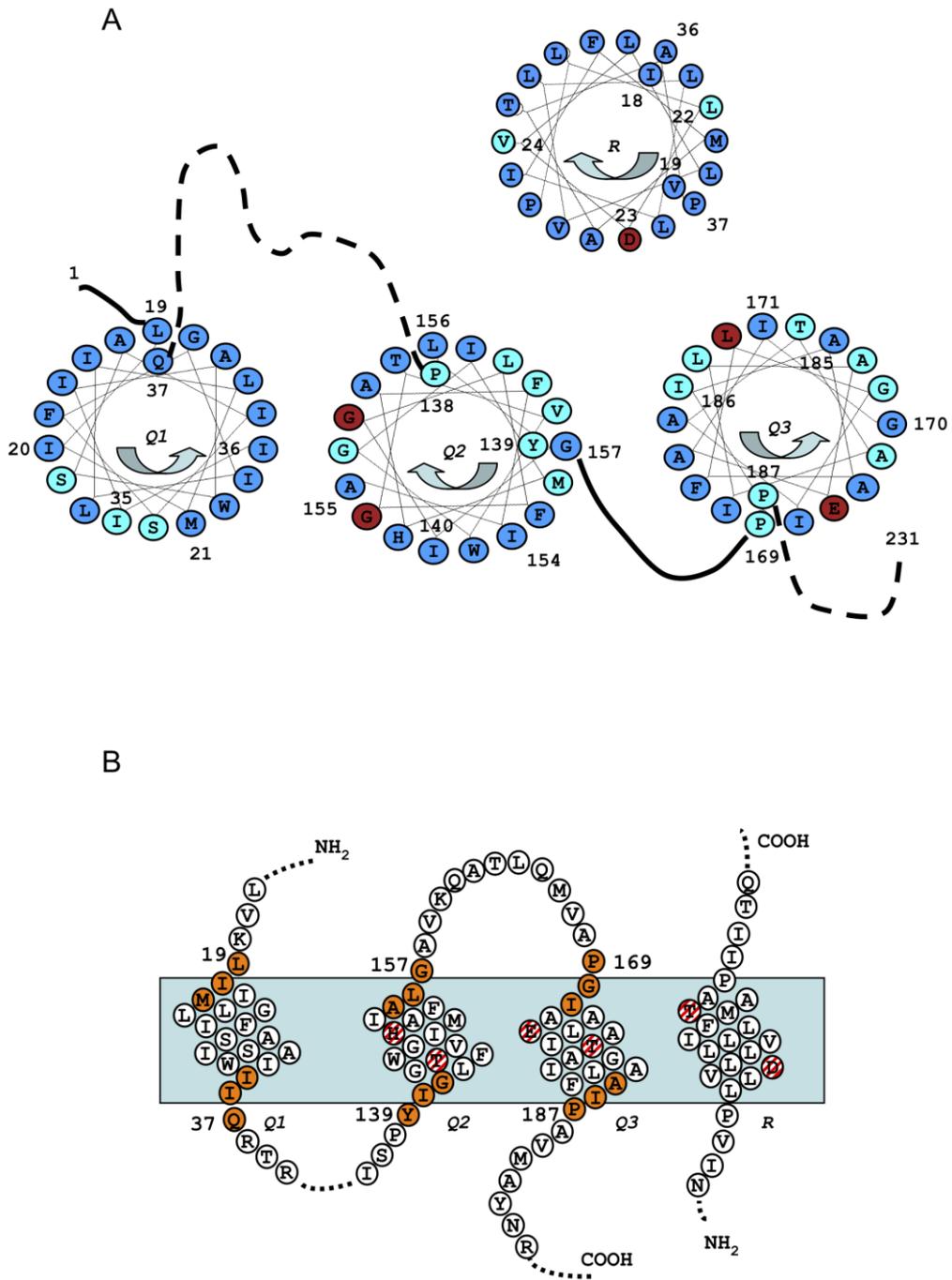


Figure 4

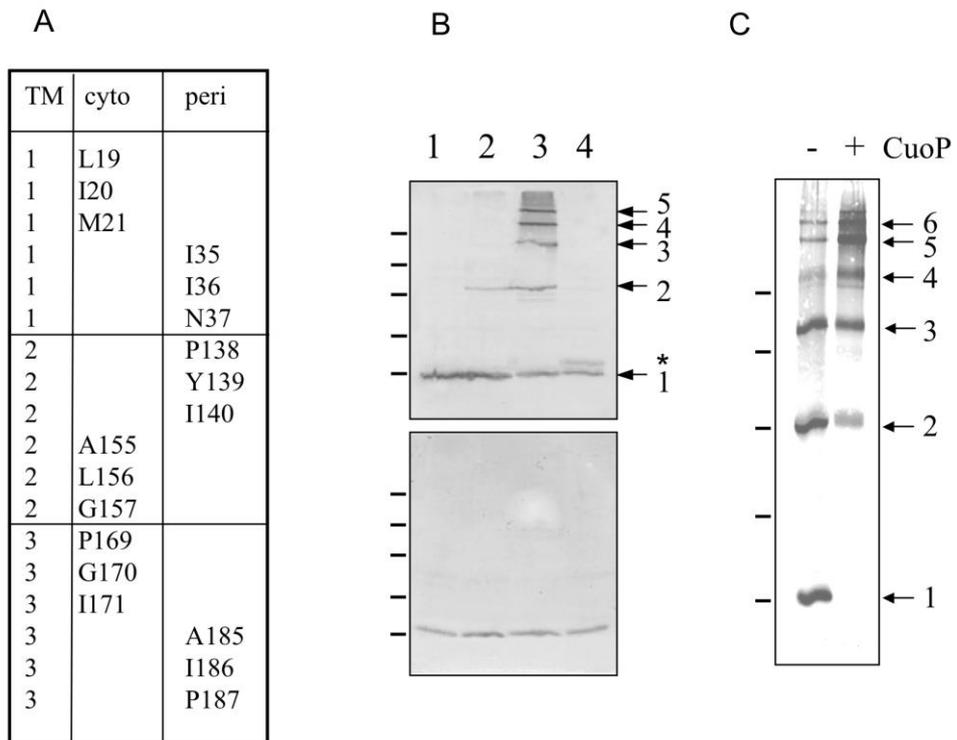
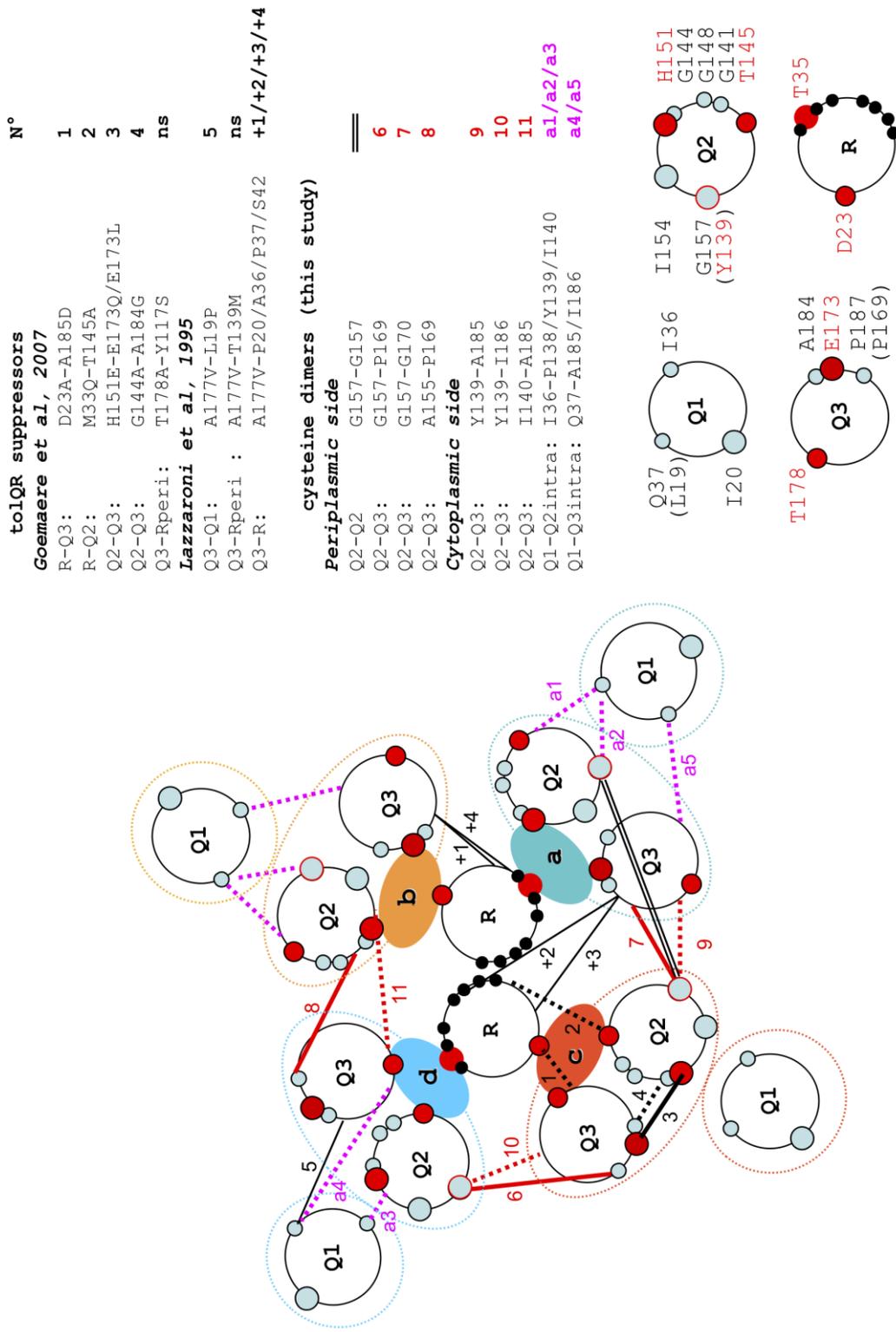


Figure 5



## Zhang *et al.*, Supplemental data

Fig. S1. Cysteine scanning of TolQ TMHs. Heat treated samples, corresponding to about  $0.4 \times 10^8$  cells, were loaded on a 12% SDS-PAGE and analyzed by western-blot immunodetections using anti-HA mAb. Exponentially growing TPS13 pUC-R-pOK-QHA cells producing the indicated TolQHA variants were pelleted and further broken by sonication. The membrane pellets were resuspended and treated with 2.5 mM NEM before analyses. Prestained molecular mass markers (Mm) of 30, 36, 50 and 64 kDa are shown.

Fig. S2. Comparative phenotypic analyses of the *tolQ* TMH2-3 point mutants. (A) Site directed mutagenesis of small and polar residues present in TolQ TMH2-3 and phenotypic effects of the corresponding residue mutations (shown inside the helical wheel) are represented by the same color code than in the Figure 3A. (B) The phenotypic results of TolQ TMH2-3 cysteine scanning are reported for a better comparison

Fig. S3. Tandem cysteine scanning of TolQ TMHs. Heat treated samples, corresponding to  $0.4 \times 10^8$  cells were loaded on a 12% SDS-PAGE and analyzed by western-blot immunodetections using anti-HA mAb. Exponentially growing TPS13 pUCtolR-pOKtolQHA cells producing the indicated TolQHA variants were broken by freeze and thaw and treated with 2.5 mM NEM before analyses. Molecular mass markers (Mm) are indicated by bars and correspond to prestained 30, 36, 50 and 65 kDa proteins.

Figure S1

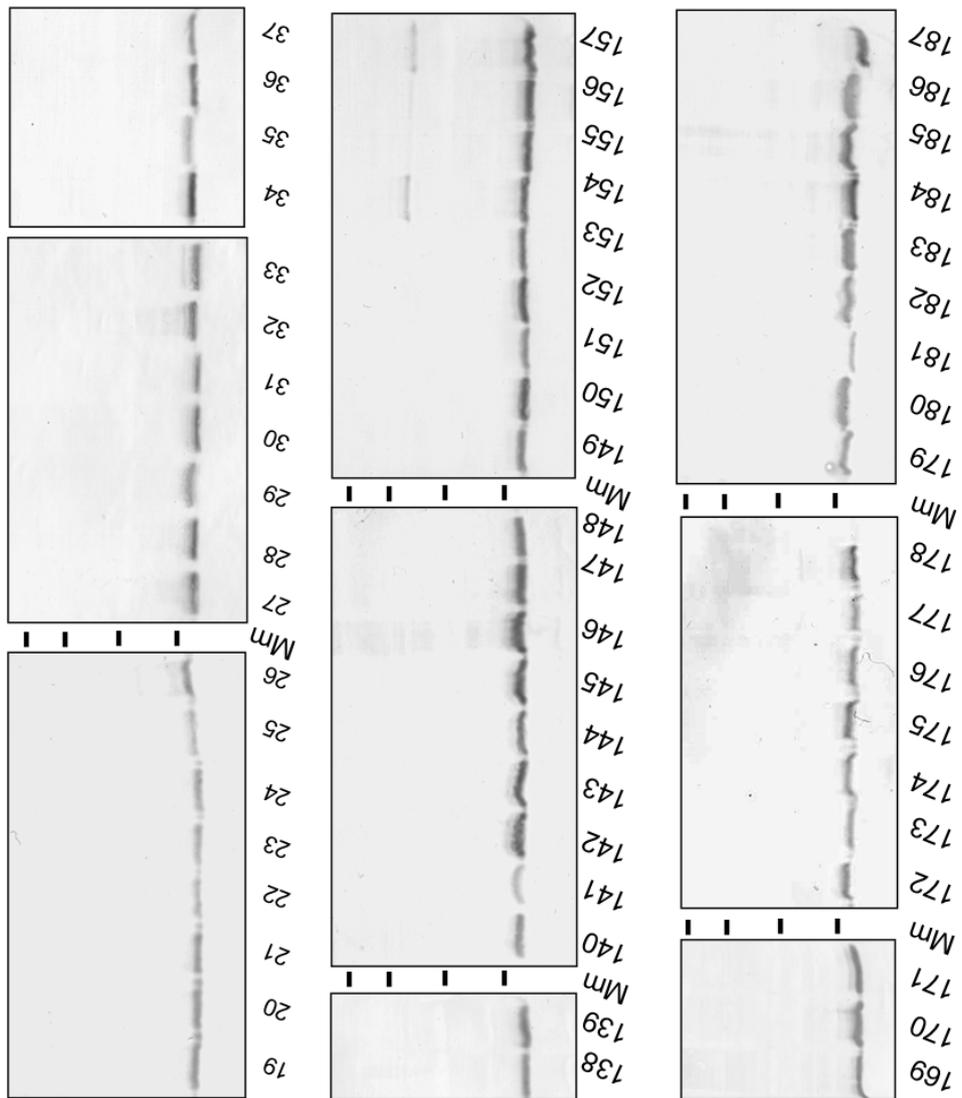
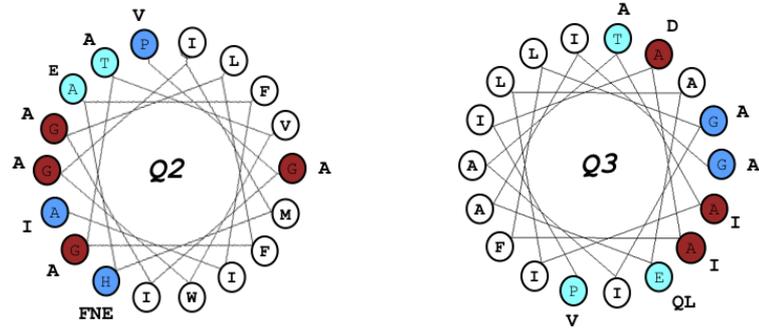


Figure S2

A



B

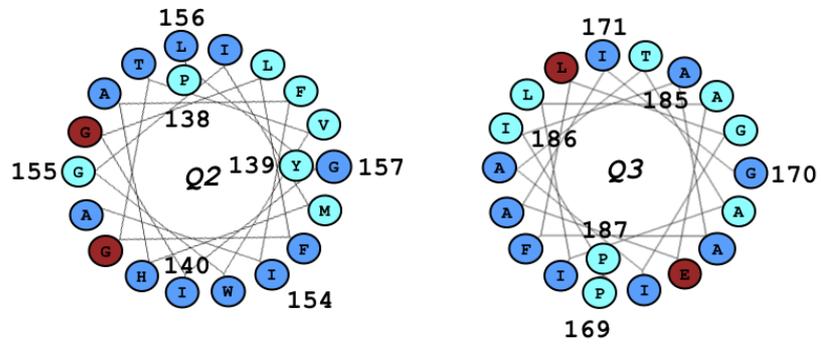
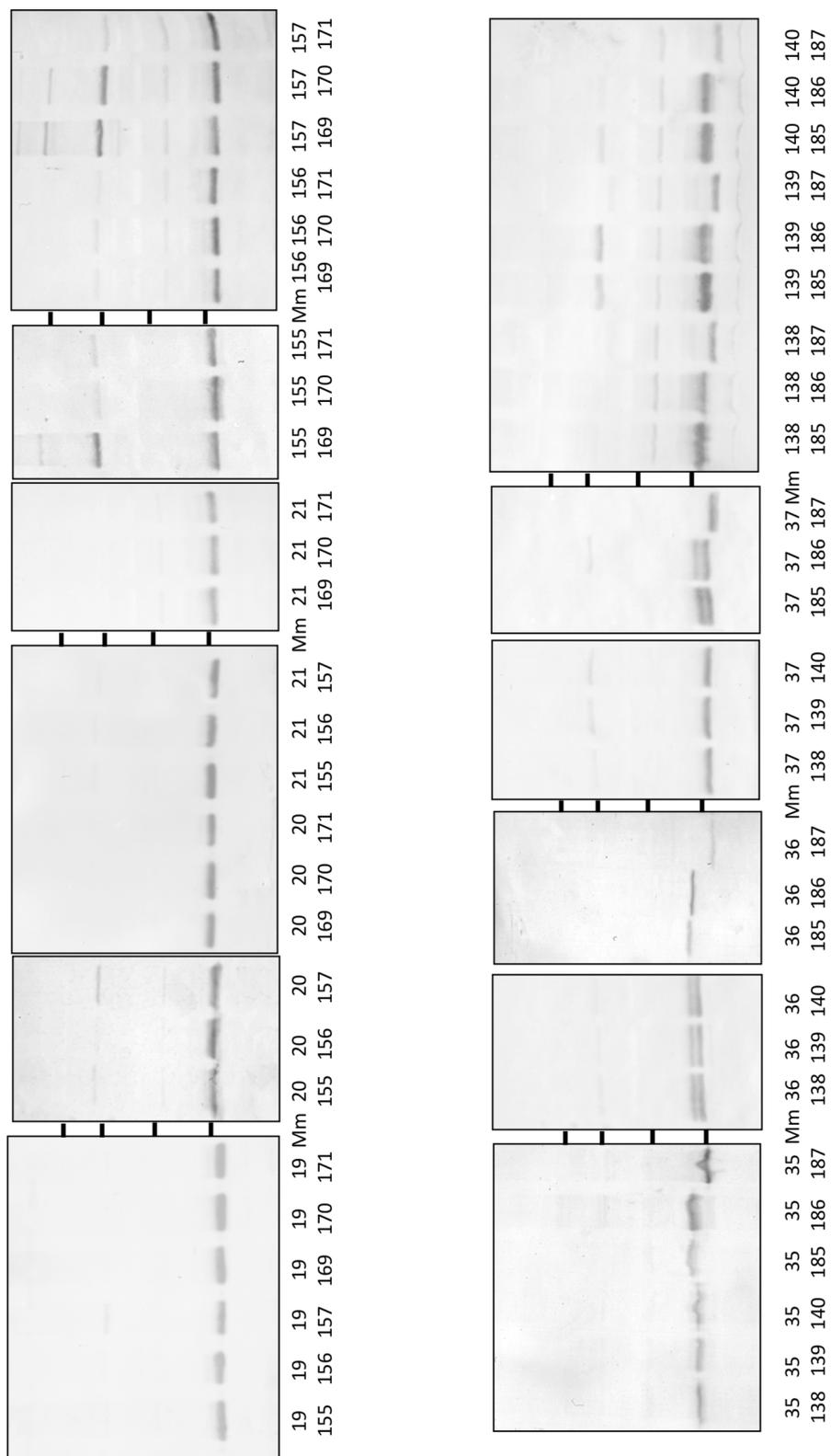


Figure S3



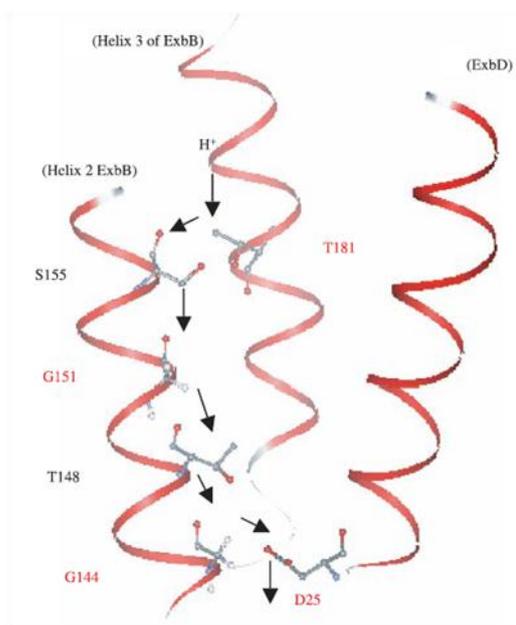
---

**DISCUSSION :**

Afin d'orienter les STs TolQ1, TolQ2 et TolQ3 les uns par rapport aux autres mais aussi pour organiser les protéines TolQ les unes par rapport aux autres dans le complexe, nous avons effectué un « cystéine scanning ». En effet, l'observation de la formation de ponts disulfures inter- et intra-moléculaires permettra d'organiser les protéines TolQ et d'affiner ou construire un modèle d'organisation des hélices. Dans la membrane, les hélices  $\alpha$  transmembranaires sont rarement droites et perpendiculaires au feuillet lipidique. Pour cette raison, nous avons décidé d'étudier l'organisation des trois segments transmembranaires de TolQ au niveau de leur extrémité cytoplasmique ou périplasmique.

La substitution des résidus en cystéine nous a permis d'identifier l'interaction entre les ST de TolQ. Nos résultats proposent que dans le modèle minimum, 2 hélices de TolR dimérisent et forment le centre du moteur. Les deux ancres transmembranaires oscillent entre 2 positions stables. Quatre molécules de TolQ sont assemblées autour du dimère TolR selon l'arrangement  $-(TM2-TM3)_4-$ .

Le canal ionique : Sur la base de calculs bioinformatiques, plusieurs modèles spéculatifs relatant le parcours des protons dans un canal ionique ont été proposés. Un de ces modèles est présenté pour les systèmes MotA-MotB et ExbB-ExbD (Fig. II-4). Dans ce modèle, les auteurs tiennent compte des résidus ionisables et des petits résidus présents dans les ST d'ExbB et d'ExbD. Bien que ce soit un modèle figé, il pourrait refléter une des conformations du canal formé par le système TonB.



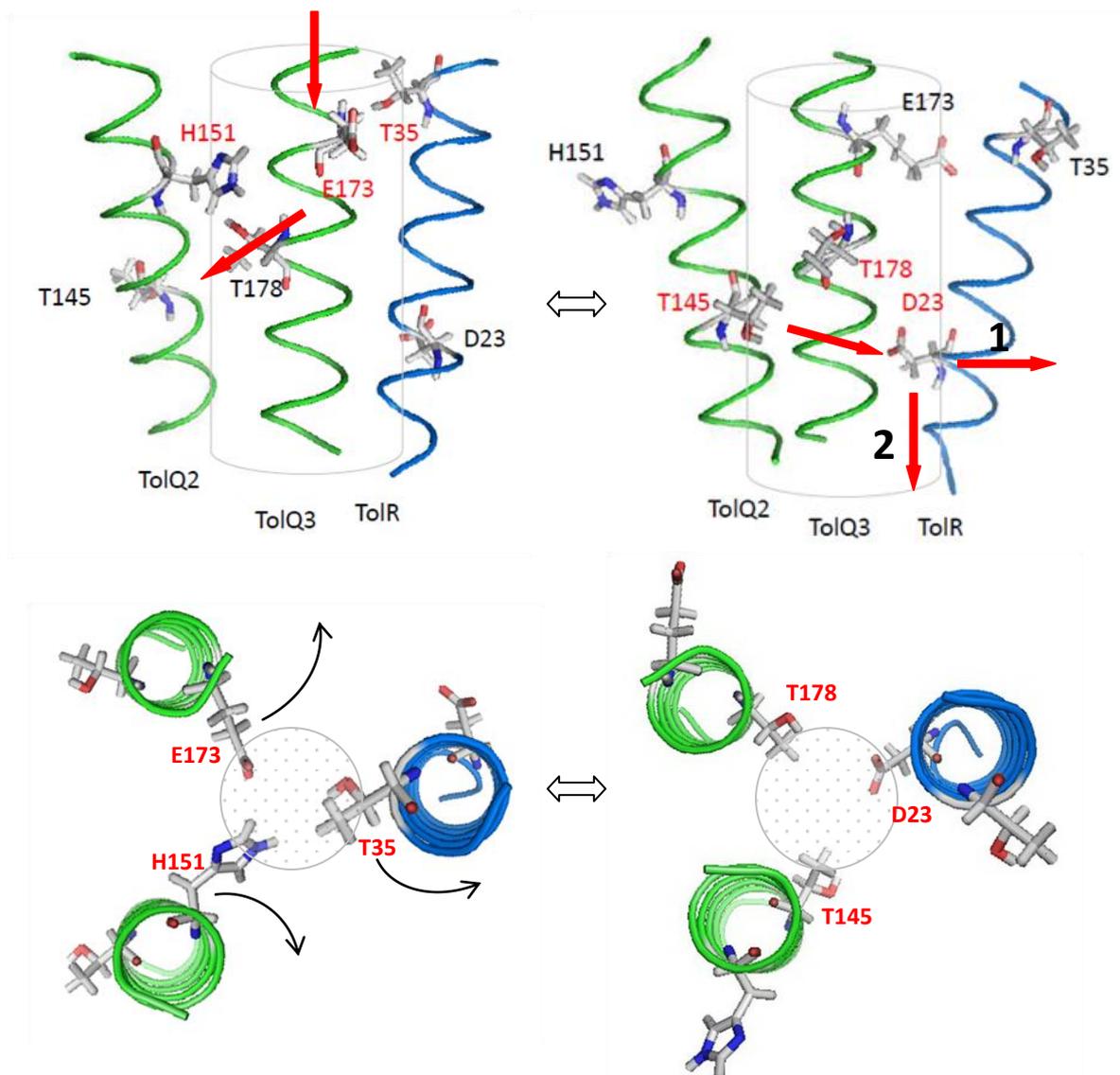
**Figure II-4 : Un des modèles proposé pour le passage du proton à travers le canal ionique formé par ExbB-ExbD** T181 → S155 → H<sub>2</sub>O (près de G151) → T148 → H<sub>2</sub>O (près de G144) → D25. Les résidus strictement conservés sont indiqués en rouge. D'après (Zhai, et al. 2003) Etant un résidu non ionisable, le relai de proton par Gly est assuré par une molécule d'eau se trouvant à proximité de ce résidu.

A ce jour, un seul résidu ionisable l'aspartate a été suggéré pour être impliqué directement dans la fixation du proton. La présence d'un résidu chargé négativement est indispensable dans la transduction des ions au travers du canal ionique.

Dans notre système TolQR, une molécule de TolR pourrait former 2 canaux avec les deux molécules de TolQ qui sont à l'extérieur grâce à la rotation de l'ancre transmembranaire de TolR. Les deux canaux formés par la même molécule de TolR sont asymétriques. Cette asymétrie suggère que les deux canaux formés par le ST de TolR sont probablement deux demi canaux.

Le modèle des deux ½ canaux de TolQ : Il y a 2 résidus ionisables sur chacun des ST TolQ2 (His151 et Thr145) et TolQ3 (Thr178 et Glu173). Les mutants suppresseurs identifiés par Goemaere *et coll.* ont permis d'orienter les hélices TolQ2 et TolQ3 selon 2 conformations différentes. Les deux résidus ionisables de TolQ2 et TolQ3 se séparent de 120° et 140° respectivement. Nos résultats montrent qu'au moins deux de ces quatre résidus pourraient être engagés dans le canal ionique selon deux conformations différentes de TolQ.

Précédemment, nous avons montré qu'un mouvement rotatoire de l'ancre transmembranaire de TolR pourrait avoir lieu au sein de la membrane, l'hélice peut tourner entre deux positions stables et ainsi transporter le résidu ionisable l'aspartate 23 dans un des deux canaux ioniques. En combinant ces deux résultats, il y a 4 possibilités d'assemblage du canal fonctionnel. Deux de ces 4 configurations pourraient former à un modèle de 2 demi-canaux (figure II-3).



**Figure II-3 : Schéma du mécanisme de passage d'ion au travers de  $\frac{1}{2}$  canaux du complexe TolQ-TolR.** Les ST TolQ2 et TolQ3 sont représentés en vert, le ST de TolR en bleu. Les résidus suspectés dans la fonction du canal ionique sont indiqués. En haut, la vue du côté, en bas, la vue de l'extérieur de la cellule. Le canal ionique est présenté en cylindre ou en cercle gris. Les flèches rouges indiquent le mouvement du proton, et les flèches noires pleines indiquent le sens de rotation des ST de TolQ. Les chiffres 1 et 2 sur les flèches rouges signifient : quand le proton est arrivé sur l'Asp 23 de TolR, deux parcours sont possibles : 1/ la rotation du ST de TolR mène D23 dans le  $\frac{1}{2}$  canal voisin, suivi par la libération de proton du côté cytoplasmique. 2/ le proton est libéré directement dans le cytoplasme grâce au gradient de proton.

Dans ce modèle, le proton entre dans le canal du côté périplasmique, fixé et stabilisé par la triade His 151 (déprotoné), Thr 35 et Glu 173 (déprotoné), la fixation du proton entraîne un

changement de conformation des hélices transmembranaires de TolQ et TolR, le proton est transloqué du côté périplasmique E173 (protoné) ou H151 (protoné) jusqu'à la triade T145, T178 et D23 (déprotoné). L'Asp 23 est l'accepteur final dans le demi-canal périplasmique. Le mouvement rotatoire de TolR amène le résidu Asp 23 protoné dans le demi-canal cytoplasmique adjacent et ce qui entraîne la libération du proton dans le cytoplasme (Figure II-3 flèche 1). Dans le cas du canal unique, le proton parvenu sur D23 est libéré aussitôt dans le côté cytoplasme (Figure II-3 flèche 2).

La stœchiométrie du système du moteur de TolQ-R-A serait de 4-6 : 2 : 1. Dans le test de dimérisation nous avons constaté que les formes multimériques de TolQ pouvaient former des hexamères. Ceci indique qu'un multimère de TolQ pourrait former le moteur. Ce résultat pourrait être comparé avec celui d'ExbB dans le système TonB. La stœchiométrie proposée pour le système de TonB-ExbD-ExbB est de 1 : 2 : 7. En considérant la dimérisation de TonB, le système de TonB, il pourrait avoir 14 molécules d'ExbB dans le complexe. En ajoutant l'homodimérisation des résidus G157 et I154 de TolQ2 pourrait suggérer une liaison TolQ2—TolQ2 entre deux complexes moteur de TolQ-R-A. Pour le moment, il est encore difficile de proposer un modèle qui contiendrait 6 molécules de TolQ. La multimérisation de TolQ en présence ou non de TolR devra être analysée après purification du/des complexe/s par des analyses biochimiques comme la centrifugation analytique.

La proline 187 de TolQ3 a été identifiée comme un résidu important dans la transduction de proton. Mais sa substitution en valine n'affecte pas le changement conformationnel de TolR (article 1). Elle pourrait réguler le changement conformationnel de TolQ en répondant aux fixations de proton (Goemaere, et al. 2007a). Afin de vérifier ce modèle, le test d'accessibilité utilisé pour définir la topologie de la partie C-terminale de TolR (Goemaere, et al. 2007b) pourrait nous aider à mieux comprendre ce processus.

## ARTICLE III :

## Le domaine ionophorique de la colicine A modifie l'organisation dimérique de sa protéine d'immunité

### INTRODUCTION :

La colicine A est une colicine ionophorique qui forme un canal ionique dans la membrane interne. Son mode d'action peut être divisé en trois étapes. Dans un premier temps, la colicine A se fixe sur le récepteur de la vitamine B12, la protéine de membrane externe, BtuB. La colicine fixée sur son récepteur recrute ensuite la porine OmpF pour former le complexe colicine A-BtuB-OmpF. Dans un deuxième temps, la colicine traverse la membrane externe à l'aide de la porine OmpF. Enfin, la colicine atteint sa cible : la membrane interne. Elle va alors former un canal ionique entraînant un flux de  $K^+$ , et la perte du potentiel de membrane ce qui entraîne la mort de la bactérie. L'activité ionophorique est portée par le domaine C-terminal de la colicine. Ce domaine C-terminal est aussi dénommé pfColA (pour pore-forming colicine A), il est composé de dix hélices alpha. Parmi ces hélices, les deux hélices H8 et H9 forment une « épingle à cheveux » hydrophobe qui va être protégée par les 8 autres hélices amphipathiques.

L'interaction électrostatique entre la membrane chargée négativement et un anneau de résidus chargé positivement à la surface de pfColA entraîne un rapprochement et un réarrangement conformationnel de ce domaine à la surface de la membrane. Ce réarrangement permet à ce domaine de passer d'une forme soluble à une forme membranaire. Les hélices 8 et 9 s'insèrent spontanément dans la membrane. Cette étape ne dépend pas du potentiel de membrane. En présence d'un potentiel de membrane, le canal ionique s'ouvre. Une séquence provenant de la pectate lyase II (PelB) et Sec-dépendante (Le Calvez, et al. 1995) de *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 a été fusionnée à pfColA (sp-pfColA) afin de produire et de diriger le domaine C-terminal de la colicine A dans le périplasme de la bactérie productrice. (Espeset, et al. 1996). En utilisant cette construction les auteurs ont démontré que la production de sp-pfColA seule était suffisante pour tuer la cellule productrice.

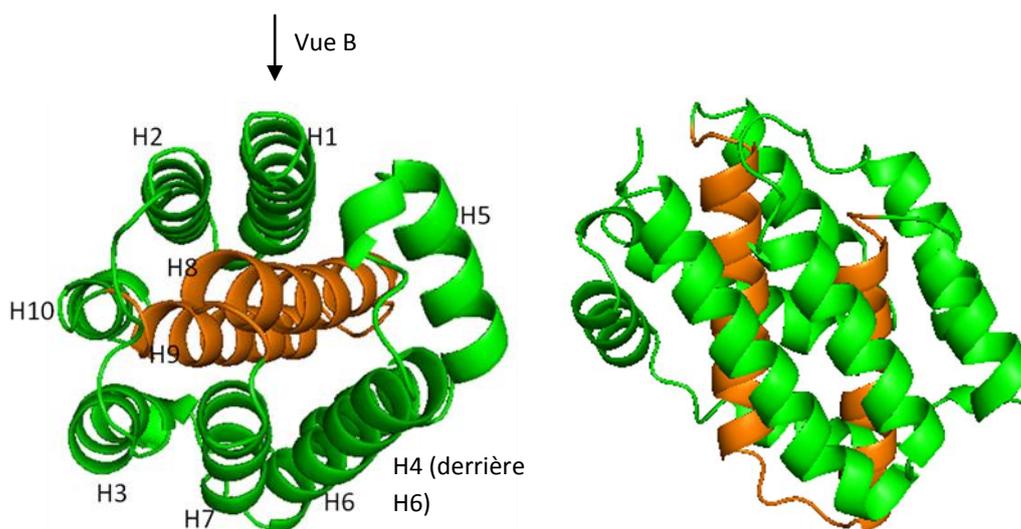
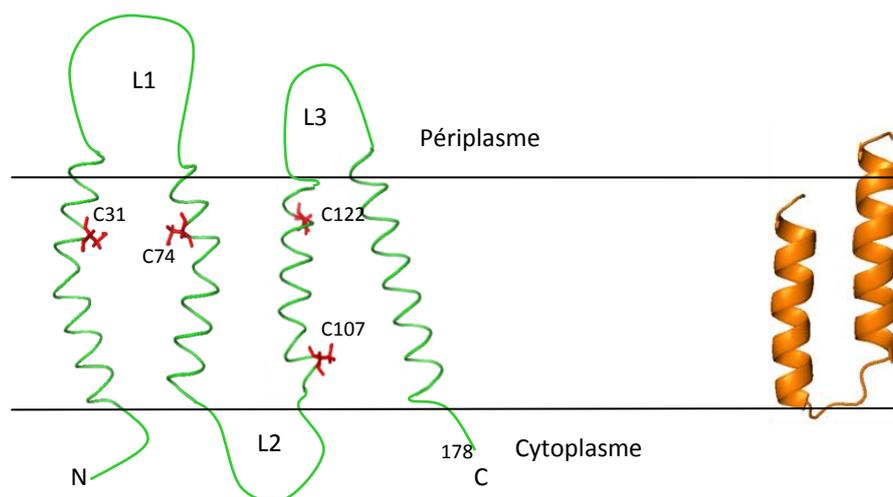


Figure III-1 : La structure du domaine C-terminal de la colicine A représentée en ruban. Les hélices sont numérotées. Les deux hélices hydrophobes (8 et 9) sont colorées en orange. D'après (Cascales & al. 2007)

La bactérie qui produit la colicine A produit également une protéine d'immunité afin de se protéger de l'action de la toxine produite. La protéine d'immunité de la colicine A (Cai) est une protéine intégrale de la membrane interne qui possède 4 hélices transmembranaires. Des études précédentes ont montré que les 20 premiers acide-aminés du domaine N-terminal de Cai pouvaient être remplacés par des séquences non homologues. Par contre, la substitution ou la délétion dans les autres parties de la protéine entraînait la plupart du temps des anomalies de repliement ou d'adressage. Afin de faciliter la détection de Cai, un épitope de 30 acides aminés - l'épitope 1C11 - a été insérée en lieu et place des 12 premiers acides aminés de Cai. La protéine est alors appelée EpCai (Geli, et al. 1993). Une autre étiquette contenant l'épitope 1C11 mais constituée de 178 résidus a été insérée de la même façon à l'extrémité N-terminal de Cai (Geli, et al. 1988). La construction est dénommée VL1(Geli, et al. 1989b). Des études antérieures ont montré que la région de la colicine A reconnue par Cai était son cœur hydrophobe (Espeset, et al. 1996; Geli and Lazdunski 1992; Nardi, et al. 2001a). Cependant peu d'informations sont disponibles sur l'organisation de Cai dans la membrane. Aucune donnée n'est disponible sur l'orientation ou les faces d'hélices de Cai en interaction. Pour tenter d'apporter quelques informations sur l'organisation des hélices transmembranaires de Cai au sein d'une membrane, l'approche du « cystéine scanning » a été utilisée.



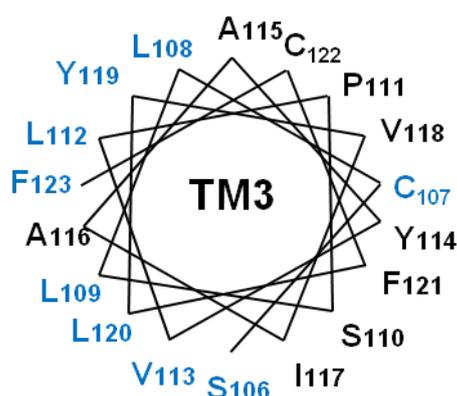
**Figure III-3 : A gauche : Modélisation de la structure de la protéine Cai. Les résidus cystéines sont indiqués en rouge. A droite : les hélices hydrophobes (H8 et H9) de la colicine A (PDB : 1COL)**

#### RESUME :

L'analyse de la séquence d'ADN de Cai montre l'existence de quatre cystéines. Elles se trouvent toutes sur les hélices transmembranaires. Afin de déterminer l'existence de possibles interactions entre ces cystéines, nous avons soumis les cellules produisant la protéine d'immunité à un stress oxydant. Les premiers résultats montrent que, si nous traitons la cellule qui produit la protéine d'immunité de la colicine A étiquetée – EpCai avec un agent oxydant, le CuoP, nous observons une bande correspondant au double de la masse moléculaire d'EpCai. Cette bande est absente si nous traitons les échantillons avec un réducteur tel que le  $\beta$ -mercaptoéthanol. La formation du dimère de Cai a aussi été confirmée par pontage chimique au formaldéhyde *in vivo*. La forme dimérique disparaît si nous chauffons les échantillons pontés à 96°C. Un traitement préalable des échantillons avec un protecteur du groupement thiol (le N-éthyl maléimide) empêche l'apparition d'un dimère d'EpCai en présence d'oxydant. Ceci suggère que la dimérisation est due aux cystéines présentes dans les hélices transmembranaires.

Afin de déterminer le ou les cystéines impliquées dans l'interaction hélice-hélice de Cai, la mutagenèse dirigée de ces cystéines en serine a été réalisée. Nous avons substitué indépendamment les 4 cystéines en serine. Les différents mutants ont ensuite été soumis aux tests de dimérisation en présence de CuoP. Nous avons pu déterminer l'implication de la cystéine 107(C107) et la cystéine 122 (C122) de l'hélice 3 dans la dimérisation d'EpCai. En

effet, chez un double mutant C107/C122, la dimérisation d'EpCai n'est plus observée en présence de Cuop, mais la forme dimérique d'EpCai est toujours détectable par pontage au formaldéhyde. Ceci suggère que la protéine Cai mutée C107/C122 est toujours sous forme de dimère. En variant la concentration en oxydant nous avons pu démontrer que l'homodimérisation de Cai était principalement due à la cystéine 107. La modélisation de l'hélice 3 de Cai montre que les deux cystéines C107 et C122 sont localisées sur la même face de l'hélice 3. Cette observation suggère une interface d'interaction sur l'hélice 3 de Cai. Afin de vérifier cette hypothèse, une substitution systématique de chaque résidu en cystéine de l'hélice 3 dans un contexte C107S/C122S a été réalisée. Étonnamment, l'interface de dimérisation se trouve sur la face opposée à celle contenant les cystéines en position 107 et 122 (Figure III-4). Cependant la cystéine 107 se trouve à l'extrémité de l'hélice transmembranaire dans une région a priori plus flexible.



**Figure III-4:** La représentation en projection de l'hélice du segment transmembranaire 3 de Cai. En bleu, la position où les résidus dimérisent fortement, En noir, celle où les résidus dimérisent faiblement ou pas du tout.

En présence de Cuop, nous avons également observé un faible changement dans la mobilité des monomères d'EpCai. L'explication la plus plausible pour expliquer cette migration aberrante était la formation d'un pont disulfure intramoléculaire. La substitution des cystéines en sérine a permis d'identifier la cystéine 74 comme étant la cystéine clé dans la formation des ponts intramoléculaires. En effet, le changement de mobilité électrophorétique de Cai était toujours observable chez les simples mutants C31S, C107S et C122S. Ce résultat montrait qu'au moins deux cystéines étaient des partenaires possibles de la cystéine 74 pour former ces ponts intramoléculaires. Etant donné que la C107 se trouve du côté opposé (cytoplasmique) des trois autres cystéines (périplasmique), les deux cystéines candidates étaient les cystéines C31 et C122 (Figure III-3). La construction du double-mutant C31S/C122S a confirmé cette hypothèse. En effet, en présence d'un agent oxydant, ce double

mutant ne présente pas une migration aberrante en gel SDS-PAGE. Ceci signifie que le double mutant n'est plus capable de former des ponts intramoléculaires.

Ensuite, nous avons cherché à savoir quel était l'effet de pfColA sur la dimérisation d'EpCai. Nous avons coproduit les deux protéines dans la même cellule. Le test d'oxydation montre qu'EpCai n'est plus capable de former de dimères et des ponts intramoléculaires en présence de sp-pfColA. De même, en présence de formaldéhyde EpCai ne forme plus de dimère en présence de pfColA. Dans l'introduction, nous avons vu que la formation du canal ionique par la colicine ionophorique pouvait se diviser en deux étapes. Une première étape, voltage-indépendante correspondant à l'insertion de pfColA dans la membrane et une deuxième étape voltage-dépendante correspondant à l'ouverture du canal. Afin de déterminer laquelle de ces deux étapes était inhibée par la protéine d'immunité Cai, une forme mutée de pfColA a été utilisée. Elle possède la double mutation A492E/F493P, qui empêche l'ouverture du canal mais pas l'insertion de pfColA dans la membrane et notamment l'insertion des hélices hydrophobes 8 et 9. Ce double mutant est appelé pfColAB3. Il s'avère que Cai n'est pas capable de former de ponts disulfures intra et intermoléculaires en présence d'agent oxydant lorsqu'elle est co-produite avec sp-pfColAB3. Ceci suggère qu'EpCai interagit avec pfColA associée à la membrane. En 2001, Nardi *et coll.* ont montré l'interaction physique entre les hélices H8 et H9 de la colicine A et la protéine d'immunité Cai (Nardi, *et al.* 2001a). Aux vu de nos résultats, nous proposons que l'interaction directe les hélices H8 et H9 de la colicine A avec la protéine d'immunité Cai, contribue au moins une grande partie à la fonction de la protéine d'immunité Cai, même si d'autres parties des deux molécules pourraient compléter ce processus. L'interaction entre la colicine A et EpCai entraîne un changement dans l'arrangement des hélices transmembranaires d'EpCai. Ce changement majeur est nécessaire à la fonction de la protéine d'immunité.

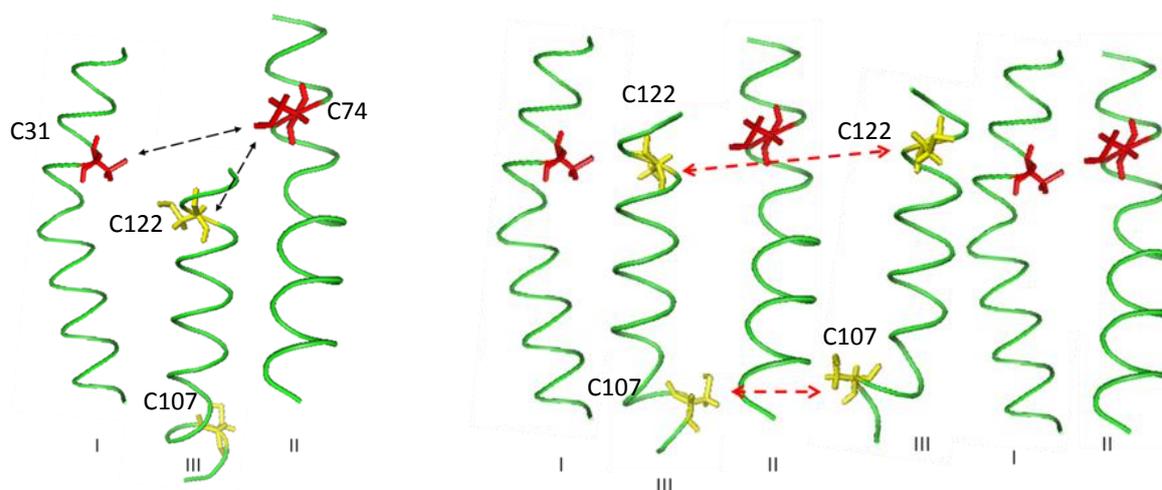


Figure III-5 : Modélisation des hélices de Cai. Les interactions identifiées entre les cystéines sont indiquées par des flèches.

Quel est l'effet du CuoP sur l'activité d'EpCai ? La formation de pont disulfure empêche-t-elle la protéine EpCai de fonctionner ? Pour répondre à cette question, nous avons testé la sensibilité des cellules productrices de Cai à la colicine A en présence ou non de CuoP. Le test phénotypique montre que le traitement des cellules productrices de Cai, par CuoP n'affecte pas de la fonction de Cai qui se traduit par une résistance à la colicine A. Cependant nous remarquons que la souche sensible (non productrice d'EpCai) est aussi devenue résistante à la colicine A, tout en demeurant sensible aux colicines ionophoriques B et E1 et à la colicine endonucléasique E2. Nous supposons que la perte d'activité de la colicine A soit le fait d'une modification de l'une des protéines impliquées dans sa réception ou sa translocation. Pour tester cette hypothèse nous avons utilisé les protéines hybrides colicines AAB et BBA (Duche, et al. 1995). La colicine AAB possède les domaines de translocation et de réception de la colicine A et le domaine d'activité de la colicine B. La colicine BBA est composée des domaines de translocation et de réception de la colicine B fusionnés avec le domaine d'activité de la colicine A. La colicine B utilise le système de translocation TonB. Les deux colicines sont actives sur les cellules sensibles. La colicine BBA est inactive sur une cellule productrice d'EpCai, quant à la colicine AAB, elle est toujours active. Lorsque les cellules sont traitées par le CuoP, la colicine AAB est inactive aussi bien sur les cellules non productrices d'EpCai que sur les cellules productrices. La colicine BBA est active dans les deux cas. Nous avons répété ces expériences avec les deux mutants : C74S (qui forme seulement des ponts intermoléculaires) et C107S/C122S (qui forme seulement des ponts intramoléculaires) en présence de CuoP. La colicine BBA est active en présence de CuoP sur

des cellules sensibles ou immunes. Lorsque l'on traite les cellules par le CuoP puis par du DTT (Dithiothréitol), un agent réducteur, et que l'on effectue un test de sensibilité aux colicines, on observe que la bactérie productrice d'EpCai est redevenue en grande partie immune à la colicine BBA. Nos résultats montrent que la formation des ponts disulfures intra ou inter moléculaires inactive la protéine d'immunité EpCai. Cette observation mise en relation avec les résultats obtenus par pontage en présence de CuoP, montre que pour être fonctionnelle, EpCai doit pouvoir réarranger ces hélices dans la membrane.



# Channel Domain of Colicin A Modifies the Dimeric Organization of Its Immunity Protein\*

Received for publication, May 12, 2010, and in revised form, October 1, 2010. Published, JBC Papers in Press, October 4, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.144071

Xiang Y.-Z. Zhang<sup>†§</sup>, Roland Llobès<sup>†§</sup>, and Denis Duché<sup>†§1</sup>

From the <sup>†</sup>Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, CNRS UPR-9027, 13402 Marseille Cedex 20, France and the <sup>§</sup>Université de la Méditerranée Aix-Marseille, 13284 Marseille Cedex 07, France

**Proteins conferring immunity against pore-forming colicins are localized in the *Escherichia coli* inner membrane. Their protective effects are mediated by direct interaction with the C-terminal domain of their cognate colicins. Cai, the immunity protein protecting *E. coli* against colicin A, contains four cysteine residues. We report cysteine cross-linking experiments showing that Cai forms homodimers. Cai contains four transmembrane segments (TMSs), and dimerization occurs via the third TMS. Furthermore, we observe the formation of intramolecular disulfide bonds that connect TMS2 with either TMS1 or TMS3. Co-expression of Cai with its target, the colicin A pore-forming domain (pfColA), in the inner membrane prevents the formation of intermolecular and intramolecular disulfide bonds, indicating that pfColA interacts with the dimer of Cai and modifies its conformation. Finally, we show that when Cai is locked by disulfide bonds, it is no longer able to protect cells against exogenous added colicin A.**

Pore-forming colicins are plasmid-encoded bacteriocins, synthesized by Enterobacteriaceae, that are lethal to other related strains. Like many toxins, colicins are organized into structural domains that perform different functions: the N-terminal and the central domains are involved in the transport through the *Escherichia coli* envelope, and the C-terminal domain carries the toxic activity of the protein (1).

The three-dimensional structures of the soluble form of the pore-forming domains of colicins A, E1, Ia, B, and N share the same general architecture: a bundle of eight amphipathic  $\alpha$ -helices surrounding two hydrophobic  $\alpha$ -helices (H8 + H9), completely buried within the protein (2–6). However, crystal structures do not reveal the structure of the channel in the membrane, which remains uncharacterized. The hydrophobic helical hairpin may be the primary attachment region for channel formation and channel opening and closing require insertion and extrusion of an amphipathic segment, which has not been precisely defined (7, 8).

Each colicin plasmid also encodes a specific immunity protein that protects the producing cell against the cytotoxic activity of its colicin. Immunity proteins are integral inner

membrane proteins. They are classified into two groups according to sequence similarities: the A type (immunity proteins to colicins A, B, N, and U) and the E1 type (immunity proteins to colicins E1, 5, K, 10, Ia, and Ib) (9–11). The colicin A immunity protein (Cai)<sup>2</sup> has four transmembrane segments (TMSs), and its N and C termini are in the cytoplasm (Fig. 1), whereas the immunity protein to colicin E1 (Cei) crosses the cytoplasmic membrane three times, with the N terminus located in the cytoplasm and the C terminus in the periplasm (10, 11).

The immunity proteins to pore-forming colicins diffuse laterally in the membrane and interact with helices of the pore-forming domain of their cognate colicin just prior channel opening (12–15). Genetic studies of A-type colicins indicate that the main determinant recognized by the immunity protein is the hydrophobic helical hairpin (12, 16). Similar studies with an E1-type colicin suggested that inactivation of the toxin is due to interaction between the voltage-gated regions of colicin and the TMSs of the immunity proteins (14, 15). The first biochemical evidence of pore-forming colicin physically interacting with its immunity protein was reported by Espeset *et al.* (1996), who showed that a colicin A pore-forming domain, fused to a prokaryotic signal peptide (sp-pfColA), could be co-immunoprecipitated with its cognate epitope-tagged immunity protein (EpCai) (17). Using the same co-immunoprecipitation procedure, Nardi *et al.* demonstrated that the smallest fragment of colicin A recognized by Cai was the hydrophobic helical hairpin (18).

However, little is known about the tertiary structure of immunity proteins within the membrane. For example, there have been no investigations of whether immunity proteins are in monomeric or oligomeric states. Only limited and preliminary data are available concerning the arrangement of helices in the membrane, and the residues in close contact between TMSs have not been identified. Here, we describe the use of site-directed cysteine cross-linking to gain insight into the interaction surfaces of Cai at the structural level. Copper (II) orthophenanthroline (Cu-OP), a commonly used cross-linking reagent, was employed to catalyze the formation of disulfide bonds between SH groups. EpCai has four cysteine residues, all located in its TMSs. We show that EpCai forms a covalent dimer in the membrane upon incubation with Cu-

\* This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche, SODATOL Project ANR-07-BLANC-67.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed: Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, CNRS, 31 chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille cedex 20, France. Tel.: 33 04 91 16 45 61; Fax: 33 04 91 71 21 24; E-mail: duche@ibsm.cnrs-mrs.fr.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: Cai, colicin A immunity; Cu-OP, copper(II) orthophenanthroline;  $\beta$ -me,  $\beta$ -mercaptoethanol; EpCai, epitope-tagged Cai; FA, formaldehyde; NEM, *N*-ethylmaleimide; sp-pfColA, colicin A pore-forming domain fused to a prokaryotic signal peptide; TMS, transmembrane segment.

## Ion Channel Inhibition

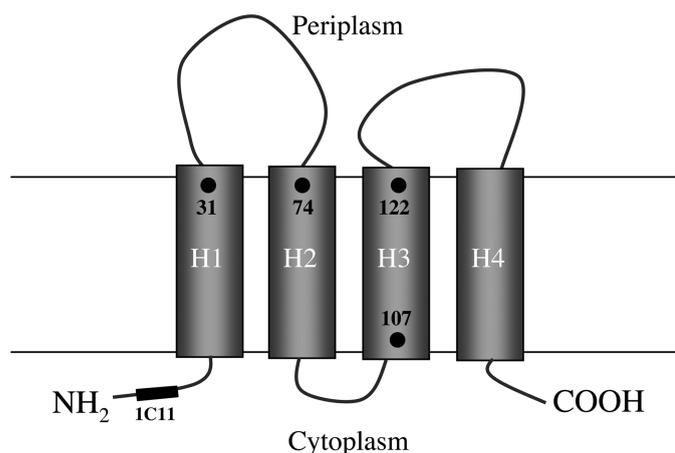


FIGURE 1. Model of Cai in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. H1, H2, H3, and H4 denote the transmembrane  $\alpha$ -helices. The positions of cysteine residues are shown with black dots and labeled with numbers.

OP, and we identified the cysteine residue involved in EpCai dimerization. In addition to dimer formation, we also detected intramolecular disulfide bonds that connect TMS1 to TMS2 and TMS2 to TMS3. Interestingly, intra- and intermolecular disulfide bonds formation was abolished when sp-pfColA was co-expressed. Moreover, if EpCai is oxidized with Cu-OP treatment, it is no longer able to protect cells against exogenously added colicin A. These various findings indicate that *in vivo* EpCai forms a dimer in the membrane and changes conformation upon interaction with the colicin A pore-forming domain.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Strain, Plasmids, and Growth Conditions**—*E. coli* C600 was used as the recipient strain for all cloning procedures. Plasmid pImTC encodes the wild-type Cai under the control of its own promoter (19). Plasmid pEpCaiCm encodes the epitope-tagged immunity protein (EpCai) (19). pVL1 encodes the wild-type Cai with the 178 first amino acids of ColA fused to its N terminus (20). pCT1 encodes the pore-forming domain of ColA fused to the PelB sequence signal (sp-pfColA) (21). pCT3 encodes the B3 mutant form of sp-pfColA (sp-pfColA<sub>B3</sub>) (21). pBAD/HisC contains the *araBAD* promoter from *E. coli* and was used to insert the gene encoding sp-pfColA or sp-pfColAB3. Routinely, cells were grown aerobically at 37 °C or 30 °C, in LB medium supplemented with ampicillin (100  $\mu$ g/ml), kanamycin (50  $\mu$ g/ml), or chloramphenicol (40  $\mu$ g/ml).

**Constructs**—QuikChange mutagenesis PCR with complementary pairs of oligonucleotides was used to introduce site-directed substitutions. Genes encoding sp-pfColA and sp-pfColAB3 were amplified by PCR using appropriate 5' and 3' primers. The 5' primers contained the DNA sequence (30 bp) of pBAD/HisC immediately upstream from the ATG start codon and the DNA sequence encoding the first eight amino acids of the signal peptide of sp-pfColA or sp-pfColAB3. The 3' primers correspond to the DNA sequence encoding of the N-terminal eight amino acids of sp-pfColA or sp-pfColAB3 and contained the DNA sequence (30 bp) of pBAD/HisC immediately upstream from the ATG. Once amplified, the DNA fragments encoding sp-pfColA or sp-pfColAB3 were used as

TABLE 1  
Activity of Cai and its mutant forms

Immunity protein and mutant forms	ColA dilution resulting in clear zone <sup>a</sup>
No immunity	10 <sup>-4</sup>
WT	(i) <sup>b</sup>
C31S	(i)
C74S	(i) <sup>c</sup>
C107S	(i)
C122S	(i)
L109C	(i)
V113C	(i)
Y119C	(i) <sup>c</sup>
C31S/C74S	10 <sup>-3c</sup>
C31S/C107S	(i)
C31S/C122S	10 <sup>-2c</sup>
C74S/C107S	10 <sup>-4c</sup>
C74S/C122S	10 <sup>-4c</sup>
C107S/C122S	10 <sup>-1c</sup>
S106C/C107S/C122S	10 <sup>-3c</sup>
C107S/L108C/C122S	10 <sup>-3c</sup>
C107S/L109/ C122S	10 <sup>-3c</sup>
C107S/S110/C122S	10 <sup>-4c</sup>
C107S/P111C/C122S	10 <sup>-4c</sup>
C107S/L112C/C122S	10 <sup>-4c</sup>
C107S/V113C/C122S	10 <sup>-3c</sup>
C107S/Y114C/C122S	10 <sup>-4c</sup>
C107S/A115C/C122S	10 <sup>-3c</sup>
C107S/A116C/C122S	10 <sup>-4c</sup>
C107S/I117C/C122S	10 <sup>-3c</sup>
C107S/V118/C122S	10 <sup>-4c</sup>
C107S/Y119C/C122S	10 <sup>-3c</sup>
C107S/L120C/C122S	10 <sup>-4c</sup>
C107S/F121C/C122S	10 <sup>-3c</sup>
C107S/F123C/C122S	10 <sup>-2c</sup>
C31S/C74S/C107S	10 <sup>-4c</sup>
C31S/C107S/C122S	10 <sup>-4c</sup>
C74S/C107S/C122S	10 <sup>-4c</sup>
C31S/C74S/C107S/C122S	10 <sup>-4c</sup>

<sup>a</sup> The last dilutions resulting in clear zones of growth inhibition are listed.

<sup>b</sup> Immune phenotype for which no zone clearing with undiluted colicin was detected.

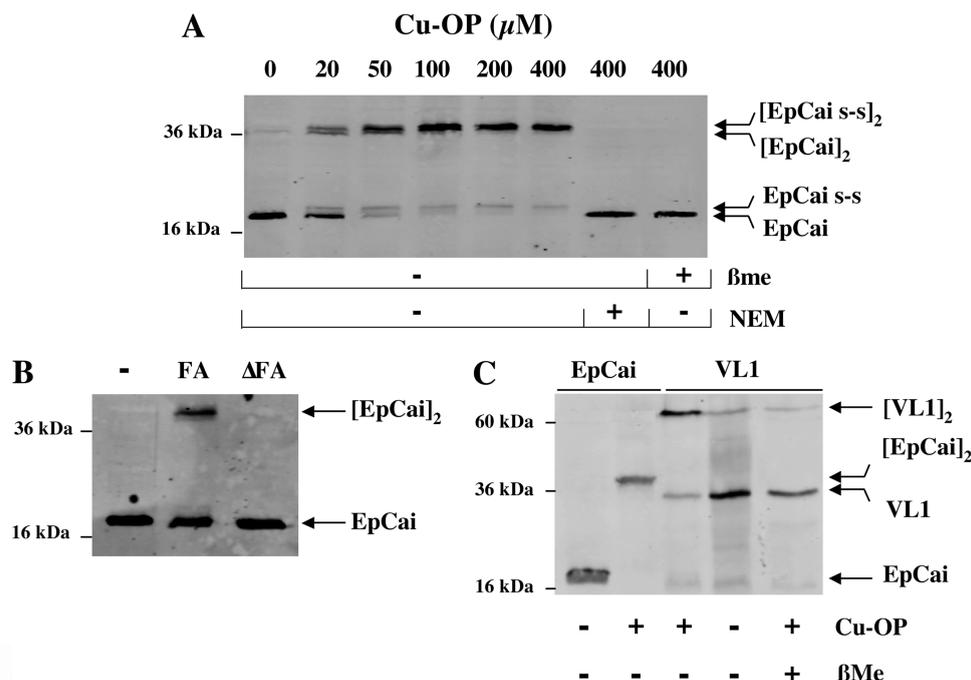
<sup>c</sup> Results obtained at 30 °C. At 37 °C these mutated Cai were inactive. The quadruple mutant was not produced even at 30 °C.

megaprimers and inserted into pBAD/HisC by a second-stage PCR that amplified the whole plasmid.

**Colicin Assay**—Colicin activity was assessed by the formation of halos on a lawn of the target strain, as described previously (22). The data are reported as the highest dilution of colicin solution that still inhibits cell growth (Table 1). Strains sensitive or immune to ColA were spread on LB medium agar plates containing or not containing Cu-OP (200  $\mu$ M).

**In Vivo Disulfide Bond Formation and Immunodetection**—Aliquots of  $8 \times 10^8$  exponentially growing cells ( $A_{600} = 0.6$ ) were pelleted and resuspended in 1 ml of 10 mM sodium phosphate buffer (NaPi, pH 6.8), and then treated with 1 mM EDTA (pH 8) and 5 mM *N*-ethylmaleimide (NEM; Sigma) to block reduced thiols groups. The cells were treated, as appropriate, with the indicated concentration of the oxidative catalyst Cu-OP (Sigma) prior to treatment with EDTA and NEM. The cells were subsequently pelleted and resuspended in Laemmli loading buffer in the presence or absence of  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -me). *In vivo* formaldehyde cross-linking was performed as described previously (23). Proteins were separated by 15% SDS-PAGE, and subjected to Western blotting with the primary anti-1C11 monoclonal antibody and anti-mouse second antibodies labeled with Alexa Fluor 488 dye (Molecular Probes); the banding pattern was analyzed using the Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biosciences).

## Ion Channel Inhibition



**FIGURE 2. EpCai forms homodimers.** *A*, effect of Cu-OP concentration on the amount of EpCai dimer. For all the figures, samples were resolved by 15% SDS-PAGE, and anti-1C11 mAb was used for immunodetection. Aliquots of  $0.2 \times 10^8$  cells of the strain producing EpCai, incubated with or without one of a series of concentrations of Cu-OP, were boiled in the absence or presence of the reducing agent  $\beta$ -me and preincubated or not with NEM. Positions of EpCai and EpCai dimers are indicated on the *right*. Positions of EpCai monomers and dimers with intramolecular disulfide bond(s) are indicated as EpCai<sub>s-s</sub> and [EpCai<sub>s-s</sub>]<sub>2</sub>, respectively. Molecular mass markers are indicated on the *left*. *B*, EpCai cross-linking with FA. Aliquots of  $0.2 \times 10^8$  cells of the strain producing EpCai were treated (FA) or not treated (–) with formaldehyde.  $\Delta$ FA is similar to FA, except that samples were heated to 96 °C to break the cross-links. *C*, EpCai and VL1 dimer formation. Aliquots of  $0.2 \times 10^8$  cells of the strain producing EpCai or VL1, incubated with or without Cu-OP (400  $\mu$ M), were boiled with or without  $\beta$ -me. Positions of EpCai, EpCai dimers, VL1, and VL1 dimers are indicated on the *right*. Molecular masses are indicated on the *left*.

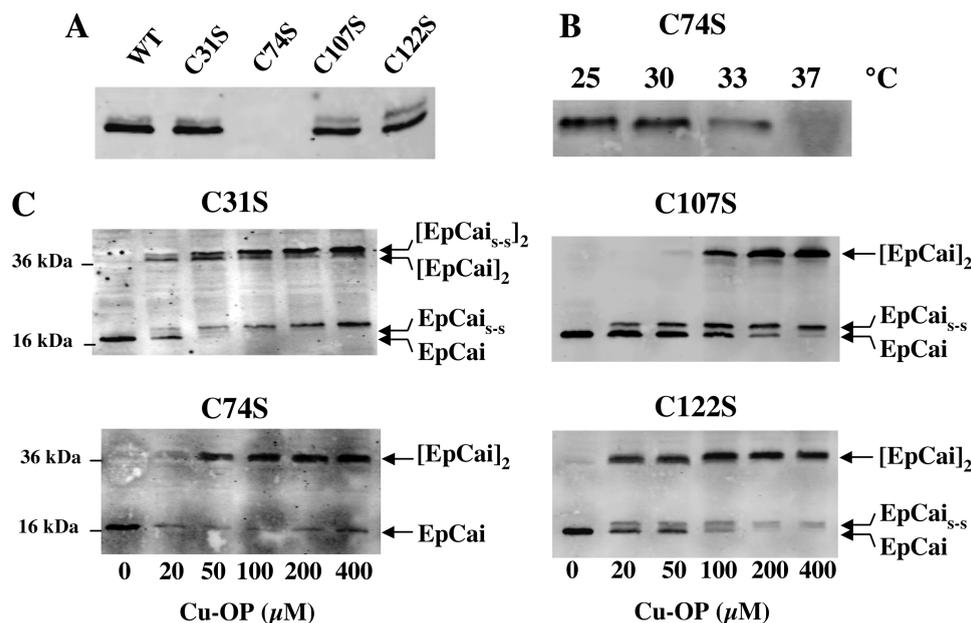
## RESULTS

**Cross-linking of EpCai by Cu-OP**—We investigated the effect of Cu-OP oxidation on the cysteine thiol groups of EpCai. Cells producing EpCai were incubated with various concentrations of Cu-OP at 20 °C for 15 min. The reaction was stopped by the addition of EDTA to trap free and complexed  $\text{Cu}^{2+}$ , and of NEM to block the remaining free cysteine residues. Samples were separated by SDS-PAGE, and EpCai was detected by immunoblotting with monoclonal antibody (mAb) 1C11 directed against the epitope tag of EpCai (Fig. 2). Increasing concentrations of Cu-OP decreased the intensity of the band corresponding to the monomeric form of EpCai (apparent molecular mass of 18 kDa) and increased the intensity of the band corresponding to the dimeric form (36 kDa) (Fig. 2A). After treatment with  $\beta$ -me, the 36-kDa band disappeared, with all EpCai migrating in the 18-kDa band (Fig. 2A). These results strongly suggest that the 36-kDa band corresponded to a dimer of EpCai, stabilized by an intermolecular disulfide bond. This dimer will hereafter be referred to as [EpCai]<sub>2</sub>. To confirm the existence of the dimer, another cross-linking reagent, formaldehyde (FA), was used. Cells producing EpCai were treated with 1% FA for 15 min, and the proteins were separated by SDS-PAGE. Both EpCai and [EpCai]<sub>2</sub> were detected in FA-treated samples, but only the band corresponding to the monomeric EpCai was visible in the absence of FA treatment and in FA-treated samples that were subsequently heated to break any cross-links (Fig. 2B). Although these results suggest that EpCai exists as a dimer in the membrane, the possibility that EpCai interacts with an-

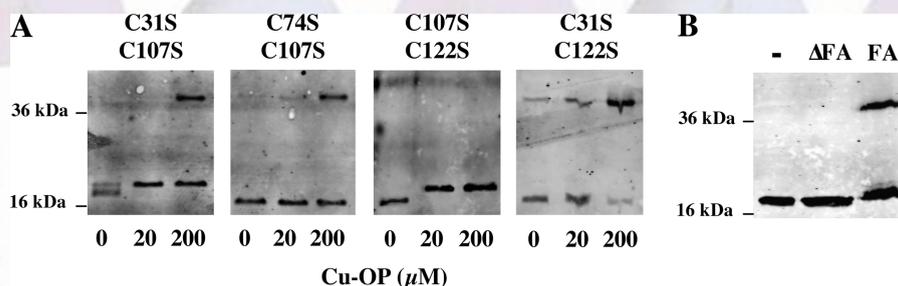
other protein that has a similar apparent molecular mass to form a heterodimer cannot be formally excluded. To demonstrate that the observed 36-kDa band indeed corresponds to a homodimer of EpCai, we used a larger variant of Cai, called VL1 (20). In absence of Cu-OP, monomeric VL1 migrated on SDS-PAGE as a single band of 30 kDa apparent molecular mass. Following treatment with Cu-OP, a second band of 60–65-kDa apparent molecular mass was observed, undoubtedly a homodimer of VL1 because cross-linking between VL1 and a hypothetical protein of an apparent molecular mass of 18 kDa would not migrate to this position (Fig. 2C). These results clearly indicate that Cai forms homodimers in the *E. coli* inner membrane. Interestingly, following treatment with 20  $\mu$ M Cu-OP, two other bands that migrated close to EpCai or [EpCai]<sub>2</sub> were detected (Fig. 2A). These bands may correspond to EpCai monomers and dimers that react with Cu-OP to form intramolecular disulfide bonds. Indeed, these bands disappeared in the presence of a reducing agent, and only the band corresponding to the monomeric form of EpCai was observed. Preincubation of cells with NEM prior to the addition of Cu-OP prevented intra- and intermolecular disulfide bond formation (Fig. 2A). We used mutagenesis experiments to identify the cysteine residues involved in these intra- and intermolecular disulfide bonds.

**Cys<sup>107</sup>-Cys<sup>107</sup> Disulfide Bond Mediates EpCai Dimerization**—EpCai possesses cysteine residues at positions 31, 74, 107, and 122. All of these four cysteine residues are located in TMSs. Cys<sup>31</sup> is located in TMS1, Cys<sup>74</sup> in TMS2, and Cys<sup>107</sup> and Cys<sup>122</sup> in TMS3 (Fig. 1). To identify the cys-

## Ion Channel Inhibition



**FIGURE 3. Dimer formation of mutated EpCai.** For all figures, samples were subjected to 15% SDS-PAGE and probed with anti-1C11 mAb. *A*, expression of mutated EpCai.  $0.2 \times 10^8$  cells of the indicated strains were loaded on SDS-PAGE and immunodetected. *B*, expression of EpCai C74S at various temperatures. Strains carrying the construct encoding EpCai C74S were grown at the indicated temperature and induced for 90 min with  $100 \mu\text{M}$  isopropyl 1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside. *C*, influence of Cu-OP concentration on the amount of mutated EpCai dimer. See legend to Fig. 2A for wild-type Cai. Cells were grown at  $30^\circ\text{C}$ .



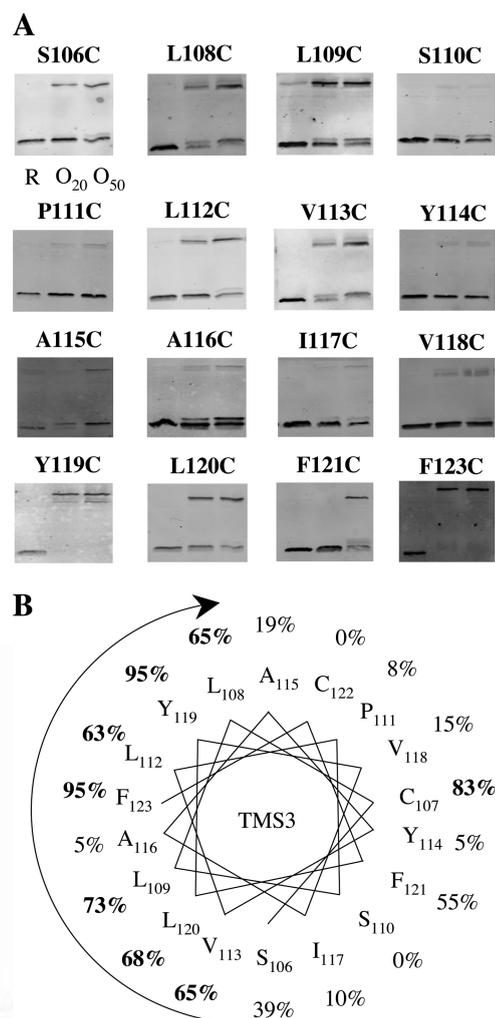
**FIGURE 4. Cysteine residues involved in intra- and intermolecular disulfide bonds.** *A*, aliquots of  $0.2 \times 10^8$  cells of the indicated strains incubated with or without Cu-OP at the indicated concentration, resolved by 15% SDS-PAGE, and probed with anti-1C11 mAb. *B*, EpCai<sub>C107S/C122S</sub> cross-linking with FA. Aliquots of  $0.2 \times 10^8$  cells of strain producing EpCai treated (FA) or not treated (–) with formaldehyde were analyzed by 15% SDS-PAGE and immunoblotting with the anti-1C11 mAb after heating the samples at  $96^\circ\text{C}$  ( $\Delta\text{FA}$ ) or not.

teine residue(s) involved in EpCai dimerization following incubation with Cu-OP, we constructed four mutated EpCai proteins, each with a different single cysteine replaced with serine. EpCai<sub>C31S</sub>, EpCai<sub>C107S</sub>, and EpCai<sub>C122S</sub> were produced in amounts similar to the wild-type, but EpCai<sub>C74S</sub> could not be detected by immunoblotting with the monoclonal antibody 1C11 (Fig. 3A). Furthermore, EpCai<sub>C31S</sub>, EpCai<sub>C107S</sub>, and EpCai<sub>C122S</sub> each conferred the ColA-insensitive phenotype to an *E. coli* strain transformed with the corresponding plasmids, whereas the same strain transformed with the EpCai<sub>C74S</sub> construct stayed ColA-sensitive (Table 1). We discovered that the Cys<sup>74</sup> to Ser transition led to a thermosensitive phenotype, and therefore we evaluated EpCai<sub>C74S</sub> production at various temperatures (Fig. 3B): EpCai<sub>C74S</sub> was detected at  $25^\circ\text{C}$ ,  $30^\circ\text{C}$ , and  $33^\circ\text{C}$  but not at  $37^\circ\text{C}$ . Moreover, an *E. coli* strain transformed by the plasmid encoding EpCai<sub>C74S</sub> was insensitive to ColA at  $30^\circ\text{C}$ , demonstrating that EpCai<sub>C74S</sub> is produced and functional at this temperature. To identify the residue involved in EpCai dimerization, cells producing the various mutated EpCai were incubated with each of a series of concentrations of Cu-OP. Doses of 20–50  $\mu\text{M}$  Cu-OP effec-

tively catalyzed the dimer formation for EpCai wild type, EpCai<sub>C31S</sub>, EpCai<sub>C74S</sub>, and EpCai<sub>C122S</sub> whereas 100  $\mu\text{M}$  Cu-OP was required for EpCai<sub>C107S</sub> dimerization (Figs. 2A and 3C). These results suggest that Cys<sup>107</sup> is involved in EpCai dimerization at low Cu-OP concentrations and that if it is replaced by a serine residue, EpCai can dimerize at a high Cu-OP concentration through another cysteine residue. Each of the EpCai mutants was incubated with Cu-OP and subjected to Western blotting. A band corresponding to an oxidized monomeric form of EpCai was detected for EpCai<sub>C31S</sub>, EpCai<sub>C107S</sub>, and EpCai<sub>C122S</sub> but not for EpCai<sub>C74S</sub>. This suggests that Cys<sup>74</sup> is involved in intramolecular disulfide bonds with Cys<sup>31</sup>, Cys<sup>107</sup>, or Cys<sup>122</sup>.

*[EpCai]<sub>2</sub> Dimerizes through Its TMS3*—To identify the cysteine residue involved in the dimerization of EpCai carrying the C107S mutation, we constructed the following double serine substitutions: Ser<sup>31</sup>/Ser<sup>107</sup>, Ser<sup>74</sup>/Ser<sup>107</sup>, and Ser<sup>107</sup>/Ser<sup>122</sup> and tested them for dimerization upon Cu-OP incubation. Dimer formation was observed for all of the double mutants except Ser<sup>107</sup>/Ser<sup>122</sup> (Fig. 4A). Therefore, EpCai preferentially forms dimers through Cys<sup>107</sup> (Fig. 3C) but can

## Ion Channel Inhibition



**FIGURE 5. Immunoblot analysis of cross-linked EpCai proteins containing cysteine substitutions in TMS3.** *A*, aliquots of  $0.2 \times 10^8$  cells of the indicated strains were incubated with or without Cu-OP at the indicated concentration ( $O_{20}$ , 20  $\mu\text{M}$ ;  $O_{50}$ , 50  $\mu\text{M}$ ) or with 25 mM  $\beta$ -me (*R*), and analyzed by 15% SDS-PAGE and immunoblotting with anti-1C11 mAb. *B*, helical wheel projection of the predicted transmembrane  $\alpha$ -helix 3 of EpCai. The percentage next to each residue is the percentage of cross-linked dimer formed after oxidation with 50  $\mu\text{M}$  Cu-OP at room temperature for 20 min. The strongly interacting face of TMS3 is indicated with a solid arrow.

also dimerize through Cys<sup>122</sup> if Cys<sup>107</sup> is absent (Fig. 4A). EpCai<sub>C107S/C122S</sub> is unable to form dimers following treatment with Cu-OP (Fig. 4A), so we tested whether this double EpCai mutant exists as a monomer or a dimer in the inner membrane. We found that dimers of EpCai<sub>C107S/C122S</sub> were being observed following FA treatment (Fig. 4B), demonstrating that even in absence of Cys<sup>107</sup> and Cys<sup>122</sup>, EpCai exists as a dimer in the inner membrane.

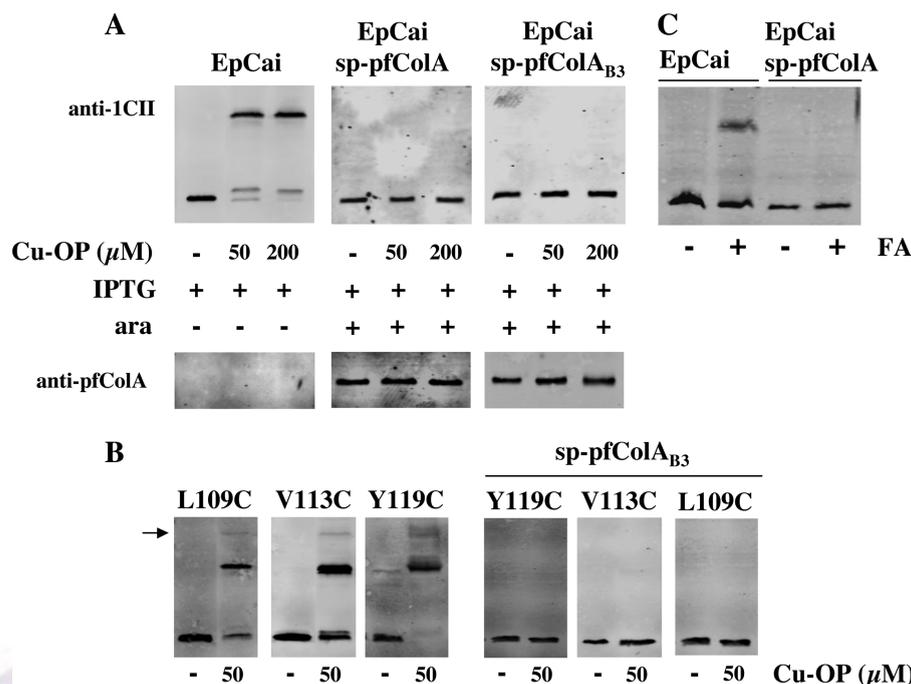
**Systematic Cysteine Scanning Mutagenesis of TMS3**—To determine which face of the TMS3 helix is involved in EpCai dimerization, we used the Ser<sup>107</sup>/Ser<sup>122</sup> double mutant and replaced several other residues of TMS3 with cysteine. Sixteen unique cysteine mutations covering TMS3 residues 106–123 were constructed (Fig. 5A). Following oxidation, most of the cysteine variants were observed as dimers, which reverted to monomers after treatment with  $\beta$ -me. At low concentrations of Cu-OP (20 and 50  $\mu\text{M}$ ), all constructs with substitutions at positions 106–109 were efficiently cross-linked, sug-

gesting that this part of the helix is relatively mobile, consistent with its location at the helix end, close to the cytoplasm. Note that Cys<sup>107</sup> is in this region. For the cysteine substitutions at positions 110 to 123, only the mutants with cysteine residues on one face of the helix were able to cross-link, as depicted on the helical wheel projection in Fig. 5B showing the positions of the residues involved in EpCai dimerization; This face of the TMS3 helix is on the side opposite Cys<sup>107</sup>.

**Intramolecular Disulfide Bonds Connect TMS1 to TMS2 or TMS2 to TMS3**—We show above that Cys<sup>74</sup> is involved in intramolecular disulfide bond formation (Fig. 3C) with Cys<sup>31</sup>, Cys<sup>122</sup>, or Cys<sup>107</sup>. However single C31S, C107S, and C122S substitutions did not abolish intramolecular disulfide bonds, suggesting that Cys<sup>74</sup> is in close contact with at least two other cysteines. The C31S/C107S and C107S/C122S EpCai mutants, but not the C31S/C122S mutant, were able to form intramolecular bonds (Fig. 4A). Therefore, formation of intramolecular disulfide bonds required the presence of Cys<sup>74</sup> and Cys<sup>31</sup> or Cys<sup>74</sup> and Cys<sup>122</sup>. In agreement with this result, these three cysteine residues are located on the periplasmic side of TMSs, whereas Cys<sup>107</sup> is located on the cytoplasmic side (Fig. 1).

**Hydrophobic Helical Hairpin of pfColA Prevents Cross-linking of EpCai by Cu-OP**—Our results indicate that EpCai dimerizes through the TMS3 in the inner membrane and that TMS2 is in close contact with TMS1 and TMS3. To determine the effect of the interaction between the pore-forming domain of ColA and EpCai, we co-produced the two proteins in the inner membrane. The pore-forming domain of ColA (pfColA) fused to a signal peptide (sp-pfColA) inserts into the inner membrane of *E. coli* and forms a functional channel (24). However, an *E. coli* strain harboring a plasmid encoding EpCai is immune to sp-pfColA, and therefore EpCai and sp-pfColA can be produced in the same cells (17). The production of EpCai was induced first through the addition of 100  $\mu\text{M}$  isopropyl 1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside. One hour later, production of sp-pfColA was induced by the addition of arabinose (0.5 mg/ml) for 30 min. In these conditions, sp-pfColA is produced in excess with respect to the EpCai and is lethal for the producing bacteria (24). Last, Cu-OP was added or not to the culture, which was incubated for 15 min and then harvested. The two proteins were detected by immunoblotting with the monoclonal antibody 1C11 and with a polyclonal antibody directed against pfColA (Fig. 6A). In the absence of sp-pfColA, EpCai was converted into [EpCai]<sub>2</sub> upon Cu-OP treatment, as described above. Conversely, the production of sp-pfColA led to the absence of [EpCai]<sub>2</sub>, and only the reduced monomeric form of EpCai was detected (Fig. 6A). This indicates that the interaction between pfColA and EpCai prevents both [EpCai]<sub>2</sub> formation and intramolecular disulfide bond formation by Cu-OP. To confirm these findings, we constructed three new single cysteine mutants: L109C, V113C, and Y119C. These three mutated EpCai efficiently protected the producing cells against ColA at 30 °C. As for the C74S substitution, the Y119C substitution led to a thermo-sensitive phenotype (data not shown). These three single cysteine mutants dimerized following incubation with Cu-OP either through the native Cys<sup>107</sup> or the introduced cysteine

## Ion Channel Inhibition

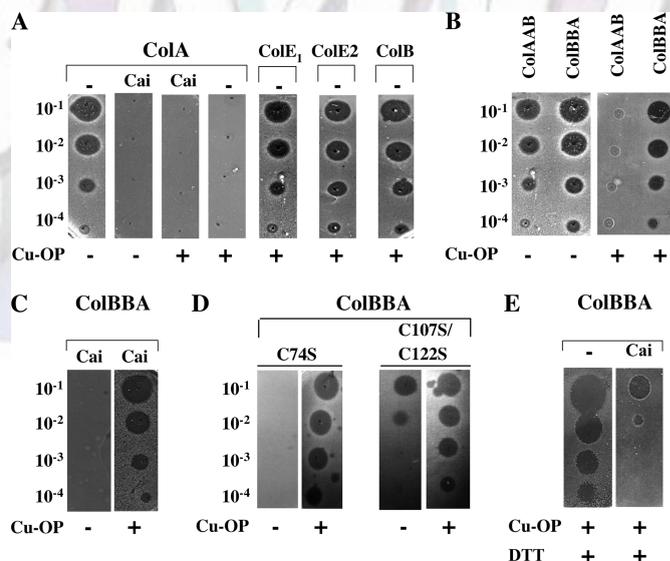


**FIGURE 6. *sp-pfColA* prevents EpCai dimerization.** *A*, strains producing EpCai, EpCai and *sp-pfColA*, or EpCai and *sp-pfColA*<sub>B3</sub> grown at 37 °C and incubated for 60 min with 100  $\mu$ M isopropyl 1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (*l*PTG), then 30 min with 0.5 mg/ml arabinose. Samples ( $0.2 \times 10^8$  cells) were incubated with the indicated concentration of Cu-OP and analyzed by 15% SDS-PAGE and immunoblotting with the anti-1C11 mAb (*upper panel*) or the anti-pfColA polyclonal Ab (*lower panel*). *B*, as in *A*, with strains producing EpCai L109C, EpCai V113C, EpCai Y119C, and co-producing or not *sp-pfColA*<sub>B3</sub>. Samples were immunoblotted with the anti-1C11 mAb only. The arrow indicates the position of the EpCai trimer. *C*, *sp-pfColA* preventing EpCai dimerization with FA. Aliquots of  $0.2 \times 10^8$  cells of strains producing EpCai, EpCai, and *sp-pfColA* were treated (FA) or not (–) with formaldehyde. Cell extracts were analyzed by 15% SDS-PAGE and immunoblotting with the anti-1C11 mAb.

(Fig. 6*B*). Furthermore, trimeric forms of EpCai were observed, suggesting that the native and the introduced cysteines can both simultaneously form disulfide bonds. In the presence of pfColA, none of the three mutated EpCai proteins dimerized upon Cu-OP incubation. This indicates that the presence of pfColA prevents dimerization of EpCai irrespective of the position of cysteines in TMS3. Analogous results were obtained with the inactive EpCai triple mutants C107S/L109C/C122S, C107S/V113C/C122S, and C107S/Y119C/C122S, which contain only one cysteine in TMS3. To corroborate these results, we performed cross-linking experiments in presence of another cross-linker, FA, which can react with primary amino groups: in the presence of *sp-pfColA*, wild-type EpCai was only detected as a monomer (Fig. 6*C*).

We tested whether *sp-pfColA* in its closed state similarly prevented EpCai cross-linking by Cu-OP. We used *sp-pfColA*<sub>B3</sub> which carries two substitutions (A492E/F493P) in the loop region connecting helices 5 and 6 of pfColA. This double substitution abolishes the channel activity of pfColA but does not prevent membrane insertion (25). We produced EpCai in the presence and absence of *sp-pfColA*<sub>B3</sub> and performed the cross-linking assay with Cu-OP (Fig. 6*A*). In the closed state, pfColA prevented Cu-OP-catalyzed cross-linking of wild-type EpCai (Fig. 6*A*) and mutated EpCai proteins (data not shown). Therefore, channel activity is not required, and the presence of *sp-pfColA* in the membrane is sufficient to abolish EpCai cross-linking.

**EpCai Incubated with Cu-OP Is Inactive**—We next tested whether covalent Cai dimers protected the cell against ColA. Cells producing Cai were totally immune to ColA, whereas



**FIGURE 7. Oxidized Cai is inactive.** Agar plates containing or not 200  $\mu$ M Cu-OP or 200  $\mu$ M Cu-OP and 5 mM DTT (*E*) were overlaid with *E. coli* C600 cells constitutively producing or not producing Cai or mutated Cai (*D*), as indicated. Then, 1  $\mu$ l of a serial dilution of ColA, ColE1, ColE2, or ColB (*A*), ColAAB or BBA (*B–E*) was dropped onto each plate. The absence of zones of killing indicates biological resistance to colicins. These experiments were performed at 30 °C.

ColA efficiently killed sensitive, Cai-free cells (Fig. 7*A*). Surprisingly, sensitive cells incubated with Cu-OP became insensitive to ColA but remained sensitive to other pore-forming colicins, including ColE1 and ColB, and to the nuclease colicins ColE2 (Fig. 7*A*). We suspected that at least one of the proteins involved in the ColA translocation through the

## Ion Channel Inhibition

*E. coli* envelope was affected by Cu-OP. To test this we added hybrid colicins AAB and BBA (26) to sensitive cells incubated in the presence or absence of Cu-OP. ColAAB consists of the first two domains of ColA fused to the pore-forming domain of ColB, and ColBBA consists of the first two domains of ColB fused to the pore-forming domain of ColA. As expected, the two hybrid colicins were fully active against sensitive cells, whereas only ColBBA was active against sensitive cells incubated with Cu-OP (Fig. 7B). This confirms that ColA binding or translocation through the *E. coli* envelope is affected by Cu-OP but that pore-forming activity is not. We then tested ColBBA activity on cells producing Cai incubated with or without Cu-OP. In the absence of Cu-OP, Cai effectively protected the cells against added ColBBA (12). Conversely, the protection conferred by Cai was completely abolished by incubation with Cu-OP (Fig. 7C). This clearly demonstrates that the oxidized Cai locked by disulfide bonds is unable to prevent ColA pore formation.

To determine which disulfide bonds inactivate Cai, we tested ColBBA activity on cells producing either EpCai<sub>C107S/C122C</sub> or EpCai<sub>C74S</sub>. In the presence of Cu-OP, EpCai<sub>C107S/C122C</sub> is unable to form intermolecular disulfide bonds, and EpCai<sub>C74S</sub> does not form intramolecular disulfide bonds. These two mutated EpCai were inactive when Cu-OP was added (Fig. 7D), suggesting that the intramolecular and the intermolecular disulfide bonds are both independently able to inactivate the immunity protein.

Finally, to demonstrate that the EpCai inactivity following incubation with Cu-OP results from disulfide bond formation and not from any secondary effects of metal ions such as Cu<sup>2+</sup>, we tested ColBBA activity on cells producing and not producing EpCai in the presence of Cu-OP and in the presence of the reducing agent DTT (Fig. 7E). In the presence of DTT, EpCai effectively protected the cells against the lethal action of ColBBA and reversed the effect of Cu-OP.

## DISCUSSION

The topological model of Cai, constructed from biochemical and genetic analyses (10, 11), indicates the presence of four transmembrane segments. However, little was known about either the three-dimensional arrangement of the TMSs within the inner membrane or the oligomeric state of Cai. The Cai sequence does not contain any canonical motif likely to mediate the noncovalent association of the TMSs: in particular, there is no leucine heptad motif and no GXXXG motif, known to mediate association of TMSs (27, 28).

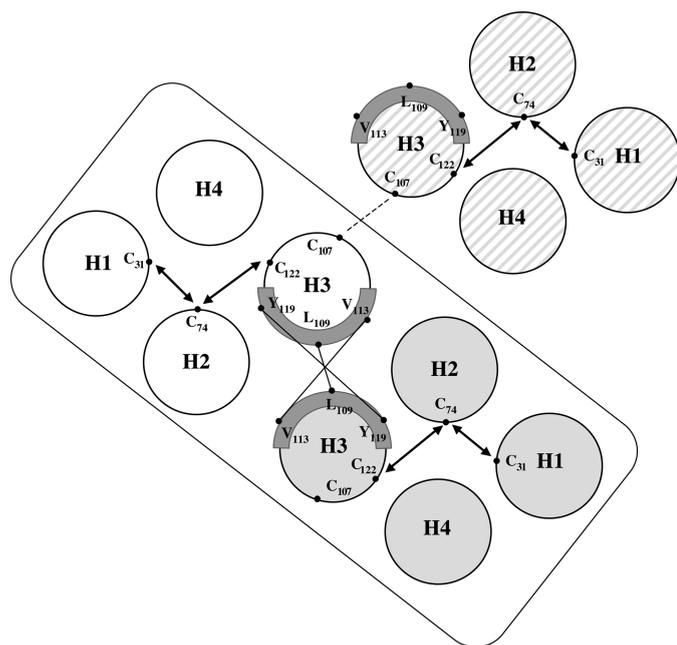
To investigate the helix packing of Cai, we used Cu-OP, a zero-length cross-linker of Cys residues. In the presence of Cu-OP, EpCai migrated as a dimer in SDS-PAGE. We studied the physiological relevance of this dimerization. Indeed, the observed dimerization may have been artifactual, resulting from simple aggregation of EpCai and/or random collisions. In a previous study on the biosynthesis and insertion of Cai, Géli *et al.* found that noninserted Cai protein did not aggregate but was rapidly degraded (10); consequently, they indicate that the amount of Cai detected in the membrane by immunoblot analysis after SDS-PAGE reflects insertion of Cai into the membrane. Here, we verified that after induction of

the genetic construct, EpCai was recovered in the membrane fraction and was only solubilized in the presence of detergent, suggesting that the protein was correctly inserted into the inner membrane and not aggregated (data not shown). Ji and Middaugh demonstrated that the formation of random collisional cross-linking of membrane proteins is a rare event occurring only under extreme conditions of high protein concentration and long times of incubation (29). Even after inducing overexpression of the gene, EpCai has been reported to be only minor protein of the inner membrane (20). Furthermore, we used short times of incubation (usually 15 min) with Cu-OP or FA to assure that cross-linking reflected specific interactions rather than random proximity. Three further observations confirm that EpCai dimers occur naturally: EpCai appears to dimerize along a specific surface (TMS3) rather than randomly; second, point mutation specifically abolished dimer formation; and finally EpCai dimer formation was completely abolished by the presence of its target, the ColA C-terminal domain.

In the presence of Cu-OP, we detected a shift in the electrophoretic mobility of EpCai (Fig. 2A). We associated this mobility shift to the formation of an intramolecular disulfide bond. Such mobility shifts have been previously used to analyze cross-linking of the Tar chemotactic receptor (30), and subunit *a* of *E. coli* ATP synthase (31). In general, cross-linking between helices results in a more compact structure in SDS leading to a faster electrophoretic migration through the polyacrylamide gel. However, the presence of a disulfide bond can also have an opposite effect and lead to lower electrophoretic mobility, as for example the cardiac Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger proteins (32). In our case, disulfide bond formation reduced the mobility of EpCai in SDS-PAGE (Figs. 2A, 3, and 4). This shift in the mobility can be attributed to formation of an intramolecular disulfide bond between TMSs of EpCai for the following reasons: (i) in the absence of Cu-OP, this shift was never observed (Fig. 2, A and B); (ii) the sequential treatment with Cu-OP, NEM, and then  $\beta$ -me, which reduces and breaks disulfide bonds, abolished the shift in mobility (Fig. 2A); and (iii) we did not observe a shift after Cu-OP treatment either with the mutants EpCai<sub>C74S</sub> and EpCai<sub>C31S/C122S</sub> or when wild-type EpCai was co-produced with sp-pfColA (Figs. 3C, 4A, and 6A).

To identify the cysteine residues involved in intra- and intermolecular disulfide bond formation, we used a reverse cysteine scanning approach. A mutated form of EpCai lacking all of the four natural cysteine residues was constructed. However, this EpCai quadruple mutant was unstable, even at low temperature, and could not be visualized by Western blotting. Only in those constructs with single serine mutations or the double serine mutation C31S/C107S was EpCai activity not significantly affected. All other mutations (double or triple) affected EpCai activity to various degrees (Table 1). However, we were able to visualize and discriminate all of the different forms of the mutated proteins by Western blotting (monomer *versus* dimer, with or without intramolecular disulfide bonds), and therefore obtain information about helix packing in the membrane. We clearly demonstrate that EpCai forms homodimers through its TMS3 and that in one monomer TMS2

## Ion Channel Inhibition



**FIGURE 8. Model of Cai helix packing and dimerization.** White and gray circles represent the four TMSs (H1–H4) of two monomers of Cai that form the dimer. Double-headed arrows indicate intramolecular disulfide bonds between Cys residues, and black lines indicate intermolecular disulfide bonds. A large gray arc represents the TMS3 helix face involved in dimerization. The dotted line indicates a potential interaction between one Cai monomer represented with white circles and another Cai monomer depicted with four hatched circles.

is in close contact with TMS1 and TMS3. The natural cysteine 107 and the region of the TMS3 helix involved in dimer formation are on opposite side of TMS3 (Fig. 5B). When the residues at positions 106–109 are replaced with cysteines they are able to cross-link like the natural cysteine 107, suggesting that this region is flexible. Such flexibility is consistent with its location at the N terminus of TMS3 and could explain why Cys<sup>107</sup> is able to come into close proximity with the same residue of a neighboring monomer. Thus, EpCai appears to form homodimers through one face of the TMS3 helix, and the observed cross-linking through the native cysteine 107 is possible because of the high flexibility of the 106–109 region. The high mobility of the 106–109 region and Cys<sup>107</sup> in particular may explain why EpCai is able to form trimers when cysteines are introduced in positions 109, 113, and 119 (Fig. 6B). Two observations are quite surprising: the failure of the A126C construct to cross-link and the efficient cross-linking of the F121C construct (Fig. 5B). The A126C mutant may be unable to cross-link due to the tight packing of residues at the interface of the helix dimer. A126C may be disruptive as a result of steric hindrance to helix packing. Phe<sup>121</sup> is at the end of the helix, close to the periplasm and therefore may be in a relatively mobile region. These various findings allow us to propose a preliminary model of the arrangement of the helices in the membrane (Fig. 8).

Interestingly, the presence of pfColA modifies Cai helix packing. When pfColA is co-produced and targeted to the *E. coli* inner membrane, EpCai does not form any disulfide bonds, indicating that pfColA modifies both the dimer interface of EpCai and the respective orientations of the TMSs

within the monomers. Disulfide bonding is also inhibited by an inactive form of pfColA, which inserts into the membrane by its hydrophobic helical hairpin, but is unable to form a channel. The hydrophobic helical hairpin of pfColA thus alters the relative distances between residues 31 and 74, and residues 74 and 122 in within the protein molecule and also between residues 107, 109, 113, 119 of adjacent protein molecules. Interaction between EpCai and its target pfColA results in major modifications of the helix packing in EpCai, and in particular an increase of the distance between the two adjacent TMSs3. This interaction also prevented Cys<sup>107</sup> from forming a disulfide bond with the same residue of a neighboring monomer, indicating decreased flexibility of the Cys<sup>106</sup>–Cys<sup>109</sup> region. TMS3 has been identified as a key region for helix-helix interaction between immunity proteins and their cognate colicins (16, 33, 34). Possibly, in the absence of pfColA, the arrangement of the TMSs of EpCai are mobile as suggested by the intramolecular disulfide bonds formed in oxidative conditions being at any of various different positions. Espeset *et al.* (19) suggested that a certain degree of mobility between the helices of EpCai might be important for the interaction between these helices and the hydrophobic helical hairpin of the pore-forming domain and the subsequent inactivation of the colicin. In agreement with this notion, an intermolecular disulfide bond or an intramolecular disulfide bond introduced into EpCai that reduced interhelix mobility also inactivated the protein (Fig. 7). It is also clear that the conformation of EpCai in the presence of pfColA is different from that in its absence: the presence of pfColA leads to the absence of both intramolecular and intermolecular disulfide bonds (Fig. 6A).

In summary, investigating cross-linking involving introduced or native cysteine residues in Cai allowed us to show that Cai is a dimer in the membrane. The positions of cysteine involved in intra- or intermolecular disulfide bonds allow us to propose a model of the dimer showing both the arrangement of the TMSs in the monomers and that TMS3 is involved in dimerization. Most importantly, we found that pfColA interacts with the Cai dimer and that this interaction modifies both Cai dimer interaction and the arrangement of the helices inside the two monomers. Although we do not show conclusively that pfColA dissociates the EpCai dimer, preliminary results reported here are in favor of this hypothesis (Fig. 6). These findings have important implications for the understanding of ColA inactivation by Cai and direct attention the role of the Cai dimer in pfColA inactivation.

*Acknowledgments*—We thank Hervé Célia, Steve Garvis, and Eric Cascales for critical reading of the manuscript and helpful suggestions; V. Géli for advice and discussion; and John Deuf for skilled technical assistance.

## REFERENCES

1. Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleantous, C., Lloubès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., and Cavard, D. (2007) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 158–229
2. Parker, M. W., Pattus, F., Tucker, A. D., and Tsernoglou, D. (1989) *Nature* **337**, 93–96

**Ion Channel Inhibition**

3. Elkins, P., Bunker, A., Cramer, W. A., and Stauffacher, C. V. (1997) *Structure* **5**, 443–458
4. Hilsenbeck, J. L., Park, H., Chen, G., Youn, B., Postle, K., and Kang, C. (2004) *Mol. Microbiol.* **51**, 711–720
5. Vetter, I. R., Parker, M. W., Tucker, A. D., Lakey, J. H., Pattus, F., and Tsernoglou, D. (1998) *Structure* **6**, 863–874
6. Wiener, M., Freymann, D., Ghosh, P., and Stroud, R. M. (1997) *Nature* **385**, 461–464
7. Slatin, S. L., Qiu, X. Q., Jakes, K. S., and Finkelstein, A. (1994) *Nature* **371**, 158–161
8. Slatin, S. L., Nardi, A., Jakes, K. S., Baty, D., and Duché, D. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 1286–1291
9. Schramm, E., Olschläger, T., Tröger, W., and Braun, V. (1988) *Mol. Gen. Genet.* **211**, 176–182
10. Geli, V., Baty, D., Pattus, F., and Lazdunski, C. (1989) *Mol. Microbiol.* **3**, 679–687
11. Song, H. Y., and Cramer, W. A. (1991) *J. Bacteriol.* **173**, 2935–2943
12. Geli, V., and Lazdunski, C. (1992) *J. Bacteriol.* **174**, 6432–6437
13. Zhang, Y. L., and Cramer, W. A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 10176–10184
14. Pils, H., and Braun, V. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 6966–6972
15. Lindeberg, M., and Cramer, W. A. (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 2132–2136
16. Pils, H., Smajs, D., and Braun, V. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 4111–4115
17. Espeset, D., Duché, D., Baty, D., and Géli, V. (1996) *EMBO J.* **15**, 2356–2364
18. Nardi, A., Corda, Y., Baty, D., and Duché, D. (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 6721–6725
19. Espeset, D., Piet, P., Lazdunski, C., and Géli, V. (1994) *Mol. Microbiol.* **13**, 1111–1120
20. Geli, V., Baty, D., and Lazdunski, C. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 689–693
21. Nardi, A., Slatin, S. L., Baty, D., and Duché, D. (2001) *J. Mol. Biol.* **307**, 1293–1303
22. Journet, L., Bouveret, E., Rigal, A., Llobès, R., Lazdunski, C., and Bénédicti, H. (2001) *Mol. Microbiol.* **42**, 331–344
23. Cascales, E., Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J. C., and Llobès, R. (2002) *J. Bacteriol.* **184**, 754–759
24. Duché, D. (2002) *Biochimie* **84**, 455–464
25. Duché, D., Corda, Y., Géli, V., and Baty, D. (1999) *J. Mol. Biol.* **285**, 1965–1975
26. Duché, D., Letellier, L., Géli, V., Bénédicti, H., and Baty, D. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 4935–4939
27. Sato, Y., Zhang, Y. W., Androutsellis-Theotokis, A., and Rudnick, G. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 22926–22933
28. Lemmon, M. A., Treutlein, H. R., Adams, P. D., Brünger, A. T., and Engelman, D. M. (1994) *Nat. Struct. Biol.* **1**, 157–163
29. Ji, T. H., and Middaugh, C. R. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **603**, 371–374
30. Lee, G. F., Burrows, G. G., Lebert, M. R., Dutton, D. P., and Hazelbauer, G. L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 29920–29927
31. Schwem, B. E., and Fillingame, R. H. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 37861–37867
32. Ren, X., Nicoll, D. A., Galang, G., and Philipson, K. D. (2008) *Biochemistry* **47**, 6081–6087
33. Smajs, D., Dolezalová, M., Macek, P., and Zidek, L. (2008) *FEBS J.* **275**, 5325–5331
34. Smajs, D., Matejková, P., and Weinstock, G. M. (2006) *FEMS Microbiol. Lett.* **258**, 108–113





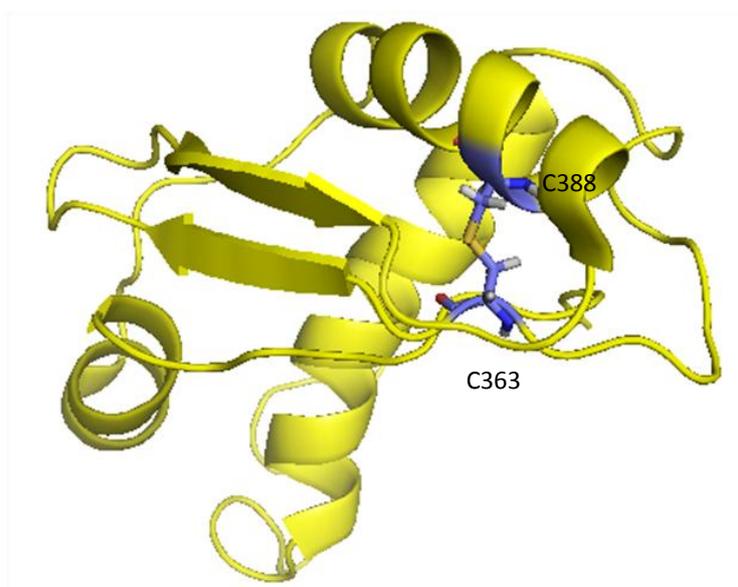
**CONCLUSION ET DISCUSSION:**

Les protéines d'immunité des colicines ionophoriques sont des protéines intégrales de membrane. Les gènes codant pour les protéines d'immunité sont portés par les plasmides colicinogéniques, et leur transcription est sous contrôle d'un promoteur constitutif. Mais la faible expression du gène en fait une protéine mineure dans la membrane. La protéine d'immunité de la colicine A (Cai) possède 4 hélices transmembranaires. Il existe peu d'informations sur l'organisation des 4 hélices transmembranaires de Cai. La séquence primaire de la protéine montre l'absence des motifs d'interaction hélice-hélice classiques, comme le motif Gxx(x)G. Le traitement de la cellule productrice de Cai par le CuOP ou le FA, révèle la présence d'une forme dimérique de Cai. La faible quantité de protéine présente dans la membrane et le court temps d'incubation avec l'agent pontant excluent la possibilité d'un pontage artefactuel.

Afin de déterminer les résidus impliqués dans la formation des ponts disulfures, nous avons effectué une mutagenèse dirigée des résidus cystéines ainsi qu'un « cysteine scanning » complet de l'hélice 3. Une interface de dimérisation a été identifiée. En se basant sur des résultats obtenus sur la colicine Y et sa protéine d'immunité, il semblerait que l'hélice 3 des protéines d'immunité du groupe A joue un rôle important dans l'inactivation de leur colicine. Les résidus S104 (C107 chez Cai) et S107 (S110 chez Cai) de l'hélice 3 de Cyi (homologue de Cai et protéine d'immunité de la colicine Y) semblent interagir avec les résidus I578, T582 et Y585 localisés dans l'épingle hydrophobe de la colicine Y (Smajs, et al. 2008). D'après ces résultats nous pouvons en déduire que la face de l'hélice 3 qui contient le résidu C107 de Cai est l'interface d'interaction colicine- protéine d'immunité. Un test de « cystéine scanning » des hélices 8 et 9 du domaine C-terminal de colicine A est en cours afin d'identifier les résidus impliqués dans l'interaction colicine-immunité.

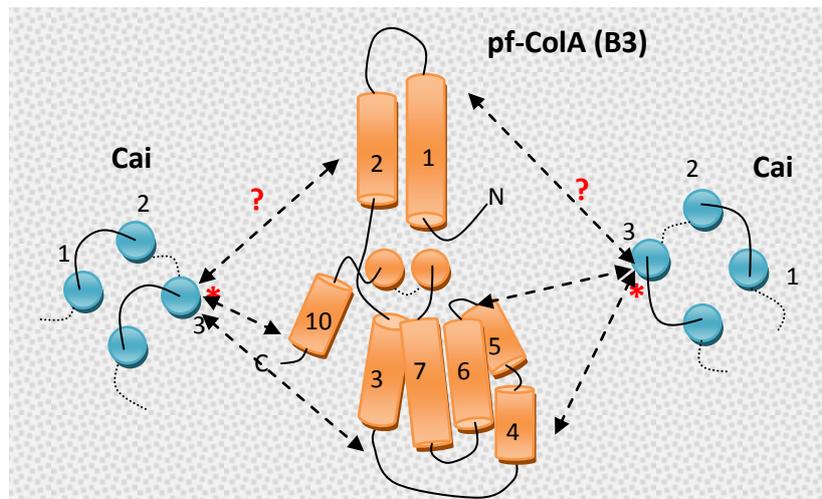
Nous avons remarqué que la protéine Cai montre une grande intolérance aux mutations ponctuelles. En effet, la substitution de C74S ou Y119C confère la thermosensibilité à la protéine Cai. Le même phénotype a été observé chez la plupart de double mutants sauf C31S/C107S. Les triples mutants sont tous thermosensibles et inactifs. Le quadruple mutant a été construit mais il semble que cette construction soit très instable et nous n'avons pas pu observer la production même à basse température. Cette intolérance suggère l'existence d'un réseau d'interactions entre les résidus. Le changement de substitution d'un atome de soufre en oxygène pourrait avoir un effet domino qui entraînerait un résultat catastrophique.

La colicine A est inactivée si nous traitons préalablement la cellule au CuopP. La colicine BBA est active. Ce résultat montre que le traitement au CuopP inactive l'étape de réception ou de translocation de la colicine A. La colicine A dépend de BtuB, OmpF, et du système Tol pour entrer dans la cellule. L'analyse des séquences montre que seule la protéine TolA possède 2 cystéines situées dans son domaine périplasmique. Ces deux cystéines peuvent former un pont disulfure en condition oxydante.



**Figure III-6 : Structure RMN du domaine C-terminal de TolA représentée en ruban, la cystéine 363 et la cystéine 388 du domaine C-terminal sont représentées. PDB : 1S62**

L'insensibilité des cellules à la colicine A après le traitement des cellules au CuopP est très probablement due à la formation de ce pont disulfure. Si tel est le cas, le phénotype d'insensibilité à la colicine A pourrait être inversé par le traitement des cellules déjà traitées aux CuopP par un agent réducteur tel que le DTT. En effet, les cellules subissant ce traitement sont redevenues sensibles à la colicine A. Ceci suggère que la formation de ce pont disulfure inactive la colicine A. Cependant le mécanisme d'inactivation reste méconnu. Certaines pistes ont été suspectées. Dans notre laboratoire, Banénoud *et coll.* ont démontré récemment que l'activité de la colicine A était dépendante d'un clivage dans le domaine périplasmique de TolA. Le clivage provoque la libération d'une petite partie de ce domaine C-terminal. La formation d'un pont disulfure pourrait inhiber la libération de cette partie et ainsi inhiber l'entrée de la colicine A.



**Figure III-7 : Représentation des complexes Cai-pfColA au sein d'une membrane (vue de l'extérieur de la cellule). Au milieu pf-ColA (orange) est présentée sous forme de canal fermé. Les deux positions possibles (à gauche ou à droite) de Cai sont indiquées.**

Afin d'avoir plus d'informations sur la région d'interaction entre la colicine A et la protéine d'immunité et d'identifier les résidus impliqués dans l'interaction, une étude par FRET pourrait nous aider à élucider l'organisation exacte de sp-pfColA et des hélices impliquées dans la reconnaissance entre ces deux protéines. Un essai de purification suivie d'une cristallisation de la protéine Cai et un test de RMN seraient aussi envisagés. Les résultats de ces expériences nous permettraient enfin d'élucider la structure mystérieuse de la protéine d'immunité.



**CHAPITRE III :**  
**CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET**  
**PERSPECTIVES**



## CONCLUSION GENERALE :

Dans cette thèse, l'organisation fonctionnelle de 3 protéines intégrales de membrane a été étudiée.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'organisation d'un système protéique de l'enveloppe d'*E. coli*, le système Tol-Pal. Les protéines du système Tol-Pal sont impliquées dans la maintenance de l'intégrité de la membrane externe et dans la division cellulaire. Les protéines TolA-TolQ-TolR forment un complexe de la membrane interne. Ce complexe connecte la membrane externe via un autre complexe TolB-Pal associé à la membrane externe et au peptidoglycane. Ce lien entre la membrane interne et la membrane externe se fait par l'interaction entre la protéine TolA et la lipoprotéine de membrane externe Pal et dépend du potentiel membranaire mais aussi des protéines TolQ et TolR de membrane interne.

L'alignement de séquences des segments transmembranaires des couples de protéines TolQ-R, ExbB-D, et MotA-B a révélé un consensus général de résidus conservés. Les données cumulées concernant le système Tol-Pal ont permis de proposer un modèle d'arrangement et de fonctionnement du complexe de membrane interne TolQ-R-A. Les protéines TolQ-R-A formeraient un moteur moléculaire utilisant la force proton-motrice pour relier membranes interne, externe et le peptidoglycane. Dans ce modèle, les hélices 2 et 3 de TolQ ainsi que l'hélice de TolR délimiteraient un canal ionique au travers duquel pourraient transiter les protons. Le domaine C-terminal de TolR agirait comme un «filtre» contrôlant l'entrée du pore. L'entrée de proton provoquerait un réarrangement des hélices jusqu'à celle de TolA qui, en réponse, modifierait la conformation de son domaine C-terminal pour interagir avec Pal. Le complexe de membrane interne se réorganiserait alors et permettrait la libération du proton dans le cytoplasme.

L'approche «cystéine scanning» a permis de démontrer que l'ancre transmembranaire de TolR forme des homodimères. Nous avons défini une face d'interaction des hélices, opposée à celle de l'aspartate 23 et proposé un modèle d'organisation dynamique oscillant entre deux conformations extrêmes. La protéine TolR est bloquée dans l'une ou l'autre de ces conformations lorsque que le canal ionique TolQ-R est bloqué par la mutation des résidus ionisables (Asp23, Thr145, et Thr178). Ces deux conformations extrêmes se traduisent par l'état ouvert ou fermé des canaux ioniques. Un modèle similaire avait été proposé dans le cas de MotB assemblé dans le complexe MotA-B; ces données réunies suggèrent que le

mécanisme d'énergisation des trois moteurs moléculaires TolQ-R, ExbB-D, et MotA-B est certainement très proche.

Dans le modèle d'organisation du moteur TolQ-R, quatre canaux ont été proposés. L'article 1 montre que l'ancre transmembranaire de TolR oscillerait de 170°. Le mouvement de l'hélice de TolR entraînerait l'oscillation du résidu Asp23 dans deux canaux ioniques différents.

L'oscillation de TolR suggère une asymétrie entre les deux canaux impliquant la même molécule de TolR. Une hypothèse pourrait être émise suggérant que les deux canaux formés par TolR-2TolQ soient en fait deux demi-canaux. Les protons entrant du côté périplasmique dans le premier demi-canal transiteraient alors avec le mouvement rotatoire de l'hélice de TolR.

Cette étude montre que les mouvements observés au niveau de l'ancre transmembranaire de TolR sont en synergie avec ceux de son extrémité C-terminale qui ont été préalablement démontrés par Goemaère *et coll.* puisqu'ils sont dépendants des mêmes résidus ionisables. L'étude de ces mouvements est primordiale pour la compréhension du fonctionnement de ce complexe TolQ-R. Un projet d'étude par spectrométrie RPE utilisant les substitutions cystéines devrait être poursuivi afin d'étudier plus finement ces mouvements.

Ensuite nous nous sommes intéressés à l'organisation des trois segments transmembranaires de TolQ ainsi que des protéines TolQ les uns par rapport aux autres. Cette étude nous a permis de proposer une organisation des ST TolQ2 et TolQ3 de type (TM2-TM3) / (TM2-TM3) et ainsi de conserver le modèle original proposé par Cascales *et coll.* en 2001.

Les résultats obtenus chez TolQ suggèrent également l'asymétrie des deux canaux formés par une même molécule de TolR. En effet, les différents mutants suppresseurs placent les résidus localisés sur les différentes faces des ST TolQ2 et TolQ3 dans le canal ionique. Ainsi les molécules de TolQ pourraient entretenir des conformations différentes en répondant à la pmf.

Ces différents états pourraient être distingués en état ouvert ou fermé. L'aspartate 23 de TolR et les résidus Thr145 et Thr178 de TolQ2 et TolQ3 pourraient se trouver simultanément dans le canal sous forme « ouvert ». Dans le canal « fermé » se trouveraient les résidus His151 et Glu173 appartenant à une autre molécule de TolQ. Lorsque l'aspartate 23 de TolR est dans

le canal «ouvert », le canal fermé contient le résidu Thr35 de TolR avec His151 et Glu173. La rotation de l'ancre de TolR ferait passer le résidu Asp23 du canal « ouvert» vers le canal «fermé », et réciproquement pour le résidu Thr35. L'ouverture et la fermeture des canaux suggèrent alors une rotation des ST TolQ2 et TolQ3 pour que les thréonines 145 et 178 se trouvent à l'intérieur afin d'ouvrir le canal. Ce nouveau modèle nous amène à une interrogation quant aux mouvements possibles de TolQ pour la régulation de l'ouverture et de la fermeture des canaux ioniques.

L'une des perspectives à court terme de ce travail est de déterminer la position de l'ancre de TolR vis-à-vis des segments transmembranaires de TolQ. Grâce aux substitutions cystéine, les interactions entre les ST de TolQ et TolR pourront être analysées. D'autres techniques aussi seront utilisées telles que le marquage par une sonde maléimide biotinylée, fluorescente ou radiomarquée au  $^{14}\text{C}$  qui devrait permettre de détecter des résidus enfouis dans le canal (Kienker, et al. 2008; Nie, et al. 2007). Ces approches pourraient être intéressantes notamment pour marquer et délimiter le canal ionique. Nous pouvons envisager l'utilisation de réactifs thiols homobifonctionnels permettant le pontage de deux cystéines à une distance prédéfinie (pouvant varier entre 5 et 20 Å) (Zhou, et al. 2008). Cette technique permettrait l'évaluation de la distance entre deux résidus ou bloquerait les mouvements d'un système fonctionnel. Evidemment, ces approches sont utiles pour mieux comprendre le fonctionnement dynamique des systèmes dont les structures tridimensionnelles sont déjà définies (comme LacY, les pompes à efflux et le domaine ionophorique des colicines).

Pour des systèmes membranaires multiprotéiques, la difficulté de l'étude est augmentée par les contraintes de stœchiométrie et les difficultés de purification en complexe. Nous espérons que ce travail pourra aider à la résolution de la structure du complexe TolQ-R à basse résolution (par cryomicroscopie) et à haute résolution (par cristallographie). En effet, en utilisant nos avancées sur le système fonctionnel, nous espérons pouvoir bloquer le complexe dans un état multimérique homogène nécessaire pour des études structurales.

Nous avons aussi étudié l'arrangement des segments transmembranaires de la protéine d'immunité de la colicine A dans la membrane interne d'*Escherichia coli*.

Une fois entrée dans la cellule sensible, la colicine A forme un canal ionique dans la membrane interne. La cellule productrice possède une protéine antagoniste luttant contre

l'activité de la colicine A exogène. Cette protéine dénommée la protéine d'immunité Cai interagit directement sur le domaine ionophorique (C-terminal) de la colicine A dans la membrane interne de la bactérie pour inhiber son activité.

Afin d'obtenir des informations concernant l'arrangement des hélices transmembranaires de Cai au sein de la membrane, nous avons initié un « cystéine scanning ». L'analyse de séquence primaire de Cai révèle l'existence de quatre cystéines dans ses hélices transmembranaires. L'approche par pontage chimique au CuOP révèle que la protéine d'immunité Cai est sous forme dimérique dans la membrane interne de la bactérie productrice. Cette dimérisation implique les cystéines présentes dans les segments transmembranaires de Cai. Afin de déterminer les cystéines impliquées dans cette dimérisation, nous avons substitué les cystéines en sérines. Nous avons pu identifier l'implication de C107 située dans l'hélice 3 de la protéine Cai dans la dimérisation. Par la technique du « cystéine scanning » puis celle de l' « anti-cystéine-scanning », nous avons pu identifier une interface de dimérisation se trouvant sur le segment transmembranaire 3 de la protéine Cai.

Nous avons également pu déterminer la position relative des hélices 1, 2 et 3 de Cai au sein de la membrane grâce à l'identification de ponts disulfures intramoléculaires présents dans la protéine Cai. L'hélice 2 possède une position centrale dans la molécule. Elle interagit à la fois avec l'hélice 1 et hélice 3 *via* la partie de l'hélice située du côté périplasmique. Ceci est mis en évidence par la formation de pont disulfure entre le résidu C31 se trouvant sur l'hélice 1 avec le résidu C74 de l'hélice 2 et le résidu C122 de l'hélice 3 avec le résidu C74 de l'hélice 2 respectivement.

L'interaction entre le domaine ionophorique de la colicine A et sa protéine d'immunité modifie l'arrangement des hélices de Cai. Ceci se traduit par l'absence de formes dimériques et de ponts disulfures intramoléculaires. Le traitement des cellules productrices au CuOP montre que la formation des ponts disulfures inactive la protéine d'immunité. Ce résultat reflète l'importance de ce changement conformationnel, crucial pour la fonction immune de Cai.

Beaucoup de questions sont soulevées par nos résultats :

1.-Nous avons remarqué que le traitement au CuOP transforme une cellule sensible, en cellule résistante à la colicine A. Cet effet est spécifique de la colicine A. Ce processus

implique probablement des cystéines d'une ou plusieurs protéines du système de translocation. La colicine A nécessite les protéines BtuB, OmpF, TolABQR pour l'étape de translocation. L'analyse de la séquence primaire des protéines du système de translocation de la colicine A révèle que les deux cystéines présentes dans la protéine TolA pourraient former un pont disulfure intramoléculaire. Ce pont joue probablement un rôle dans le phénotype de l'inactivation de la colicine A. Un clivage de TolA a été identifié lors de la translocation de la colicine A dans la cellule en 2005 par Pommier *et coll.* (Pommier, *et al.* 2005). La libération d'un petit fragment du domaine périplasmique de TolA semble être nécessaire pour l'activité de la colicine A (Barneoud-Arnoulet, *et al* résultats non publiés). Nous suggérons que la formation de ce pont disulfure pourrait empêcher ce clivage de TolA. La substitution de ces deux cystéines par mutagenèse dirigée pourrait nous amener plus d'informations pour confirmer cette hypothèse.

2.-La fonction de la dimérisation de la protéine d'immunité est encore inconnue. C'est la première fois que nous observons, une dimérisation de la protéine d'immunité d'une colicine ionophorique. La protéine d'immunité des colicines endonucléasiques est sous forme monomérique dans le cytoplasme de la bactérie. Dans les processus biologiques, la dimérisation (ou multimérisation) permet aux protéines de s'organiser en complexe afin de former une structure fonctionnelle. (Pour revue (Marianayagam, *et al.* 2004)), tel que le site actif des enzymes (dihydrolipoyl déshydrogénase (Faure, *et al.* 2000)) ou le site de fixation des protéines régulatrices des gènes (la protéine Fur (Pecqueur, *et al.* 2006)) ou les récepteurs fonctionnels de la surface de la cellule (LDL récepteur) etc. La multimérisation des protéines permet aussi de former des complexes tel que le pore formé par les toxines (la gramicidine (Sansom, *et al.* 2000)) et les moteurs moléculaires TolQRA, TonB-ExbB-ExbD, MotA-B.

La dimérisation pourrait stabiliser la protéine d'immunité dans la membrane. Comme cela été observé chez les protéines MotA-MotB et ExbB-ExbD, l'interaction protéine-protéine stabilisant chaque monomère (Hosking and Manson 2008). Le changement conformationnel démontré par notre étude suggère que la molécule possède une grande flexibilité. La dimérisation pourrait stabiliser une de ces conformations et ainsi favoriser la reconnaissance primaire du domaine C-terminal de colicine par la protéine d'immunité. L'interaction entre la colicine A et Cai induit ensuite le changement de conformation de Cai. Cai se transforme d'un état non actif à un état actif. Ce type de changement conformationnel est couramment retrouvé chez les enzymes allostériques. Chez les colicines endonucléasiques, il a été démontré que la colicine E9 possède plusieurs conformations, une de ces conformations est stabilisée par

l'interaction colicine E9 et sa protéine d'immunité Im9 (Wallis et al. 1995; van den Bremer et al. 2004).

3.-La stœchiométrie de l'interaction entre la colicine A et Cai reste à déterminer,

La structure cristalline de la colicine E3 avec sa protéine d'immunité montre clairement que la stœchiométrie de l'interaction est de 1 : 1. Mais nous n'avons aucune donnée concernant la stœchiométrie du complexe colicine A-Cai. La stœchiométrie peut être de 1 : 1. Dans ce cas, le dimère de Cai se dissociera au profit d'une interaction avec la colicine. Cependant, l'étape précoce de la reconnaissance des deux protéines pourrait nécessiter la forme dimérique de Cai (Figure III-7 Papier III).

Des études plus fines seront nécessaires pour déterminer la vraie stœchiométrie.

4-La conformation du domaine ionophorique de la colicine A inactivé par sa protéine d'immunité est encore inconnu. Nous avons confirmé que la protéine d'immunité n'altérerait pas l'insertion de la colicine A dans la membrane interne. Même si la cellule a besoin de neutraliser le domaine ionophorique de la colicine A avant qu'il ne forme un canal ionique, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que le canal ne soit stoppé qu'un court moment après sa formation. Le laps de temps où le canal est ouvert serait trop court pour qu'il soit détecté par les techniques classiques. A l'aide de molécules fluorescentes ou de sondes de RPE, nous pourrions distinguer les différentes conformations de pfColA, libre ou associée à sa protéine d'immunité.

RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES



- Abergel, C., E. Bouveret, J. M. Claverie, K. Brown, A. Rigal, C. Lazdunski, and H. Benedetti  
 1999 Structure of the Escherichia coli TolB protein determined by MAD methods at 1.95 Å resolution. *Structure* 7(10):1291-300.
- Abergel, C., L. Journet, S. Chenivesse, M. Gavioli, and R. Lloubes  
 2001 Crystallization and preliminary crystallographic study of the periplasmic domain of the Escherichia coli TolR protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57(Pt 2):323-5.
- Abramson, J., I. Smirnova, V. Kasho, G. Verner, H. R. Kaback, and S. Iwata  
 2003 Structure and mechanism of the lactose permease of Escherichia coli. *Science* 301(5633):610-5.
- Ahmer, B. M., M. G. Thomas, R. A. Larsen, and K. Postle  
 1995 Characterization of the *exbBD* operon of Escherichia coli and the role of ExbB and ExbD in TonB function and stability. *J Bacteriol* 177(16):4742-7.
- Antonsson, B., S. Montessuit, S. Lauper, R. Eskes, and J. C. Martinou  
 2000 Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 345 Pt 2:271-8.
- Anwari, K., S. Poggio, A. Perry, X. Gatsos, S. H. Ramarathinam, N. A. Williamson, N. Noinaj, S. Buchanan, K. Gabriel, A. W. Purcell, C. Jacobs-Wagner, and T. Lithgow  
 2010 A modular BAM complex in the outer membrane of the alpha-proteobacterium *Caulobacter crescentus*. *PLoS One* 5(1):e8619.
- Asai, Y., S. Kojima, H. Kato, N. Nishioka, I. Kawagishi, and M. Homma  
 1997 Putative channel components for the fast-rotating sodium-driven flagellar motor of a marine bacterium. *J Bacteriol* 179(16):5104-10.
- Asai, Y., T. Shoji, I. Kawagishi, and M. Homma  
 2000 Cysteine-scanning mutagenesis of the periplasmic loop regions of PomA, a putative channel component of the sodium-driven flagellar motor in *Vibrio alginolyticus*. *J Bacteriol* 182(4):1001-7.
- Baboolal, T. G., M. J. Conroy, K. Gill, H. Ridley, V. Visudtiphole, P. A. Bullough, and J. H. Lakey  
 2008 Colicin N binds to the periphery of its receptor and translocator, outer membrane protein F. *Structure* 16(3):371-9.
- Bainbridge, G., G. A. Armstrong, L. G. Dover, K. F. Whelan, and J. H. Lakey  
 1998 Displacement of OmpF loop 3 is not required for the membrane translocation of colicins N and A in vivo. *FEBS Lett* 432(3):117-22.
- Barneoud-Arnoulet, A., H. Barreteau, T. Touze, D. Mengin-Lecreulx, R. Lloubes, and D. Duche

- 2010a Toxicity of the Colicin M catalytic domain exported to the periplasm is FkpA independent. *J Bacteriol.*
- Barneoud-Arnoulet, A., M. Gavioli, R. Llobes, and E. Cascales
- 2010b Interaction of the colicin K bactericidal toxin with components of its import machinery in the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*
- Barreteau, H., A. Bouhss, F. Gerard, D. Duche, B. Boussaid, D. Blanot, R. Llobes, D. Mengin-Lecreulx, and T. Touze
- 2010 Deciphering the catalytic domain of colicin M, a peptidoglycan lipid II-degrading enzyme. *J Biol Chem* 285(16):12378-89.
- Basle, A., G. Rummel, P. Storic, J. P. Rosenbusch, and T. Schirmer
- 2006 Crystal structure of osmoporin OmpC from *E. coli* at 2.0 Å. *J Mol Biol* 362(5):933-42.
- Bauer, K., M. Struyve, D. Bosch, R. Benz, and J. Tommassen
- 1989 One single lysine residue is responsible for the special interaction between polyphosphate and the outer membrane porin PhoE of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 264(28):16393-8.
- Beck, K., L. F. Wu, J. Brunner, and M. Muller
- 2000 Discrimination between SRP- and SecA/SecB-dependent substrates involves selective recognition of nascent chains by SRP and trigger factor. *EMBO J* 19(1):134-43.
- Bell, P. E., C. D. Nau, J. T. Brown, J. Konisky, and R. J. Kadner
- 1990 Genetic suppression demonstrates interaction of TonB protein with outer membrane transport proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172(7):3826-9.
- Bénédicti, H., and V Géli
- 1996 Colicin transport, channel formation and inhibition. *Handbook of biological physics* 2:665-691.
- Benedetti, H., M. Frenette, D. Baty, M. Knibiehler, F. Pattus, and C. Lazdunski
- 1991a Individual domains of colicins confer specificity in colicin uptake, in pore-properties and in immunity requirement. *J Mol Biol* 217(3):429-39.
- Benedetti, H., C. Lazdunski, and R. Llobes
- 1991b Protein import into *Escherichia coli*: colicins A and E1 interact with a component of their translocation system. *EMBO J* 10(8):1989-95.
- Benedetti, H., R. Llobes, C. Lazdunski, and L. Letellier
- 1992 Colicin A unfolds during its translocation in *Escherichia coli* cells and spans the whole cell envelope when its pore has formed. *EMBO J* 11(2):441-7.
- Benz, R

- 1984 Structure and selectivity of porin channels. *Ion channels: molecular and physiological aspects*:199.
- Berks, B. C., T. Palmer, and F. Sargent
- 2005 Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr Opin Microbiol* 8(2):174-81.
- Bernadac, A., M. Gavioli, J. C. Lazzaroni, S. Raina, and R. Lloubes
- 1998 *Escherichia coli* tol-pal mutants form outer membrane vesicles. *J Bacteriol* 180(18):4872-8.
- Bernard, C. S., M. Sadasivam, D. Shiomi, and W. Margolin
- 2007 An altered FtsA can compensate for the loss of essential cell division protein FtsN in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 64(5):1289-305.
- Bernstein, A., B. Rolfe, and K. Onodera
- 1972 Pleiotropic properties and genetic organization of the *tolA,B* locus of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 112(1):74-83.
- Berry, R. M.
- 2000 Theories of rotary motors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355(1396):503-9.
- Berry, R. M., and J. P. Armitage
- 1999 The bacterial flagella motor. *Adv Microb Physiol* 41:291-337.
- Bhatt, S., and C. L. Weingart
- 2008 Identification of sodium chloride-regulated genes in *Burkholderia cenocepacia*. *Curr Microbiol* 56(5):418-22.
- Black, P. N.
- 1991 Primary sequence of the *Escherichia coli* *fadL* gene encoding an outer membrane protein required for long-chain fatty acid transport. *J Bacteriol* 173(2):435-42.
- Blair, D. F.
- 2003 Flagellar movement driven by proton translocation. *FEBS Lett* 545(1):86-95.
- Blair, D. F., and H. C. Berg
- 1990 The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor. *Cell* 60(3):439-49.
- 
- 1991 Mutations in the MotA protein of *Escherichia coli* reveal domains critical for proton conduction. *J Mol Biol* 221(4):1433-42.
- Blair, D. F., D. Y. Kim, and H. C. Berg
- 1991 Mutant MotB proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 173(13):4049-55.

Block, S. M., and H. C. Berg

1984 Successive incorporation of force-generating units in the bacterial rotary motor. *Nature* 309(5967):470-2.

Bohme, S., P. V. Padmavathi, J. Holterhues, F. Ouchni, J. P. Klare, and H. J. Steinhoff

2009 Topology of the amphipathic helices of the colicin A pore-forming domain in *E. coli* lipid membranes studied by pulse EPR. *Phys Chem Chem Phys* 11(31):6770-7.

Bonsor, D. A., I. Grishkovskaya, E. J. Dodson, and C. Kleanthous

2007 Molecular mimicry enables competitive recruitment by a natively disordered protein. *J Am Chem Soc* 129(15):4800-7.

Bonsor, D. A., O. Hecht, M. Vankemmelbeke, A. Sharma, A. M. Krachler, N. G. Housden, K. J. Lilly, R. James, G. R. Moore, and C. Kleanthous

2009 Allosteric beta-propeller signalling in TolB and its manipulation by translocating colicins. *EMBO J* 28(18):2846-57.

Bos, M. P., and J. Tommassen

2004 Biogenesis of the Gram-negative bacterial outer membrane. *Curr Opin Microbiol* 7(6):610-6.

Bourdineaud, J. P., S. P. Howard, and C. Lazdunski

1989 Localization and assembly into the *Escherichia coli* envelope of a protein required for entry of colicin A. *J Bacteriol* 171(5):2458-65.

Bouveret, E., R. Derouiche, A. Rigal, R. Llobes, C. Lazdunski, and H. Benedetti

1995 Peptidoglycan-associated lipoprotein-TolB interaction. A possible key to explaining the formation of contact sites between the inner and outer membranes of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 270(19):11071-7.

Bouveret, E., A. Rigal, C. Lazdunski, and H. Benedetti

1997 The N-terminal domain of colicin E3 interacts with TolB which is involved in the colicin translocation step. *Mol Microbiol* 23(5):909-20.

—

1998 Distinct regions of the colicin A translocation domain are involved in the interaction with TolA and TolB proteins upon import into *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 27(1):143-57.

Bowie, J. U.

2005 Solving the membrane protein folding problem. *Nature* 438(7068):581-9.

Bradbeer, C.

1993 The proton motive force drives the outer membrane transport of cobalamin in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175(10):3146-50.

Braun, T. F., L. Q. Al-Mawsawi, S. Kojima, and D. F. Blair

- 2004 Arrangement of core membrane segments in the MotA/MotB proton-channel complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 43(1):35-45.
- Braun, T. F., and D. F. Blair
- 2001 Targeted disulfide cross-linking of the MotB protein of *Escherichia coli*: evidence for two H(+) channels in the stator Complex. *Biochemistry* 40(43):13051-9.
- Braun, T. F., S. Poulson, J. B. Gully, J. C. Empey, S. Van Way, A. Putnam, and D. F. Blair
- 1999 Function of proline residues of MotA in torque generation by the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181(11):3542-51.
- Braun, V.
- 1989 The structurally related *exbB* and *tolQ* genes are interchangeable in conferring tonB-dependent colicin, bacteriophage, and albomycin sensitivity. *J Bacteriol* 171(11):6387-90.
- Braun, V., and F. Endriss
- 2007 Energy-coupled outer membrane transport proteins and regulatory proteins. *Biometals* 20(3-4):219-31.
- Braun, V., S. Gaisser, C. Herrmann, K. Kampfenkel, H. Killmann, and I. Traub
- 1996 Energy-coupled transport across the outer membrane of *Escherichia coli*: ExbB binds ExbD and TonB in vitro, and leucine 132 in the periplasmic region and aspartate 25 in the transmembrane region are important for ExbD activity. *J Bacteriol* 178(10):2836-45.
- Braun, V., and C. Herrmann
- 1993 Evolutionary relationship of uptake systems for biopolymers in *Escherichia coli*: cross-complementation between the TonB-ExbB-ExbD and the TolA-TolQ-TolR proteins. *Mol Microbiol* 8(2):261-8.
- Braun, V., S. Mahren, and M. Ogierman
- 2003 Regulation of the Fecl-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. *Curr Opin Microbiol* 6(2):173-80.
- Braun, V., S. I. Patzer, and K. Hantke
- 2002 Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie* 84(5-6):365-80.
- Brewer, S., M. Tolley, I. P. Trayer, G. C. Barr, C. J. Dorman, K. Hannavy, C. F. Higgins, J. S. Evans, B. A. Levine, and M. R. Wormald
- 1990 Structure and function of X-Pro dipeptide repeats in the TonB proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 216(4):883-95.
- Brinkman, K. K., and R. A. Larsen
- 2008 Interactions of the energy transducer TonB with noncognate energy-harvesting complexes. *J Bacteriol* 190(1):421-7.

- Buchanan, S. K., P. Lukacik, S. Grizot, R. Ghirlando, M. M. Ali, T. J. Barnard, K. S. Jakes, P. K. Kienker, and L. Esser  
2007 Structure of colicin I receptor bound to the R-domain of colicin Ia: implications for protein import. *EMBO J* 26(10):2594-604.
- Buchanan, S. K., B. S. Smith, L. Venkatramani, D. Xia, L. Esser, M. Palnitkar, R. Chakraborty, D. van der Helm, and J. Deisenhofer  
1999 Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol* 6(1):56-63.
- Buckle, A. M., G. Schreiber, and A. R. Fersht  
1994 Protein-protein recognition: crystal structural analysis of a barnase-barstar complex at 2.0-Å resolution. *Biochemistry* 33(30):8878-89.
- Bullock, J. O., and E. R. Kolen  
1995 Ion selectivity of colicin E1: III. Anion permeability. *J Membr Biol* 144(2):131-45.
- Bullock, J. O., E. R. Kolen, and J. L. Shear  
1992 Ion selectivity of colicin E1: II. Permeability to organic cations. *J Membr Biol* 128(1):1-16.
- Bures, J., V. Horak, B. Fixa, O. Komarkova, K. Zaydlar, V. Lonsky, and V. Masurka  
1986 Colicinogeny in colorectal cancer. *Neoplasma* 33(2):233-7.
- Cadieux, N., C. Bradbeer, and R. J. Kadner  
2000 Sequence changes in the ton box region of BtuB affect its transport activities and interaction with TonB protein. *J Bacteriol* 182(21):5954-61.
- Cadieux, N., and R. J. Kadner  
1999 Site-directed disulfide bonding reveals an interaction site between energy-coupling protein TonB and BtuB, the outer membrane cobalamin transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(19):10673-8.
- Calderon, R. O., and G. H. DeVries  
1997 Lipid composition and phospholipid asymmetry of membranes from a Schwann cell line. *J Neurosci Res* 49(3):372-80.
- Cameron, D. E., J. M. Urbach, and J. J. Mekalanos  
2008 A defined transposon mutant library and its use in identifying motility genes in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(25):8736-41.
- Carr, S., C. N. Penfold, V. Bamford, R. James, and A. M. Hemmings  
2000 The structure of TolB, an essential component of the tol-dependent translocation system, and its protein-protein interaction with the translocation domain of colicin E9. *Structure* 8(1):57-66.

Cascales, E., A. Bernadac, M. Gavioli, J. C. Lazzaroni, and R. Llobes

2002 Pal lipoprotein of *Escherichia coli* plays a major role in outer membrane integrity. *J Bacteriol* 184(3):754-9.

Cascales, E., S. K. Buchanan, D. Duche, C. Kleanthous, R. Llobes, K. Postle, M. Riley, S. Slatin, and D. Cavard

2007 Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 71(1):158-229.

Cascales, E., M. Gavioli, J. N. Sturgis, and R. Llobes

2000 Proton motive force drives the interaction of the inner membrane TolA and outer membrane pal proteins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 38(4):904-15.

Cascales, E., and R. Llobes

2004 Deletion analyses of the peptidoglycan-associated lipoprotein Pal reveals three independent binding sequences including a TolA box. *Mol Microbiol* 51(3):873-85.

Cascales, E., R. Llobes, and J. N. Sturgis

2001 The TolQ-TolR proteins energize TolA and share homologies with the flagellar motor proteins MotA-MotB. *Mol Microbiol* 42(3):795-807.

Cavard, D, and C Lazdunski

1981 Involvement of BtuB and OmpF Proteins in Binding and Uptake of Colicin A. *FEMS Microbiology Letters* 12(4):311-316.

Cavard, D.

1997 Role of the colicin A lysis protein in the expression of the colicin A operon. *Microbiology* 143 ( Pt 7):2295-303.

—

2004 Role of Cal, the colicin A lysis protein, in two steps of colicin A release and in the interaction with colicin A-porin complexes. *Microbiology* 150(Pt 11):3867-75.

Cavard, D., D. Baty, S. P. Howard, H. M. Verheij, and C. Lazdunski

1987 Lipoprotein nature of the colicin A lysis protein: effect of amino acid substitutions at the site of modification and processing. *J Bacteriol* 169(5):2187-94.

Cavard, D., S. P. Howard, R. Llobes, and C. Lazdunski

1989 High-level expression of the colicin A lysis protein. *Mol Gen Genet* 217(2-3):511-9.

Cavard, D., and C. Lazdunski

1990 Colicin cleavage by OmpT protease during both entry into and release from *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* 172(2):648-52.

Chang, C., A. Mooser, A. Pluckthun, and A. Wlodawer

- 2001 Crystal structure of the dimeric C-terminal domain of TonB reveals a novel fold. *J Biol Chem* 276(29):27535-40.
- Cheng, Y. S., Z. Shi, L. G. Doudeva, W. Z. Yang, K. F. Chak, and H. S. Yuan
- 2006 High-resolution crystal structure of a truncated ColE7 translocation domain: implications for colicin transport across membranes. *J Mol Biol* 356(1):22-31.
- Chimento, D. P., A. K. Mohanty, R. J. Kadner, and M. C. Wiener
- 2003 Substrate-induced transmembrane signaling in the cobalamin transporter BtuB. *Nat Struct Biol* 10(5):394-401.
- Choe, S., M. J. Bennett, G. Fujii, P. M. Curmi, K. A. Kantardjieff, R. J. Collier, and D. Eisenberg
- 1992 The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature* 357(6375):216-22.
- Chun, S. Y., and J. S. Parkinson
- 1988 Bacterial motility: membrane topology of the Escherichia coli MotB protein. *Science* 239(4837):276-8.
- Clavel, T., P. Germon, A. Vianney, R. Portalier, and J. C. Lazzaroni
- 1998 TolB protein of Escherichia coli K-12 interacts with the outer membrane peptidoglycan-associated proteins Pal, Lpp and OmpA. *Mol Microbiol* 29(1):359-67.
- Clavel, T., J. C. Lazzaroni, A. Vianney, and R. Portalier
- 1996 Expression of the tolQRA genes of Escherichia coli K-12 is controlled by the RcsC sensor protein involved in capsule synthesis. *Mol Microbiol* 19(1):19-25.
- Cobessi, D., H. Celia, N. Folschweiller, I. J. Schalk, M. A. Abdallah, and F. Pattus
- 2005a The crystal structure of the pyoverdine outer membrane receptor FpvA from Pseudomonas aeruginosa at 3.6 angstroms resolution. *J Mol Biol* 347(1):121-34.
- Cobessi, D., H. Celia, and F. Pattus
- 2005b Crystal structure at high resolution of ferric-pyochelin and its membrane receptor FptA from Pseudomonas aeruginosa. *J Mol Biol* 352(4):893-904.
- Collinson, S. K., L. Emody, K. H. Muller, T. J. Trust, and W. W. Kay
- 1991 Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from Salmonella enteritidis. *J Bacteriol* 173(15):4773-81.
- Cornelis, P.
- 2010 Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl Microbiol Biotechnol* 86(6):1637-45.
- Cornelissen, C. N.
- 2003 Transferrin-iron uptake by Gram-negative bacteria. *Front Biosci* 8:d836-47.
- Cramer, W. A., F. S. Cohen, A. R. Merrill, and H. Y. Song

- 1990 Structure and dynamics of the colicin E1 channel. *Mol Microbiol* 4(4):519-26.
- Cramer, W. A., J. B. Heymann, S. L. Schendel, B. N. Deriy, F. S. Cohen, P. A. Elkins, and C. V. Stauffacher
- 1995 Structure-function of the channel-forming colicins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 24:611-41.
- Curran, A. R., and D. M. Engelman
- 2003 Sequence motifs, polar interactions and conformational changes in helical membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol* 13(4):412-7.
- Dalbey, R. E., M. O. Lively, S. Bron, and J. M. van Dijk
- 1997 The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. *Protein Sci* 6(6):1129-38.
- Davidson, V. L., W. A. Cramer, L. J. Bishop, and K. R. Brunden
- 1984 Dependence of the activity of colicin E1 in artificial membrane vesicles on pH, membrane potential, and vesicle size. *J Biol Chem* 259(1):594-600.
- De Graaf, F. K., and B. Oudega
- 1986 Production and release of cloacin DF13 and related colicins. *Curr Top Microbiol Immunol* 125:183-205.
- De Mot, R., and J. Vanderleyden
- 1994 The C-terminal sequence conservation between OmpA-related outer membrane proteins and MotB suggests a common function in both gram-positive and gram-negative bacteria, possibly in the interaction of these domains with peptidoglycan. *Mol Microbiol* 12(2):333-4.
- de Zamaroczy, M., L. Mora, A. Lecuyer, V. Geli, and R. H. Buckingham
- 2001 Cleavage of colicin D is necessary for cell killing and requires the inner membrane peptidase LepB. *Mol Cell* 8(1):159-68.
- Dean, G. E., R. M. Macnab, J. Stader, P. Matsumura, and C. Burks
- 1984 Gene sequence and predicted amino acid sequence of the motA protein, a membrane-associated protein required for flagellar rotation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 159(3):991-9.
- Delcour, A. H.
- 2009 Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta* 1794(5):808-16.
- Demchick, P, and AL Koch
- 1996 The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 178(3):768.
- Deprez, C., R. Llobes, M. Gavioli, D. Marion, F. Guerlesquin, and L. Blanchard

- 2005 Solution structure of the E.coli TolA C-terminal domain reveals conformational changes upon binding to the phage g3p N-terminal domain. *J Mol Biol* 346(4):1047-57.
- Derouiche, R, G Zeder-Lutz, H Benedetti, M Gavioli, A Rigal, C Lazdunski, and R LloubeAs
- 1997 Binding of colicins A and E1 to purified TolA domains. *Microbiology* 143(10):3185.
- Derouiche, R., H. Benedetti, J. C. Lazzaroni, C. Lazdunski, and R. Llobes
- 1995 Protein complex within Escherichia coli inner membrane. TolA N-terminal domain interacts with TolQ and TolR proteins. *J Biol Chem* 270(19):11078-84.
- Derouiche, R., R. Llobes, S. Sasso, H. Bouteille, R. Oughideni, C. Lazdunski, and E. Loret
- 1999 Circular dichroism and molecular modeling of the E. coli TolA periplasmic domains. *Biospectroscopy* 5(3):189-98.
- Devanathan, S., and K. Postle
- 2007 Studies on colicin B translocation: FepA is gated by TonB. *Mol Microbiol* 65(2):441-53.
- Dijkstra, AJ, and W Keck
- 1996 Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. *Journal of bacteriology* 178(19):5555-5562.
- Doerrler, W. T., and C. R. Raetz
- 2005 Loss of outer membrane proteins without inhibition of lipid export in an Escherichia coli YaeT mutant. *J Biol Chem* 280(30):27679-87.
- Dorward, D. W., and C. F. Garon
- 1989 DNA-binding proteins in cells and membrane blebs of Neisseria gonorrhoeae. *J Bacteriol* 171(8):4196-201.
- Driessen, A. J., and N. Nouwen
- 2008 Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem* 77:643-67.
- Duan, K., E. R. Lafontaine, S. Majumdar, and P. A. Sokol
- 2000 RegA, iron, and growth phase regulate expression of the Pseudomonas aeruginosa tol-oprL gene cluster. *J Bacteriol* 182(8):2077-87.
- Dubuisson, J. F., A. Vianney, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, and J. C. Lazzaroni
- 2005 Tol-Pal proteins are critical cell envelope components of Erwinia chrysanthemi affecting cell morphology and virulence. *Microbiology* 151(Pt 10):3337-47.
- Duche, D.
- 2007 Colicin E2 is still in contact with its receptor and import machinery when its nuclease domain enters the cytoplasm. *J Bacteriol* 189(11):4217-22.
- Duche, D., D. Baty, M. Chartier, and L. Letellier

- 1994a Unfolding of colicin A during its translocation through the Escherichia coli envelope as demonstrated by disulfide bond engineering. *J Biol Chem* 269(40):24820-5.
- Duche, D., A. Frenkian, V. Prima, and R. Llobes
- 2006 Release of immunity protein requires functional endonuclease colicin import machinery. *J Bacteriol* 188(24):8593-600.
- Duche, D., M. Issouf, and R. Llobes
- 2009 Immunity protein protects colicin E2 from OmpT protease. *J Biochem* 145(1):95-101.
- Duche, D., L. Letellier, V. Geli, H. Benedetti, and D. Baty
- 1995 Quantification of group A colicin import sites. *J Bacteriol* 177(17):4935-9.
- Duche, D., M. W. Parker, J. M. Gonzalez-Manas, F. Pattus, and D. Baty
- 1994b Uncoupled steps of the colicin A pore formation demonstrated by disulfide bond engineering. *J Biol Chem* 269(9):6332-9.
- Eick-Helmerich, K., and V. Braun
- 1989 Import of biopolymers into Escherichia coli: nucleotide sequences of the exbB and exbD genes are homologous to those of the tolQ and tolR genes, respectively. *J Bacteriol* 171(9):5117-26.
- El Ghachi, M., A. Bouhss, H. Barreteau, T. Touze, G. Auger, D. Blanot, and D. Mengin-Lecreulx
- 2006 Colicin M exerts its bacteriolytic effect via enzymatic degradation of undecaprenyl phosphate-linked peptidoglycan precursors. *J Biol Chem* 281(32):22761-72.
- el Kouhen, R., H. P. Fierobe, S. Scianimanico, M. Steiert, F. Pattus, and J. M. Pages
- 1993 Characterization of the receptor and translocator domains of colicin N. *Eur J Biochem* 214(3):635-9.
- Elston, T., H. Wang, and G. Oster
- 1998 Energy transduction in ATP synthase. *Nature* 391(6666):510-3.
- Engelman, D. M.
- 2005 Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 438(7068):578-80.
- Epand, R. F., J. C. Martinou, S. Montessuit, R. M. Epand, and C. M. Yip
- 2002 Direct evidence for membrane pore formation by the apoptotic protein Bax. *Biochem Biophys Res Commun* 298(5):744-9.
- Errington, J., R. A. Daniel, and D. J. Scheffers
- 2003 Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 67(1):52-65, table of contents.
- Espeset, D., Y. Corda, K. Cunningham, H. Benedetti, R. Llobes, C. Lazdunski, and V. Geli

- 1994a The colicin A pore-forming domain fused to mitochondrial intermembrane space sorting signals can be functionally inserted into the Escherichia coli plasma membrane by a mechanism that bypasses the Tol proteins. *Mol Microbiol* 13(6):1121-31.
- Espeset, D., D. Duche, D. Baty, and V. Geli
- 1996 The channel domain of colicin A is inhibited by its immunity protein through direct interaction in the Escherichia coli inner membrane. *EMBO J* 15(10):2356-64.
- Espeset, D., P. Piet, C. Lazdunski, and V. Geli
- 1994b Immunity proteins to pore-forming colicins: structure-function relationships. *Mol Microbiol* 13(6):1111-20.
- Evans, J. S., B. A. Levine, I. P. Trayer, C. J. Dorman, and C. F. Higgins
- 1986 Sequence-imposed structural constraints in the TonB protein of E. coli. *FEBS Lett* 208(2):211-6.
- Evans, L. J., M. L. Goble, K. A. Hales, and J. H. Lakey
- 1996 Different sensitivities to acid denaturation within a family of proteins: implications for acid unfolding and membrane translocation. *Biochemistry* 35(40):13180-5.
- Falnes, P. O., and K. Sandvig
- 2000 Penetration of protein toxins into cells. *Curr Opin Cell Biol* 12(4):407-13.
- Faraldo-Gomez, J. D., G. R. Smith, and M. S. Sansom
- 2003 Molecular dynamics simulations of the bacterial outer membrane protein FhuA: a comparative study of the ferrichrome-free and bound states. *Biophys J* 85(3):1406-20.
- Farkas-Himsley, H., and R. Cheung
- 1976 Bacterial proteinaceous products (bacteriocins) as cytotoxic agents of neoplasia. *Cancer Res* 36(10):3561-7.
- Faure, M., J. Bourguignon, M. Neuburger, D. MacHerel, L. Sieker, R. Ober, R. Kahn, C. Cohen-Addad, and R. Douce
- 2000 Interaction between the lipoamide-containing H-protein and the lipoamide dehydrogenase (L-protein) of the glycine decarboxylase multienzyme system 2. Crystal structures of H- and L-proteins. *Eur J Biochem* 267(10):2890-8.
- Ferguson, A. D., R. Chakraborty, B. S. Smith, L. Esser, D. van der Helm, and J. Deisenhofer
- 2002 Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. *Science* 295(5560):1715-9.
- Ferguson, A. D., E. Hofmann, J. W. Coulton, K. Diederichs, and W. Welte
- 1998 Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* 282(5397):2215-20.
- Fischer, E., K. Gunter, and V. Braun

- 1989 Involvement of ExbB and TonB in transport across the outer membrane of *Escherichia coli*: phenotypic complementation of *exb* mutants by overexpressed *tonB* and physical stabilization of TonB by ExbB. *J Bacteriol* 171(9):5127-34.
- Foster, D. L., M. Boublik, and H. R. Kaback
- 1983 Structure of the *lac* carrier protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 258(1):31-4.
- Frillingos, S., M. Sahin-Toth, J. Wu, and H. R. Kaback
- 1998 Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure function relationships in polytopic membrane proteins. *FASEB J* 12(13):1281-99.
- Fukuda, A., S. Matsuyama, T. Hara, J. Nakayama, H. Nagasawa, and H. Tokuda
- 2002 Aminoacylation of the N-terminal cysteine is essential for Lol-dependent release of lipoproteins from membranes but does not depend on lipoprotein sorting signals. *J Biol Chem* 277(45):43512-8.
- Fülöp, V, and DT Jones
- 1999 [beta] Propellers: structural rigidity and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology* 9(6):715-721.
- Garcia-Herrero, A., R. S. Peacock, S. P. Howard, and H. J. Vogel
- 2007 The solution structure of the periplasmic domain of the TonB system ExbD protein reveals an unexpected structural homology with siderophore-binding proteins. *Mol Microbiol* 66(4):872-89.
- Garon, C. F., D. W. Dorward, and M. D. Corwin
- 1989 Structural features of *Borrelia burgdorferi*--the Lyme disease spirochete: silver staining for nucleic acids. *Scanning Microsc Suppl* 3:109-15.
- Garza, A. G., R. Biran, J. A. Wohlschlegel, and M. D. Manson
- 1996a Mutations in *motB* suppressible by changes in stator or rotor components of the bacterial flagellar motor. *J Mol Biol* 258(2):270-85.
- Garza, A. G., P. A. Bronstein, P. A. Valdez, L. W. Harris-Haller, and M. D. Manson
- 1996b Extragenic suppression of *motA* missense mutations of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178(21):6116-22.
- Garza, A. G., L. W. Harris-Haller, R. A. Stoebner, and M. D. Manson
- 1995 Motility protein interactions in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(6):1970-4.
- Gaspar, J. A., J. A. Thomas, C. L. Marolda, and M. A. Valvano
- 2000 Surface expression of O-specific lipopolysaccharide in *Escherichia coli* requires the function of the TolA protein. *Mol Microbiol* 38(2):262-75.
- Geli, V., D. Baty, and C. Lazdunski

- 1988 Use of a foreign epitope as a "tag" for the localization of minor proteins within a cell: the case of the immunity protein to colicin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(3):689-93.
- Geli, V., D. Baty, F. Pattus, and C. Lazdunski
- 1989a Topology and function of the integral membrane protein conferring immunity to colicin A. *Mol Microbiol* 3(5):679-87.
- Geli, V., M. Knibiehler, A. Bernadac, and C. Lazdunski
- 1989b Purification and reconstitution into liposomes of an integral membrane protein conferring immunity to colicin A. *FEMS Microbiol Lett* 51(1):239-43.
- Geli, V., and C. Lazdunski
- 1992 An alpha-helical hydrophobic hairpin as a specific determinant in protein-protein interaction occurring in *Escherichia coli* colicin A and B immunity systems. *J Bacteriol* 174(20):6432-7.
- Geli, V., R. Llobes, S. A. Zaat, R. M. van Spaendonk, C. Rollin, H. Benedetti, and C. Lazdunski
- 1993 Recognition of the colicin A N-terminal epitope 1C11 in vitro and in vivo in *Escherichia coli* by its cognate monoclonal antibody. *FEMS Microbiol Lett* 109(2-3):335-42.
- Gerding, M. A., Y. Ogata, N. D. Pecora, H. Niki, and P. A. de Boer
- 2007 The trans-envelope Tol-Pal complex is part of the cell division machinery and required for proper outer-membrane invagination during cell constriction in *E. coli*. *Mol Microbiol* 63(4):1008-25.
- Gerlach, R. G., and M. Hensel
- 2007 Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol* 297(6):401-15.
- Germon, P., T. Clavel, A. Vianney, R. Portalier, and J. C. Lazzaroni
- 1998 Mutational analysis of the *Escherichia coli* K-12 TolA N-terminal region and characterization of its TolQ-interacting domain by genetic suppression. *J Bacteriol* 180(24):6433-9.
- Germon, P., M. C. Ray, A. Vianney, and J. C. Lazzaroni
- 2001 Energy-dependent conformational change in the TolA protein of *Escherichia coli* involves its N-terminal domain, TolQ, and TolR. *J Bacteriol* 183(14):4110-4.
- Glansdorff, N., Y. Xu, and B. Labedan
- 2008 The last universal common ancestor: emergence, constitution and genetic legacy of an elusive forerunner. *Biol Direct* 3:29.
- Goehring, N. W., and J. Beckwith
- 2005 Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr Biol* 15(13):R514-26.
- Goemaere, E. L., E. Cascales, and R. Llobes

- 2007a Mutational analyses define helix organization and key residues of a bacterial membrane energy-transducing complex. *J Mol Biol* 366(5):1424-36.
- Goemaere, E. L., A. Devert, R. Llobes, and E. Cascales
- 2007b Movements of the TolR C-terminal domain depend on TolQR ionizable key residues and regulate activity of the Tol complex. *J Biol Chem* 282(24):17749-57.
- Gokce, I., E. M. Raggett, Q. Hong, R. Virden, A. Cooper, and J. H. Lakey
- 2000 The TolA-recognition site of colicin N. ITC, SPR and stopped-flow fluorescence define a crucial 27-residue segment. *J Mol Biol* 304(4):621-32.
- Gordon, M., and A. Finkelstein
- 2001 The number of subunits comprising the channel formed by the T domain of diphtheria toxin. *J Gen Physiol* 118(5):471-80.
- Graille, M., L. Mora, R. H. Buckingham, H. van Tilbeurgh, and M. de Zamaroczy
- 2004 Structural inhibition of the colicin D tRNase by the tRNA-mimicking immunity protein. *EMBO J* 23(7):1474-82.
- Greig, S. L., M. Radjainia, and A. K. Mitra
- 2009 Oligomeric structure of colicin ia channel in lipid bilayer membranes. *J Biol Chem* 284(24):16126-34.
- Grizot, S., and S. K. Buchanan
- 2004 Structure of the OmpA-like domain of RmpM from *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 51(4):1027-37.
- Guidotti, G.
- 1972 Membrane proteins. *Annu Rev Biochem* 41:731-52.
- Guihard, G., P. Boulanger, H. Benedetti, R. Llobes, M. Besnard, and L. Letellier
- 1994 Colicin A and the Tol proteins involved in its translocation are preferentially located in the contact sites between the inner and outer membranes of *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* 269(8):5874-80.
- Hannavy, K., G. C. Barr, C. J. Dorman, J. Adamson, L. R. Mazengera, M. P. Gallagher, J. S. Evans, B. A. Levine, I. P. Trayer, and C. F. Higgins
- 1990 TonB protein of *Salmonella typhimurium*. A model for signal transduction between membranes. *J Mol Biol* 216(4):897-910.
- Harkness, R. E., and V. Braun
- 1989 Colicin M inhibits peptidoglycan biosynthesis by interfering with lipid carrier recycling. *J Biol Chem* 264(11):6177-82.
- Heilpern, A. J., and M. K. Waldor

- 2000 CTXphi infection of *Vibrio cholerae* requires the tolQRA gene products. *J Bacteriol* 182(6):1739-47.
- Heller, K. J., R. J. Kadner, and K. Gunther
- 1988 Suppression of the *btuB451* mutation by mutations in the *tonB* gene suggests a direct interaction between TonB and TonB-dependent receptor proteins in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Gene* 64(1):147-53.
- Higgins, C. F.
- 1992 ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8:67-113.
- Higgs, P. I., R. A. Larsen, and K. Postle
- 2002a Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA. *Mol Microbiol* 44(1):271-81.
- Higgs, P. I., T. E. Letain, K. K. Merriam, N. S. Burke, H. Park, C. Kang, and K. Postle
- 2002b TonB interacts with nonreceptor proteins in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184(6):1640-8.
- Higgs, P. I., P. S. Myers, and K. Postle
- 1998 Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD form homomultimers. *J Bacteriol* 180(22):6031-8.
- Hilsenbeck, J. L., H. Park, G. Chen, B. Youn, K. Postle, and C. Kang
- 2004 Crystal structure of the cytotoxic bacterial protein colicin B at 2.5 Å resolution. *Mol Microbiol* 51(3):711-20.
- Hizukuri, Y, S Kojima, and M Homma
- 2010 Disulfide cross-linking between the stator and the bearing components in the bacterial flagellar motor. *Journal of Biochemistry*.
- Hizukuri, Y., J. F. Morton, T. Yakushi, S. Kojima, and M. Homma
- 2009 The peptidoglycan-binding (PGB) domain of the *Escherichia coli* pal protein can also function as the PGB domain in *E. coli* flagellar motor protein MotB. *J Biochem* 146(2):219-29.
- Hobot, J. A., E. Carlemalm, W. Villiger, and E. Kellenberger
- 1984 Periplasmic gel: new concept resulting from the reinvestigation of bacterial cell envelope ultrastructure by new methods. *J Bacteriol* 160(1):143-52.
- Hosking, E. R., and M. D. Manson
- 2008 Clusters of charged residues at the C terminus of MotA and N terminus of MotB are important for function of the *Escherichia coli* flagellar motor. *J Bacteriol* 190(15):5517-21.
- Hosking, E. R., C. Vogt, E. P. Bakker, and M. D. Manson
- 2006 The *Escherichia coli* MotAB proton channel unplugged. *J Mol Biol* 364(5):921-37.

Housden, N. G., S. R. Loftus, G. R. Moore, R. James, and C. Kleanthous

2005 Cell entry mechanism of enzymatic bacterial colicins: porin recruitment and the thermodynamics of receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(39):13849-54.

Huber, D., D. Boyd, Y. Xia, M. H. Olma, M. Gerstein, and J. Beckwith

2005 Use of thioredoxin as a reporter to identify a subset of *Escherichia coli* signal sequences that promote signal recognition particle-dependent translocation. *J Bacteriol* 187(9):2983-91.

Isnard, M., A. Rigal, J. C. Lazzaroni, C. Lazdunski, and R. Lloubes

1994 Maturation and localization of the TolB protein required for colicin import. *J Bacteriol* 176(20):6392-6.

Ito, K., and Y. Akiyama

2005 Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu Rev Microbiol* 59:211-31.

Jakes, K. S., and A. Finkelstein

2010 The colicin Ia receptor, Cir, is also the translocator for colicin Ia. *Mol Microbiol* 75(3):567-78.

Jakes, K. S., P. K. Kienker, S. L. Slatin, and A. Finkelstein

1998 Translocation of inserted foreign epitopes by a channel-forming protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(8):4321-6.

James, R., C. Kleanthous, and G. R. Moore

1996 The biology of *E. coli* colicins: paradigms and paradoxes. *Microbiology* 142 ( Pt 7):1569-80.

Jaques, S., Y. K. Kim, and L. L. McCarter

1999 Mutations conferring resistance to phenamil and amiloride, inhibitors of sodium-driven motility of *Vibrio parahaemolyticus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10):5740-5.

Jaskula, J. C., T. E. Letain, S. K. Roof, J. T. Skare, and K. Postle

1994 Role of the TonB amino terminus in energy transduction between membranes. *J Bacteriol* 176(8):2326-38.

Jeon, H., W. Meng, J. Takagi, M. J. Eck, T. A. Springer, and S. C. Blacklow

2001 Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair. *Nat Struct Biol* 8(6):499-504.

Jones, P. C., W. Jiang, and R. H. Fillingame

1998 Arrangement of the multicopy H<sup>+</sup>-translocating subunit c in the membrane sector of the *Escherichia coli* F1F0 ATP synthase. *J Biol Chem* 273(27):17178-85.

Journet, L., E. Bouveret, A. Rigal, R. Lloubes, C. Lazdunski, and H. Benedetti

- 2001 Import of colicins across the outer membrane of *Escherichia coli* involves multiple protein interactions in the periplasm. *Mol Microbiol* 42(2):331-44.
- Journet, L., A. Rigal, C. Lazdunski, and H. Benedetti
- 1999 Role of TolR N-terminal, central, and C-terminal domains in dimerization and interaction with TolA and tolQ. *J Bacteriol* 181(15):4476-84.
- Kaback, H. R.
- 1992 The lactose permease of *Escherichia coli*: a paradigm for membrane transport proteins. *Biochim Biophys Acta* 1101(2):210-3.
- 
- 2005 Structure and mechanism of the lactose permease. *C R Biol* 328(6):557-67.
- Kaback, H. R., M. Sahin-Toth, and A. B. Weinglass
- 2001 The kamikaze approach to membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(8):610-20.
- Kadner, RJ
- 1996 Cytoplasmic membrane. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology* 1:58-87.
- Kampfenkel, K., and V. Braun
- 1992 Membrane topology of the *Escherichia coli* ExbD protein. *J Bacteriol* 174(16):5485-7.
- 
- 1993 Topology of the ExbB protein in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 268(8):6050-7.
- Karlsson, M., K. Hannavy, and C. F. Higgins
- 1993a ExbB acts as a chaperone-like protein to stabilize TonB in the cytoplasm. *Mol Microbiol* 8(2):389-96.
- 
- 1993b A sequence-specific function for the N-terminal signal-like sequence of the TonB protein. *Mol Microbiol* 8(2):379-88.
- Kaserer, W. A., X. Jiang, Q. Xiao, D. C. Scott, M. Bauler, D. Copeland, S. M. Newton, and P. E. Klebba
- 2008 Insight from TonB hybrid proteins into the mechanism of iron transport through the outer membrane. *J Bacteriol* 190(11):4001-16.
- Keller, K. L., K. K. Brinkman, and R. A. Larsen
- 2007 TonB/TolA amino-terminal domain modeling. *Methods Enzymol* 423:134-48.
- Khursigara, C. M., G. De Crescenzo, P. D. Pawelek, and J. W. Coulton

2004 Enhanced binding of TonB to a ligand-loaded outer membrane receptor: role of the oligomeric state of TonB in formation of a functional FhuA.TonB complex. *J Biol Chem* 279(9):7405-12.

—

2005 Deletion of the proline-rich region of TonB disrupts formation of a 2:1 complex with FhuA, an outer membrane receptor of *Escherichia coli*. *Protein Sci* 14(5):1266-73.

Kienker, P, SL Slatin, and A Finkelstein

2002 Colicin channels have a shockingly high proton permeability. *Biophys. J* 82(1 Part 2):555a.

Kienker, P. K., K. S. Jakes, R. O. Blaustein, C. Miller, and A. Finkelstein

2003 Sizing the protein translocation pathway of colicin Ia channels. *J Gen Physiol* 122(2):161-76.

Kienker, P. K., K. S. Jakes, and A. Finkelstein

2000 Protein translocation across planar bilayers by the colicin Ia channel-forming domain: where will it end? *J Gen Physiol* 116(4):587-98.

—

2008 Identification of channel-lining amino acid residues in the hydrophobic segment of colicin Ia. *J Gen Physiol* 132(6):693-707.

Kim, E. A., M. Price-Carter, W. C. Carlquist, and D. F. Blair

2008 Membrane segment organization in the stator complex of the flagellar motor: implications for proton flow and proton-induced conformational change. *Biochemistry* 47(43):11332-9.

Kleanthous, C, and D Walker

2001 Immunity proteins: enzyme inhibitors that avoid the active site. *Trends in Biochemical Sciences* 26(10):624-631.

Klebba, P. E.

2003 Three paradoxes of ferric enterobactin uptake. *Front Biosci* 8:s1422-36.

Klebba, PE

2002 Mechanism of maltodextrin transport through LamB. *Research in microbiology* 153(7):417-424.

Knowles, T. J., A. Scott-Tucker, M. Overduin, and I. R. Henderson

2009 Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. *Nat Rev Microbiol* 7(3):206-14.

Kodding, J., F. Killig, P. Polzer, S. P. Howard, K. Diederichs, and W. Welte

- 2005 Crystal structure of a 92-residue C-terminal fragment of TonB from *Escherichia coli* reveals significant conformational changes compared to structures of smaller TonB fragments. *J Biol Chem* 280(4):3022-8.
- Koebnik, R.
- 1993 The molecular interaction between components of the TonB-ExbBD-dependent and of the TolQRA-dependent bacterial uptake systems. *Mol Microbiol* 9(1):219.
- Koedding, J, P Howard, L Kaufmann, P Polzer, A Lustig, and W Welte
- 2004 Dimerization of TonB is not essential for its binding to the outer membrane siderophore receptor FhuA of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 279(11):9978.
- Kojima, S., and D. F. Blair
- 2001 Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor. *Biochemistry* 40(43):13041-50.
- 
- 2004a The bacterial flagellar motor: structure and function of a complex molecular machine. *Int Rev Cytol* 233:93-134.
- 
- 2004b Solubilization and purification of the MotA/MotB complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 43(1):26-34.
- Kojima, S., Y. Furukawa, H. Matsunami, T. Minamino, and K. Namba
- 2008a Characterization of the periplasmic domain of MotB and implications for its role in the stator assembly of the bacterial flagellar motor. *J Bacteriol* 190(9):3314-22.
- Kojima, S., K. Imada, M. Sakuma, Y. Sudo, C. Kojima, T. Minamino, M. Homma, and K. Namba
- 2009 Stator assembly and activation mechanism of the flagellar motor by the periplasmic region of MotB. *Mol Microbiol* 73(4):710-8.
- Kojima, S., M. Kuroda, I. Kawagishi, and M. Homma
- 1999 Random mutagenesis of the pomA gene encoding a putative channel component of the Na(+)-driven polar flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*. *Microbiology* 145 ( Pt 7):1759-67.
- Kojima, S., A. Shinohara, H. Terashima, T. Yakushi, M. Sakuma, M. Homma, K. Namba, and K. Imada
- 2008b Insights into the stator assembly of the *Vibrio* flagellar motor from the crystal structure of MotY. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(22):7696-701.
- Kojima, S., T. Shoji, Y. Asai, I. Kawagishi, and M. Homma
- 2000 A slow-motility phenotype caused by substitutions at residue Asp31 in the PomA channel component of a sodium-driven flagellar motor. *J Bacteriol* 182(11):3314-8.
- Konisky, J.

- 1982 Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annu Rev Microbiol* 36:125-44.
- Konisky, J., and B. S. Cowell
- 1972 Interaction of colicin Ia with bacterial cells. Direct measurement of Ia-receptor interaction. *J Biol Chem* 247(20):6524-9.
- Koraimann, G
- 2003 Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cellular and molecular life sciences* 60(11):2371-2388.
- Krachler, A. M., A. Sharma, A. Cauldwell, G. Papadakos, and C. Kleanthous
- 2010a TolA Modulates the Oligomeric Status of YbgF in the Bacterial Periplasm. *J Mol Biol.*
- Krachler, A. M., A. Sharma, and C. Kleanthous
- 2010b Self-association of TPR domains: Lessons learned from a designed, consensus-based TPR oligomer. *Proteins* 78(9):2131-43.
- Krasilnikov, O. V., J. B. Da Cruz, L. N. Yuldasheva, W. A. Varanda, and R. A. Nogueira
- 1998 A novel approach to study the geometry of the water lumen of ion channels: colicin Ia channels in planar lipid bilayers. *J Membr Biol* 161(1):83-92.
- Krone, W. J., P. de Vries, G. Koningstein, A. J. de Jonge, F. K. de Graaf, and B. Oudega
- 1986 Uptake of cloacin DF13 by susceptible cells: removal of immunity protein and fragmentation of cloacin molecules. *J Bacteriol* 166(1):260-8.
- Kuhn, A.
- 2009 From the Sec complex to the membrane insertase YidC. *Biol Chem* 390(8):701-6.
- Kurusu, G., S. D. Zakharov, M. V. Zhalnina, S. Bano, V. Y. Eroukova, T. I. Rokitskaya, Y. N. Antonenko, M. C. Wiener, and W. A. Cramer
- 2003 The structure of BtuB with bound colicin E3 R-domain implies a translocon. *Nat Struct Biol* 10(11):948-54.
- Lafontaine, E. R., and P. A. Sokol
- 1998 Effects of iron and temperature on expression of the *Pseudomonas aeruginosa* tolQRA genes: role of the ferric uptake regulator. *J Bacteriol* 180(11):2836-41.
- Lakey, J. H., D. Baty, and F. Pattus
- 1991 Fluorescence energy transfer distance measurements using site-directed single cysteine mutants. The membrane insertion of colicin A. *J Mol Biol* 218(3):639-53.
- Lakey, J. H., D. Duche, J. M. Gonzalez-Manas, D. Baty, and F. Pattus
- 1993 Fluorescence energy transfer distance measurements. The hydrophobic helical hairpin of colicin A in the membrane bound state. *J Mol Biol* 230(3):1055-67.

Lakey, J. H., and S. L. Slatin

2001 Pore-forming colicins and their relatives. *Curr Top Microbiol Immunol* 257:131-61.

Larsen, R. A., G. E. Deckert, K. A. Kastead, S. Devanathan, K. L. Keller, and K. Postle

2007 His(20) provides the sole functionally significant side chain in the essential TonB transmembrane domain. *J Bacteriol* 189(7):2825-33.

Larsen, R. A., D. Foster-Hartnett, M. A. McIntosh, and K. Postle

1997 Regions of *Escherichia coli* TonB and FepA proteins essential for in vivo physical interactions. *J Bacteriol* 179(10):3213-21.

Larsen, R. A., T. E. Letain, and K. Postle

2003 In vivo evidence of TonB shuttling between the cytoplasmic and outer membrane in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 49(1):211-8.

Larsen, R. A., P. S. Myers, J. T. Skare, C. L. Seachord, R. P. Darveau, and K. Postle

1996 Identification of TonB homologs in the family Enterobacteriaceae and evidence for conservation of TonB-dependent energy transduction complexes. *J Bacteriol* 178(5):1363-73.

Larsen, R. A., and K. Postle

2001 Conserved residues Ser(16) and His(20) and their relative positioning are essential for TonB activity, cross-linking of TonB with ExbB, and the ability of TonB to respond to proton motive force. *J Biol Chem* 276(11):8111-7.

Larsen, R. A., M. G. Thomas, and K. Postle

1999 Protonmotive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB. *Mol Microbiol* 31(6):1809-24.

Larsen, R. A., M. G. Thomas, G. E. Wood, and K. Postle

1994 Partial suppression of an *Escherichia coli* TonB transmembrane domain mutation ( $\Delta$ V17) by a missense mutation in ExbB. *Mol Microbiol* 13(4):627-40.

Larsen, R. A., G. E. Wood, and K. Postle

1993 The conserved proline-rich motif is not essential for energy transduction by *Escherichia coli* TonB protein. *Mol Microbiol* 10(5):943-53.

Lazzaroni, J. C., and R. C. Portalier

1981 Genetic and biochemical characterization of periplasmic-leaky mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 145(3):1351-8.

Lazzaroni, J. C., A. Vianney, J. L. Popot, H. Benedetti, F. Samatey, C. Lazdunski, R. Portalier, and V. Geli

1995 Transmembrane alpha-helix interactions are required for the functional assembly of the *Escherichia coli* Tol complex. *J Mol Biol* 246(1):1-7.

Le Calvez, H., J. Fieschi, J. M. Green, N. Marchesi, J. Chauveau, and D. Baty

- 1995 Paratope characterization by structural modelling of two anti-cortisol single-chain variable fragments produced in *E. coli*. *Mol Immunol* 32(3):185-98.
- Leake, M. C., J. H. Chandler, G. H. Wadhams, F. Bai, R. M. Berry, and J. P. Armitage
- 2006 Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes. *Nature* 443(7109):355-8.
- Letain, T. E., and K. Postle
- 1997 TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 24(2):271-83.
- Levengood, S. K., W. F. Beyer, Jr., and R. E. Webster
- 1991 TolA: a membrane protein involved in colicin uptake contains an extended helical region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(14):5939-43.
- Levengood, S. K., and R. E. Webster
- 1989 Nucleotide sequences of the *tolA* and *tolB* genes and localization of their products, components of a multistep translocation system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171(12):6600-9.
- Lewin, T. M., and R. E. Webster
- 1996 Membrane insertion characteristics of the various transmembrane domains of the *Escherichia coli* TolQ protein. *J Biol Chem* 271(24):14143-9.
- Lin, J. H., and A. Baumgaertner
- 2000 Stability of a melittin pore in a lipid bilayer: a molecular dynamics study. *Biophys J* 78(4):1714-24.
- Lindeberg, M., and W. A. Cramer
- 2001 Identification of specific residues in colicin E1 involved in immunity protein recognition. *J Bacteriol* 183(6):2132-6.
- Lindeberg, M., S. D. Zakharov, and W. A. Cramer
- 2000 Unfolding pathway of the colicin E1 channel protein on a membrane surface. *J Mol Biol* 295(3):679-92.
- Llamas, M. A., J. L. Ramos, and J. J. Rodriguez-Herva
- 2000 Mutations in each of the *tol* genes of *Pseudomonas putida* reveal that they are critical for maintenance of outer membrane stability. *J Bacteriol* 182(17):4764-72.
- Llamas, M. A., J. J. Rodriguez-Herva, R. E. Hancock, W. Bitter, J. Tommassen, and J. L. Ramos
- 2003 Role of *Pseudomonas putida* *tol-oprL* gene products in uptake of solutes through the cytoplasmic membrane. *J Bacteriol* 185(16):4707-16.
- Llobes, R. P., M. J. Chartier, A. M. Jounet, S. G. Varenne, and C. J. Lazdunski

- 1984 Nucleotide sequence of the gene for the immunity protein to colicin A. Analysis of codon usage of immunity proteins as compared to colicins. *Eur J Biochem* 144(1):73-8.
- Locher, K. P., A. T. Lee, and D. C. Rees
- 2002 The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 296(5570):1091-8.
- Locher, K. P., B. Rees, R. Koebnik, A. Mitschler, L. Moulinier, J. P. Rosenbusch, and D. Moras
- 1998 Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell* 95(6):771-8.
- Loftus, S. R., D. Walker, M. J. Mate, D. A. Bonsor, R. James, G. R. Moore, and C. Kleanthous
- 2006 Competitive recruitment of the periplasmic translocation portal TolB by a natively disordered domain of colicin E9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(33):12353-8.
- Lohmiller, S., K. Hantke, S. I. Patzer, and V. Braun
- 2008 TonB-dependent maltose transport by *Caulobacter crescentus*. *Microbiology* 154(Pt 6):1748-54.
- Lubkowski, J., F. Hennecke, A. Pluckthun, and A. Wlodawer
- 1999 Filamentous phage infection: crystal structure of g3p in complex with its coreceptor, the C-terminal domain of TolA. *Structure* 7(6):711-22.
- Luna-Chavez, C., Y. L. Lin, and R. H. Huang
- 2006 Molecular basis of inhibition of the ribonuclease activity in colicin E5 by its cognate immunity protein. *J Mol Biol* 358(2):571-9.
- Mankovich, J. A., P. H. Lai, N. Gokul, and J. Konisky
- 1984 Organization of the colicin Ib gene. Promoter structure and immunity domain. *J Biol Chem* 259(14):8764-8.
- Margolin, W.
- 2005 FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(11):862-71.
- Marianayagam, N. J., M. Sunde, and J. M. Matthews
- 2004 The power of two: protein dimerization in biology. *Trends Biochem Sci* 29(11):618-25.
- Masi, M., P. Vuong, M. Humbard, K. Malone, and R. Misra
- 2007 Initial steps of colicin E1 import across the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189(7):2667-76.
- Matsuzaki, K.
- 1998 Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 1376(3):391-400.

Matsuzaki, K., O. Murase, N. Fujii, and K. Miyajima

1996 An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry* 35(35):11361-8.

McCarter, L. L.

1994 MotY, a component of the sodium-type flagellar motor. *J Bacteriol* 176(14):4219-25.

Mende, J., and V. Braun

1990 Import-defective colicin B derivatives mutated in the TonB box. *Mol Microbiol* 4(9):1523-33.

Merino-Montero, S., O. Domenech, M. T. Montero, and J. Hernandez-Borrell

2006 Preliminary atomic force microscopy study of two-dimensional crystals of lactose permease from *Escherichia coli*. *Biophys Chem* 119(1):78-83.

Merrill, A. R., F. S. Cohen, and W. A. Cramer

1990 On the nature of the structural change of the colicin E1 channel peptide necessary for its translocation-competent state. *Biochemistry* 29(24):5829-36.

Meury, J., and G. Devilliers

1999 Impairment of cell division in *tolA* mutants of *Escherichia coli* at low and high medium osmolarities. *Biol Cell* 91(1):67-75.

Minamino, T., K. Imada, and K. Namba

2008 Molecular motors of the bacterial flagella. *Curr Opin Struct Biol* 18(6):693-701.

Moeck, G. S., J. W. Coulton, and K. Postle

1997 Cell envelope signaling in *Escherichia coli*. Ligand binding to the ferrichrome-iron receptor *fhuA* promotes interaction with the energy-transducing protein TonB. *J Biol Chem* 272(45):28391-7.

Moeck, G. S., and L. Letellier

2001 Characterization of in vitro interactions between a truncated TonB protein from *Escherichia coli* and the outer membrane receptors *FhuA* and *FepA*. *J Bacteriol* 183(9):2755-64.

Mogensen, J. E., and D. E. Otzen

2005 Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. *Mol Microbiol* 57(2):326-46.

Mora, L., N. Diaz, R. H. Buckingham, and M. de Zamaroczy

2005 Import of the transfer RNase colicin D requires site-specific interaction with the energy-transducing protein TonB. *J Bacteriol* 187(8):2693-7.

Morimoto, Y. V., Y. S. Che, T. Minamino, and K. Namba

- 2010 Proton-conductivity assay of plugged and unplugged MotA/B proton channel by cytoplasmic pHluorin expressed in Salmonella. *FEBS Lett* 584(6):1268-72.
- Mosbahi, K., C. Lemaitre, A. H. Keeble, H. Mobasher, B. Morel, R. James, G. R. Moore, E. J. Lea, and C. Kleanthous
- 2002 The cytotoxic domain of colicin E9 is a channel-forming endonuclease. *Nat Struct Biol* 9(6):476-84.
- Mosbahi, K., D. Walker, R. James, G. R. Moore, and C. Kleanthous
- 2006 Global structural rearrangement of the cell penetrating ribonuclease colicin E3 on interaction with phospholipid membranes. *Protein Sci* 15(3):620-7.
- Mosbahi, K., D. Walker, E. Lea, G. R. Moore, R. James, and C. Kleanthous
- 2004 Destabilization of the colicin E9 Endonuclease domain by interaction with negatively charged phospholipids: implications for colicin translocation into bacteria. *J Biol Chem* 279(21):22145-51.
- Mougous, J. D., M. E. Cuff, S. Raunser, A. Shen, M. Zhou, C. A. Gifford, A. L. Goodman, G. Joachimiak, C. L. Ordonez, S. Lory, T. Walz, A. Joachimiak, and J. J. Mekalanos
- 2006 A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* 312(5779):1526-30.
- Mulkidjanian, A. Y., P. Dibrov, and M. Y. Galperin
- 2008a The past and present of sodium energetics: may the sodium-motive force be with you. *Biochim Biophys Acta* 1777(7-8):985-92.
- Mulkidjanian, A. Y., M. Y. Galperin, K. S. Makarova, Y. I. Wolf, and E. V. Koonin
- 2008b Evolutionary primacy of sodium bioenergetics. *Biol Direct* 3:13.
- Muller, M. M., A. Vianney, J. C. Lazzaroni, R. E. Webster, and R. Portalier
- 1993 Membrane topology of the *Escherichia coli* TolR protein required for cell envelope integrity. *J Bacteriol* 175(18):6059-61.
- Muramoto, K., and R. M. Macnab
- 1998 Deletion analysis of MotA and MotB, components of the force-generating unit in the flagellar motor of Salmonella. *Mol Microbiol* 29(5):1191-202.
- Nakamura, S., Y. V. Morimoto, N. Kami-ike, T. Minamino, and K. Namba
- 2009 Role of a conserved prolyl residue (Pro173) of MotA in the mechanochemical reaction cycle of the proton-driven flagellar motor of Salmonella. *J Mol Biol* 393(2):300-7.
- Nardi, A., Y. Corda, D. Baty, and D. Duche
- 2001a Colicin A immunity protein interacts with the hydrophobic helical hairpin of the colicin A channel domain in the *Escherichia coli* inner membrane. *J Bacteriol* 183(22):6721-5.
- Nardi, A., S. L. Slatin, D. Baty, and D. Duche

- 2001b The C-terminal half of the colicin A pore-forming domain is active in vivo and in vitro. *J Mol Biol* 307(5):1293-303.
- Neidhardt, FC, and HE Umbarger
- 1996 *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. Washington DC.
- Newman, M. J., D. L. Foster, T. H. Wilson, and H. R. Kaback
- 1981 Purification and reconstitution of functional lactose carrier from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 256(22):11804-8.
- Nguyen, C. C., and M. H. Saier, Jr.
- 1996 Structural and phylogenetic analysis of the MotA and MotB families of bacterial flagellar motor proteins. *Res Microbiol* 147(5):317-32.
- Nicolaisen, K., A. Hahn, M. Valdebenito, S. Moslavac, A. Samborski, I. Maldener, C. Wilken, A. Valladares, E. Flores, K. Hantke, and E. Schleiff
- 2010 The interplay between siderophore secretion and coupled iron and copper transport in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. *Biochim Biophys Acta*.
- Nie, Y., N. Ermolova, and H. R. Kaback
- 2007 Site-directed alkylation of LacY: effect of the proton electrochemical gradient. *J Mol Biol* 374(2):356-64.
- Nikaido, H.
- 2003 Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67(4):593-656.
- Nikaido, H., and E. Y. Rosenberg
- 1990 Cir and Fiu proteins in the outer membrane of *Escherichia coli* catalyze transport of monomeric catechols: study with beta-lactam antibiotics containing catechol and analogous groups. *J Bacteriol* 172(3):1361-7.
- Noinaj, N., M. Guillier, T. J. Barnard, and S. K. Buchanan
- 2010 TonB-Dependent Transporters: Regulation, Structure, and Function. *Annu Rev Microbiol*.
- Ogierman, M., and V. Braun
- 2003 Interactions between the outer membrane ferric citrate transporter FecA and TonB: studies of the FecA TonB box. *J Bacteriol* 185(6):1870-85.
- Ogle, J. M., A. P. Carter, and V. Ramakrishnan
- 2003 Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends Biochem Sci* 28(5):259-66.
- Ogura, T., K. Inoue, T. Tatsuta, T. Suzaki, K. Karata, K. Young, L. H. Su, C. A. Fierke, J. E. Jackman, C. R. Raetz, J. Coleman, T. Tomoyasu, and H. Matsuzawa

- 1999 Balanced biosynthesis of major membrane components through regulated degradation of the committed enzyme of lipid A biosynthesis by the AAA protease FtsH (HflB) in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 31(3):833-44.
- Oh, D. M., and G. L. Amidon
- 1999 Overview of membrane transport. *Pharm Biotechnol* 12:1-27.
- Okabe, M., T. Yakushi, and M. Homma
- 2005 Interactions of MotX with MotY and with the PomA/PomB sodium ion channel complex of the *Vibrio alginolyticus* polar flagellum. *J Biol Chem* 280(27):25659-64.
- Okuno, T., T. Yamada-Inagawa, K. Karata, K. Yamanaka, and T. Ogura
- 2004 Spectrometric analysis of degradation of a physiological substrate sigma32 by *Escherichia coli* AAA protease FtsH. *J Struct Biol* 146(1-2):148-54.
- Ollis, A. A., M. Manning, K. G. Held, and K. Postle
- 2009 Cytoplasmic membrane protonmotive force energizes periplasmic interactions between ExbD and TonB. *Mol Microbiol* 73(3):466-81.
- Oudega, B., O. Mol, P. van Ulsen, F. Stegehuis, F. J. van der Wal, and J. Luirink
- 1993 *Escherichia coli* SecB, SecA, and SecY proteins are required for expression and membrane insertion of the bacteriocin release protein, a small lipoprotein. *J Bacteriol* 175(5):1543-7.
- Padmavathi, P. V., and H. J. Steinhoff
- 2008 Conformation of the closed channel state of colicin A in proteoliposomes: an umbrella model. *J Mol Biol* 378(1):204-14.
- Palmer, T., B. C. Berks, and F. Sargent
- 2010 Analysis of Tat targeting function and twin-arginine signal peptide activity in *Escherichia coli*. *Methods Mol Biol* 619:191-216.
- Palva, E. T.
- 1979 Protein interactions in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 93(3):495-503.
- Parker, M. W., F. Pattus, A. D. Tucker, and D. Tsernoglou
- 1989 Structure of the membrane-pore-forming fragment of colicin A. *Nature* 337(6202):93-6.
- Parker, M. W., J. P. Postma, F. Pattus, A. D. Tucker, and D. Tsernoglou
- 1992 Refined structure of the pore-forming domain of colicin A at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol* 224(3):639-57.
- Parsons, L. M., A. Grishaev, and A. Bax

- 2008 The periplasmic domain of TolR from *Haemophilus influenzae* forms a dimer with a large hydrophobic groove: NMR solution structure and comparison to SAXS data. *Biochemistry* 47(10):3131-42.
- Parsons, L. M., F. Lin, and J. Orban
- 2006 Peptidoglycan recognition by Pal, an outer membrane lipoprotein. *Biochemistry* 45(7):2122-8.
- Pattanaik, B., and B. L. Montgomery
- 2010 A novel role for a TonB-family protein and photoregulation of iron acclimation in *Fremyella diplosiphon*. *Plant Signal Behav* 5(7).
- Pattus, F., F. Heitz, C. Martinez, S. W. Provencher, and C. Lazdunski
- 1985 Secondary structure of the pore-forming colicin A and its C-terminal fragment. Experimental fact and structure prediction. *Eur J Biochem* 152(3):681-9.
- Pattus, F., D. Massotte, H. U. Wilmsen, J. Lakey, D. Tsernoglou, A. Tucker, and M. W. Parker
- 1990 Colicins: prokaryotic killer-pores. *Experientia* 46(2):180-92.
- Peacock, R. S., V. V. Andrushchenko, A. R. Demcoe, M. Gehmlich, L. S. Lu, A. G. Herrero, and H. J. Vogel
- 2006 Characterization of TonB interactions with the FepA cork domain and FecA N-terminal signaling domain. *Biometals* 19(2):127-42.
- Pecqueur, L., B. D'Autreaux, J. Dupuy, Y. Nicolet, L. Jacquamet, B. Brutscher, I. Michaud-Soret, and B. Bersch
- 2006 Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. *J Biol Chem* 281(30):21286-95.
- Pilsl, H., and V. Braun
- 1995 Evidence that the immunity protein inactivates colicin 5 immediately prior to the formation of the transmembrane channel. *J Bacteriol* 177(23):6966-72.
- Pilsl, H., D. Smajs, and V. Braun
- 1998 The tip of the hydrophobic hairpin of colicin U is dispensable for colicin U activity but is important for interaction with the immunity protein. *J Bacteriol* 180(16):4111-5.
- Pinou, T., and M. A. Riley
- 2001 Nucleotide polymorphism in microcin V plasmids. *Plasmid* 46(1):1-9.
- Pommer, A. J., S. Cal, A. H. Keeble, D. Walker, S. J. Evans, U. C. Kuhlmann, A. Cooper, B. A. Connolly, A. M. Hemmings, G. R. Moore, R. James, and C. Kleanthous
- 2001 Mechanism and cleavage specificity of the H-N-H endonuclease colicin E9. *J Mol Biol* 314(4):735-49.
- Pommier, S., M. Gavioli, E. Cascales, and R. Lloubes

- 2005 Tol-dependent macromolecule import through the Escherichia coli cell envelope requires the presence of an exposed TolA binding motif. *J Bacteriol* 187(21):7526-34.
- Postle, K.
- 1990 Aerobic regulation of the Escherichia coli tonB gene by changes in iron availability and the fur locus. *J Bacteriol* 172(5):2287-93.
- Postle, K., and R. F. Good
- 1983 DNA sequence of the Escherichia coli tonB gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(17):5235-9.
- Postle, K., and R. A. Larsen
- 2007 TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes. *Biometals* 20(3-4):453-65.
- Postle, K., and J. T. Skare
- 1988 Escherichia coli TonB protein is exported from the cytoplasm without proteolytic cleavage of its amino terminus. *J Biol Chem* 263(22):11000-7.
- Prouty, A. M., J. C. Van Velkinburgh, and J. S. Gunn
- 2002 Salmonella enterica serovar typhimurium resistance to bile: identification and characterization of the tolQRA cluster. *J Bacteriol* 184(5):1270-6.
- Pugsley, A. P.
- 1988 The immunity and lysis genes of ColN plasmid pCHAP4. *Mol Gen Genet* 211(2):335-41.
- Pugsley, A. P., and M. Schwartz
- 1984 Colicin E2 release: lysis, leakage or secretion? Possible role of a phospholipase. *EMBO J* 3(10):2393-7.
- Pukatzi, S., A. T. Ma, D. Sturtevant, B. Krastins, D. Sarracino, W. C. Nelson, J. F. Heidelberg, and J. J. Mekalanos
- 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(5):1528-33.
- Qiu, X. Q., K. S. Jakes, A. Finkelstein, and S. L. Slatin
- 1994 Site-specific biotinylation of colicin Ia. A probe for protein conformation in the membrane. *J Biol Chem* 269(10):7483-8.
- Qiu, X. Q., K. S. Jakes, P. K. Kienker, A. Finkelstein, and S. L. Slatin
- 1996 Major transmembrane movement associated with colicin Ia channel gating. *J Gen Physiol* 107(3):313-28.
- Raggett, E. M., G. Bainbridge, L. J. Evans, A. Cooper, and J. H. Lakey

- 1998 Discovery of critical Tol A-binding residues in the bactericidal toxin colicin N: a biophysical approach. *Mol Microbiol* 28(6):1335-43.
- Rastogi, V. K., and M. E. Girvin
- 1999 Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. *Nature* 402(6759):263-8.
- Rath, P., O. Bousche, A. R. Merrill, W. A. Cramer, and K. J. Rothschild
- 1991 Fourier transform infrared evidence for a predominantly alpha-helical structure of the membrane bound channel forming COOH-terminal peptide of colicin E1. *Biophys J* 59(3):516-22.
- Ray, M. C., P. Germon, A. Vianney, R. Portalier, and J. C. Lazzaroni
- 2000 Identification by genetic suppression of *Escherichia coli* TolB residues important for TolB-Pal interaction. *J Bacteriol* 182(3):821-4.
- Raymond, L., S. L. Slatin, and A. Finkelstein
- 1985 Channels formed by colicin E1 in planar lipid bilayers are large and exhibit pH-dependent ion selectivity. *J Membr Biol* 84(2):173-81.
- Riley, M. A.
- 1993a Molecular mechanisms of colicin evolution. *Mol Biol Evol* 10(6):1380-95.
- 
- 1993b Positive selection for colicin diversity in bacteria. *Mol Biol Evol* 10(5):1048-59.
- 
- 1998 Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annu Rev Genet* 32:255-78.
- Riley, M. A., L. Cadavid, M. S. Collett, M. N. Neely, M. D. Adams, C. M. Phillips, J. V. Neel, and D. Friedman
- 2000 The newly characterized colicin Y provides evidence of positive selection in pore-former colicin diversification. *Microbiology* 146 ( Pt 7):1671-7.
- Robichon, C., D. Vidal-Ingigliardi, and A. P. Pugsley
- 2005 Depletion of apolipoprotein N-acyltransferase causes mislocalization of outer membrane lipoproteins in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 280(2):974-83.
- Rodriguez-Herva, J. J., M. I. Ramos-Gonzalez, and J. L. Ramos
- 1996 The *Pseudomonas putida* peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein is involved in maintenance of the integrity of the cell envelope. *J Bacteriol* 178(6):1699-706.
- Roos, U., R. E. Harkness, and V. Braun
- 1989 Assembly of colicin genes from a few DNA fragments. Nucleotide sequence of colicin D. *Mol Microbiol* 3(7):891-902.

Roujeinikova, A.

2008 Crystal structure of the cell wall anchor domain of MotB, a stator component of the bacterial flagellar motor: implications for peptidoglycan recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(30):10348-53.

Sansom, M. S., I. H. Shrivastava, K. M. Ranatunga, and G. R. Smith

2000 Simulations of ion channels--watching ions and water move. *Trends Biochem Sci* 25(8):368-74.

Sato, K., and M. Homma

2000 Multimeric structure of PomA, a component of the Na<sup>+</sup>-driven polar flagellar motor of vibrio alginolyticus. *J Biol Chem* 275(26):20223-8.

Saul, F. A., J. P. Arie, B. Vulliez-le Normand, R. Kahn, J. M. Betton, and G. A. Bentley

2004 Structural and functional studies of FkpA from Escherichia coli, a cis/trans peptidyl-prolyl isomerase with chaperone activity. *J Mol Biol* 335(2):595-608.

Schauer, K., B. Gouget, M. Carriere, A. Labigne, and H. de Reuse

2007 Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery. *Mol Microbiol* 63(4):1054-68.

Scheffers, DJ, and MG Pinho

2005 Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiology and molecular biology reviews* 69(4):585.

Schendel, S. L., and W. A. Cramer

1994 On the nature of the unfolded intermediate in the in vitro transition of the colicin E1 channel domain from the aqueous to the membrane phase. *Protein Sci* 3(12):2272-9.

Schirmer, T., T. A. Keller, Y. F. Wang, and J. P. Rosenbusch

1995 Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* 267(5197):512-4.

Schmid, K, R Ebner, K Jahreis, JW Lengeler, and F Titgemeyer

1991 A sugar-specific porin, ScrY, is involved in sucrose uptake in enteric bacteria. *Molecular Microbiology* 5(4):941-950.

Schmitt, R.

2003 Helix rotation model of the flagellar rotary motor. *Biophys J* 85(2):843-52.

Schoffler, H., and V. Braun

1989 Transport across the outer membrane of Escherichia coli K12 via the FhuA receptor is regulated by the TonB protein of the cytoplasmic membrane. *Mol Gen Genet* 217(2-3):378-83.

Schramm, E., J. Mende, V. Braun, and R. M. Kamp

- 1987 Nucleotide sequence of the colicin B activity gene *cba*: consensus pentapeptide among TonB-dependent colicins and receptors. *J Bacteriol* 169(7):3350-7.
- Schramm, E., T. Olschlager, W. Troger, and V. Braun
- 1988 Sequence, expression and localization of the immunity protein for colicin B. *Mol Gen Genet* 211(1):176-82.
- Schuldiner, S., A. Shirvan, Y. Stern-Bach, S. Steiner-Mordoch, R. Yelin, and O. Laskar
- 1994 From bacterial antibiotic resistance to neurotransmitter uptake. A common theme of cell survival. *Ann N Y Acad Sci* 733:174-84.
- Sean Peacock, R, AM Weljie, S Peter Howard, FD Price, and HJ Vogel
- 2005 The solution structure of the C-terminal domain of TonB and interaction studies with TonB box peptides. *Journal of molecular biology* 345(5):1185-1197.
- Seliger, S. S., A. R. Mey, A. M. Valle, and S. M. Payne
- 2001 The two TonB systems of *Vibrio cholerae*: redundant and specific functions. *Mol Microbiol* 39(3):801-12.
- Sharma, O., E. Yamashita, M. V. Zhalnina, S. D. Zakharov, K. A. Datsenko, B. L. Wanner, and W. A. Cramer
- 2007 Structure of the complex of the colicin E2 R-domain and its BtuB receptor. The outer membrane colicin translocon. *J Biol Chem* 282(32):23163-70.
- Sharp, L. L., J. Zhou, and D. F. Blair
- 1995a Features of MotA proton channel structure revealed by tryptophan-scanning mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(17):7946-50.
- 
- 1995b Tryptophan-scanning mutagenesis of MotB, an integral membrane protein essential for flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 34(28):9166-71.
- Shi, Z., K. F. Chak, and H. S. Yuan
- 2005 Identification of an essential cleavage site in Cole7 required for import and killing of cells. *J Biol Chem* 280(26):24663-8.
- Shin, Y. K., C. Levinthal, F. Levinthal, and W. L. Hubbell
- 1993 Colicin E1 binding to membranes: time-resolved studies of spin-labeled mutants. *Science* 259(5097):960-3.
- Shultis, D. D., M. D. Purdy, C. N. Banchs, and M. C. Wiener
- 2006 Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane cobalamin transporter BtuB in complex with the carboxy-terminal domain of TonB. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 62(Pt 7):638-41.
- Skare, J. T., B. M. Ahmer, C. L. Seachord, R. P. Darveau, and K. Postle

- 1993 Energy transduction between membranes. TonB, a cytoplasmic membrane protein, can be chemically cross-linked in vivo to the outer membrane receptor FepA. *J Biol Chem* 268(22):16302-8.
- Skare, J. T., and K. Postle
- 1991 Evidence for a TonB-dependent energy transduction complex in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 5(12):2883-90.
- Slatin, S. L.
- 1988 Colicin E1 in planar lipid bilayers. *Int J Biochem* 20(8):737-44.
- Slatin, S. L., D. Duche, and D. Baty
- 2010 Determinants of the proton selectivity of the colicin A channel. *Biochemistry* 49(23):4786-93.
- Slatin, S. L., D. Duche, P. K. Kienker, and D. Baty
- 2004 Gating movements of colicin A and colicin Ia are different. *J Membr Biol* 202(2):73-83.
- Slatin, S. L., A. Finkelstein, and P. K. Kienker
- 2008 Anomalous proton selectivity in a large channel: colicin A. *Biochemistry* 47(6):1778-88.
- Slatin, S. L., A. Nardi, K. S. Jakes, D. Baty, and D. Duche
- 2002 Translocation of a functional protein by a voltage-dependent ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(3):1286-91.
- Slatin, S. L., X. Q. Qiu, K. S. Jakes, and A. Finkelstein
- 1994 Identification of a translocated protein segment in a voltage-dependent channel. *Nature* 371(6493):158-61.
- Slatin, SL, and PK Kienker
- 2003 Colicin channels and protein translocation: parallels with diphtheria toxin. Pore forming peptides and protein toxins. Taylor and Francis, London, United Kingdom:102-131.
- Smajs, D., M. Dolezalova, P. Macek, and L. Zidek
- 2008 Inactivation of colicin Y by intramembrane helix-helix interaction with its immunity protein. *FEBS J* 275(21):5325-31.
- Smajs, D., P. Matejkova, and G. M. Weinstock
- 2006 Recognition of pore-forming colicin Y by its cognate immunity protein. *FEMS Microbiol Lett* 258(1):108-13.
- Smallwood, C. R., A. G. Marco, Q. Xiao, V. Trinh, S. M. Newton, and P. E. Klebba
- 2009 Fluoresceination of FepA during colicin B killing: effects of temperature, toxin and TonB. *Mol Microbiol* 72(5):1171-80.

Smarda, J., M. Fialova, and J. Smarda, Jr.

2001 Cytotoxic effects of colicins E1 and E3 on v-myb-transformed chicken monoblasts. *Folia Biol (Praha)* 47(1):11-3.

Smarda, J., V. Obdrzalek, I. Taborsky, and J. Mach

1978 The cytotoxic and cytotoxic effect of colicin E3 on mammalian tissue cells. *Folia Microbiol (Praha)* 23(4):272-7.

Smith, S. G., V. Mahon, M. A. Lambert, and R. P. Fagan

2007 A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol Lett* 273(1):1-11.

Sobko, A. A., E. A. Kotova, Y. N. Antonenko, S. D. Zakharov, and W. A. Cramer

2004 Effect of lipids with different spontaneous curvature on the channel activity of colicin E1: evidence in favor of a toroidal pore. *FEBS Lett* 576(1-2):205-10.

—

2006 Lipid dependence of the channel properties of a colicin E1-lipid toroidal pore. *J Biol Chem* 281(20):14408-16.

Sobko, A. A., S. I. Kovalchuk, E. A. Kotova, and Y. N. Antonenko

2010 Induction of lipid flip-flop by colicin e1 - a hallmark of proteolipidic pore formation in liposome membranes. *Biochemistry (Mosc)* 75(6):728-33.

Soelaiman, S., K. Jakes, N. Wu, C. Li, and M. Shoham

2001 Crystal structure of colicin E3: implications for cell entry and ribosome inactivation. *Mol Cell* 8(5):1053-62.

Song, H. Y., F. S. Cohen, and W. A. Cramer

1991 Membrane topography of ColE1 gene products: the hydrophobic anchor of the colicin E1 channel is a helical hairpin. *J Bacteriol* 173(9):2927-34.

Song, H. Y., and W. A. Cramer

1991 Membrane topography of ColE1 gene products: the immunity protein. *J Bacteriol* 173(9):2935-43.

Sonntag, I., H. Schwarz, Y. Hirota, and U. Henning

1978 Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins. *J Bacteriol* 136(1):280-5.

Springer, T. A.

1998 An extracellular beta-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor, and extracellular matrix components. *J Mol Biol* 283(4):837-62.

Stork, M., M. P. Bos, I. Jongerius, N. de Kok, I. Schilders, V. E. Weynants, J. T. Poolman, and J. Tommassen

2010 An outer membrane receptor of *Neisseria meningitidis* involved in zinc acquisition with vaccine potential. *PLoS Pathog* 6:e1000969.

Sturgis, J. N.

2001 Organisation and evolution of the *tol-pal* gene cluster. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3(1):113-22.

Sudo, Y, Y Kitade, Y Furutani, M Kojima, S Kojima, M Homma, and H Kandori

2009 Interaction between Na<sup>+</sup> Ion and Carboxylates of the PomA- PomB Stator Unit Studied by ATR-FTIR Spectroscopy. *Biochemistry* 48(49):11699-11705.

Sung, M., and R. E. Dalbey

1992 Identification of potential active-site residues in the *Escherichia coli* leader peptidase. *J Biol Chem* 267(19):13154-9.

Suzuki, H., Y. Nishimura, S. Yasuda, A. Nishimura, M. Yamada, and Y. Hirota

1978 Murein-lipoprotein of *Escherichia coli*: a protein involved in the stabilization of bacterial cell envelope. *Mol Gen Genet* 167(1):1-9.

Tamayo, R., S. S. Ryan, A. J. McCoy, and J. S. Gunn

2002 Identification and genetic characterization of PmrA-regulated genes and genes involved in polymyxin B resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun* 70(12):6770-8.

Tang, H., T. F. Braun, and D. F. Blair

1996 Motility protein complexes in the bacterial flagellar motor. *J Mol Biol* 261(2):209-21.

Terashima, H, S Kojima, and M Homma

2010 Functional Transfer of an Essential Aspartate for the Ion-binding Site in the Stator Proteins of the Bacterial Flagellar Motor. *Journal of molecular biology*.

Terashima, H., H. Fukuoka, T. Yakushi, S. Kojima, and M. Homma

2006 The *Vibrio* motor proteins, MotX and MotY, are associated with the basal body of Na<sup>+</sup>-driven flagella and required for stator formation. *Mol Microbiol* 62(4):1170-80.

Terashima, H., S. Kojima, and M. Homma

2008 Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *Int Rev Cell Mol Biol* 270:39-85.

Thormann, K. M., and A. Paulick

2010 Tuning the flagellar motor. *Microbiology* 156(Pt 5):1275-83.

Togashi, F., S. Yamaguchi, M. Kihara, S. I. Aizawa, and R. M. Macnab

- 1997 An extreme clockwise switch bias mutation in *fliG* of *Salmonella typhimurium* and its suppression by slow-motile mutations in *motA* and *motB*. *J Bacteriol* 179(9):2994-3003.
- Tokuda, H
- 2009 Biogenesis of outer membranes in Gram-negative bacteria. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 73(3):465-473.
- Tomoyasu, T., J. Gamer, B. Bukau, M. Kanemori, H. Mori, A. J. Rutman, A. B. Oppenheim, T. Yura, K. Yamanaka, H. Niki, and et al.
- 1995 *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor sigma 32. *EMBO J* 14(11):2551-60.
- Traub, I., S. Gaisser, and V. Braun
- 1993 Activity domains of the TonB protein. *Mol Microbiol* 8(2):409-23.
- Tseng, T. T., B. M. Tyler, and J. C. Setubal
- 2009 Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol* 9 Suppl 1:S2.
- Vakharia-Rao, H., K. A. Kastead, M. I. Savenkova, C. M. Bulathsinghala, and K. Postle
- 2007 Deletion and substitution analysis of the *Escherichia coli* TonB Q160 region. *J Bacteriol* 189(13):4662-70.
- Valent, Q. A., D. A. Kendall, S. High, R. Kusters, B. Oudega, and J. Luirink
- 1995 Early events in preprotein recognition in *E. coli*: interaction of SRP and trigger factor with nascent polypeptides. *EMBO J* 14(22):5494-505.
- van den Brink-van der Laan, E., J. A. Killian, and B. de Kruijff
- 2004 Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochim Biophys Acta* 1666(1-2):275-88.
- van der Goot, F. G., J. M. Gonzalez-Manas, J. H. Lakey, and F. Pattus
- 1991 A 'molten-globule' membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin A. *Nature* 354(6352):408-10.
- van der Wal, F. J., C. M. ten Hagen, B. Oudega, and J. Luirink
- 1995 The stable bacteriocin release protein signal peptide, expressed as a separate entity, functions in the release of cloacin DF13. *FEMS Microbiol Lett* 131(2):173-7.
- Vandeputte-Rutten, L., R. A. Kramer, J. Kroon, N. Dekker, M. R. Egmond, and P. Gros
- 2001 Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site. *EMBO J* 20(18):5033-9.
- Vankemmelbeke, M., B. Healy, G. R. Moore, C. Kleanthous, C. N. Penfold, and R. James
- 2005 Rapid detection of colicin E9-induced DNA damage using *Escherichia coli* cells carrying SOS promoter-lux fusions. *J Bacteriol* 187(14):4900-7.

- Vankemmelbeke, M., Y. Zhang, G. R. Moore, C. Kleanthous, C. N. Penfold, and R. James  
2009 Energy-dependent immunity protein release during tol-dependent nuclease colicin translocation. *J Biol Chem* 284(28):18932-41.
- Vianney, A., G. Jubelin, S. Renault, C. Dorel, P. Lejeune, and J. C. Lazzaroni  
2005 *Escherichia coli* tol and rcs genes participate in the complex network affecting curli synthesis. *Microbiology* 151(Pt 7):2487-97.
- Vianney, A., T. M. Lewin, W. F. Beyer, Jr., J. C. Lazzaroni, R. Portalier, and R. E. Webster  
1994 Membrane topology and mutational analysis of the TolQ protein of *Escherichia coli* required for the uptake of macromolecules and cell envelope integrity. *J Bacteriol* 176(3):822-9.
- Vianney, A., M. M. Muller, T. Clavel, J. C. Lazzaroni, R. Portalier, and R. E. Webster  
1996 Characterization of the tol-pal region of *Escherichia coli* K-12: translational control of tolR expression by TolQ and identification of a new open reading frame downstream of pal encoding a periplasmic protein. *J Bacteriol* 178(14):4031-8.
- Vicente, M., and A. I. Rico  
2006 The order of the ring: assembly of *Escherichia coli* cell division components. *Mol Microbiol* 61(1):5-8.
- Vidal, O., R. Longin, C. Prigent-Combaret, C. Dorel, M. Hooreman, and P. Lejeune  
1998 Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *J Bacteriol* 180(9):2442-9.
- Viitanen, P., M. L. Garcia, and H. R. Kaback  
1984 Purified reconstituted lac carrier protein from *Escherichia coli* is fully functional. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(6):1629-33.
- von Ballmoos, C., A. Wiedenmann, and P. Dimroth  
2009 Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases. *Annu Rev Biochem* 78:649-72.
- von Heijne, G.  
1992 Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* 225(2):487-94.
- Walburger, A., C. Lazdunski, and Y. Corda  
2002 The Tol/Pal system function requires an interaction between the C-terminal domain of TolA and the N-terminal domain of TolB. *Mol Microbiol* 44(3):695-708.
- Walker, D., K. Mosbahi, M. Vankemmelbeke, R. James, and C. Kleanthous  
2007 The role of electrostatics in colicin nuclease domain translocation into bacterial cells. *J Biol Chem* 282(43):31389-97.

Wallis, R., K. Y. Leung, M. J. Osborne, R. James, G. R. Moore, and C. Kleanthous

1998 Specificity in protein-protein recognition: conserved Im9 residues are the major determinants of stability in the colicin E9 DNase-Im9 complex. *Biochemistry* 37(2):476-85.

Walz, D., and S. R. Caplan

2000 An electrostatic mechanism closely reproducing observed behavior in the bacterial flagellar motor. *Biophys J* 78(2):626-51.

Wandersman, C., and P. Delepelaire

2004 Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* 58:611-47.

Wang, Q., Q. Liu, X. Cao, M. Yang, and Y. Zhang

2008 Characterization of two TonB systems in marine fish pathogen *Vibrio alginolyticus*: their roles in iron utilization and virulence. *Arch Microbiol* 190(5):595-603.

Webster, R. E.

1991 The *tol* gene products and the import of macromolecules into *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 5(5):1005-11.

Whiteley, M., J. R. Ott, E. A. Weaver, and R. J. McLean

2001 Effects of community composition and growth rate on aquifer biofilm bacteria and their susceptibility to betadine disinfection. *Environ Microbiol* 3(1):43-52.

Wiener, M. C.

2005 TonB-dependent outer membrane transport: going for Baroque? *Curr Opin Struct Biol* 15(4):394-400.

Wiener, M., D. Freymann, P. Ghosh, and R. M. Stroud

1997 Crystal structure of colicin Ia. *Nature* 385(6615):461-4.

Wilde, S. A., J. W. Valley, W. H. Peck, and C. M. Graham

2001 Evidence from detrital zircons for the existence of continental crust and oceans on the Earth 4.4 Gyr ago. *Nature* 409(6817):175-8.

Wilson, M. L., and R. M. Macnab

1990 Co-overproduction and localization of the *Escherichia coli* motility proteins *motA* and *motB*. *J Bacteriol* 172(7):3932-9.

Witty, M., C. Sanz, A. Shah, J. G. Grossmann, K. Mizuguchi, R. N. Perham, and B. Luisi

2002 Structure of the periplasmic domain of *Pseudomonas aeruginosa* TolA: evidence for an evolutionary relationship with the TonB transporter protein. *EMBO J* 21(16):4207-18.

Wolfe, P. B., P. Silver, and W. Wickner

- 1982 The isolation of homogeneous leader peptidase from a strain of *Escherichia coli* which overproduces the enzyme. *J Biol Chem* 257(13):7898-902.
- Wu, Z., K. S. Jakes, B. S. Samelson-Jones, B. Lai, G. Zhao, E. London, and A. Finkelstein
- 2006 Protein translocation by bacterial toxin channels: a comparison of diphtheria toxin and colicin Ia. *Biophys J* 91(9):3249-56.
- Yamashita, E., M. V. Zhalnina, S. D. Zakharov, O. Sharma, and W. A. Cramer
- 2008 Crystal structures of the OmpF porin: function in a colicin translocon. *EMBO J* 27(15):2171-80.
- Yeh, Y. C., L. R. Comolli, K. H. Downing, L. Shapiro, and H. H. McAdams
- 2010 The *Caulobacter* Tol-Pal complex is essential for outer membrane integrity and the positioning of a polar localization factor. *J Bacteriol*.
- Yem, D. W., and H. C. Wu
- 1978 Physiological characterization of an *Escherichia coli* mutant altered in the structure of murein lipoprotein. *J Bacteriol* 133(3):1419-26.
- Yonekura, K., T. Yakushi, T. Atsumi, S. Maki-Yonekura, M. Homma, and K. Namba
- 2006 Electron cryomicroscopic visualization of PomA/B stator units of the sodium-driven flagellar motor in liposomes. *J Mol Biol* 357(1):73-81.
- Yorimitsu, T., and M. Homma
- 2001 Na<sup>+</sup>-driven flagellar motor of *Vibrio*. *Biochim Biophys Acta* 1505(1):82-93.
- Yorimitsu, T., M. Kojima, T. Yakushi, and M. Homma
- 2004 Multimeric structure of the PomA/PomB channel complex in the Na<sup>+</sup>-driven flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*. *J Biochem* 135(1):43-51.
- Yuan, J., J. C. Zweers, J. M. van Dijl, and R. E. Dalbey
- 2010 Protein transport across and into cell membranes in bacteria and archaea. *Cell Mol Life Sci* 67(2):179-99.
- Zakharov, S. D., and W. A. Cramer
- 2002 Insertion intermediates of pore-forming colicins in membrane two-dimensional space. *Biochimie* 84(5-6):465-75.
- Zakharov, S. D., V. Y. Eroukova, T. I. Rokitskaya, M. V. Zhalnina, O. Sharma, P. J. Loll, H. I. Zgurskaya, Y. N. Antonenko, and W. A. Cramer
- 2004a Colicin occlusion of OmpF and TolC channels: outer membrane translocons for colicin import. *Biophys J* 87(6):3901-11.
- Zakharov, S. D., E. A. Kotova, Y. N. Antonenko, and W. A. Cramer
- 2004b On the role of lipid in colicin pore formation. *Biochim Biophys Acta* 1666(1-2):239-49.

Zakharov, S. D., O. Sharma, M. V. Zhalnina, and W. A. Cramer

2008 Primary events in the colicin translocon: FRET analysis of colicin unfolding initiated by binding to BtuB and OmpF. *Biochemistry* 47(48):12802-9.

Zakharov, S. D., M. V. Zhalnina, O. Sharma, and W. A. Cramer

2006 The colicin E3 outer membrane translocon: immunity protein release allows interaction of the cytotoxic domain with OmpF porin. *Biochemistry* 45(34):10199-207.

Zeth, K., C. Romer, S. I. Patzer, and V. Braun

2008 Crystal structure of colicin M, a novel phosphatase specifically imported by *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 283(37):25324-31.

Zhai, Y. F., W. Heijne, and M. H. Saier, Jr.

2003 Molecular modeling of the bacterial outer membrane receptor energizer, ExbBD/TonB, based on homology with the flagellar motor, MotAB. *Biochim Biophys Acta* 1614(2):201-10.

Zhang, Y. L., and W. A. Cramer

1992 Constraints imposed by protease accessibility on the trans-membrane and surface topography of the colicin E1 ion channel. *Protein Sci* 1(12):1666-76.

—

1993 Intramembrane helix-helix interactions as the basis of inhibition of the colicin E1 ion channel by its immunity protein. *J Biol Chem* 268(14):10176-84.

Zhang, Y., C. Li, M. N. Vankemmelbeke, P. Bardelang, M. Paoli, C. N. Penfold, and R. James

2010 The crystal structure of the TolB box of colicin A in complex with TolB reveals important differences in the recruitment of the common TolB translocation portal used by group A colicins. *Mol Microbiol* 75(3):623-36.

Zhang, Z., S. M. Lapolla, M. G. Annis, M. Truscott, G. J. Roberts, Y. Miao, Y. Shao, C. Tan, J. Peng, A. E. Johnson, X. C. Zhang, D. W. Andrews, and J. Lin

2004 Bcl-2 homodimerization involves two distinct binding surfaces, a topographic arrangement that provides an effective mechanism for Bcl-2 to capture activated Bax. *J Biol Chem* 279(42):43920-8.

Zhou, J., and D. F. Blair

1997 Residues of the cytoplasmic domain of MotA essential for torque generation in the bacterial flagellar motor. *J Mol Biol* 273(2):428-39.

Zhou, J., R. T. Fazio, and D. F. Blair

1995 Membrane topology of the MotA protein of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 251(2):237-42.

Zhou, J., S. A. Lloyd, and D. F. Blair

1998a Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. Proc Natl Acad Sci U S A 95(11):6436-41.

Zhou, J., L. L. Sharp, H. L. Tang, S. A. Lloyd, S. Billings, T. F. Braun, and D. F. Blair

1998b Function of protonatable residues in the flagellar motor of Escherichia coli: a critical role for Asp 32 of MotB. J Bacteriol 180(10):2729-35.

Zhou, L., R. Srisatjaluk, D. E. Justus, and R. J. Doyle

1998c On the origin of membrane vesicles in gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Lett 163(2):223-8.

Zhou, Y., L. Guan, J. A. Freites, and H. R. Kaback

2008 Opening and closing of the periplasmic gate in lactose permease. Proc Natl Acad Sci U S A 105(10):3774-8.



**Résumé :** Le système Tol-Pal est un complexe de l'enveloppe d'*Escherichia coli* composé de CINQ protéines. Les protéines TolQ, TolR, TolA forment un complexe dans la membrane interne; la lipoprotéine Pal interagit avec le peptidoglycane avec la protéine périplasmique TolB. Ce système est conservé chez la plupart des bactéries à Gram négatif. Il joue un rôle important dans le maintien de la stabilité de l'enveloppe et dans l'étape tardive de la division cellulaire. Une interaction entre TolA et Pal relie les membranes interne et externe, et dépend des protéines TolQ, TolR et de la force proton motrice (PMF). Les protéines TolQ-R-A formeraient un moteur moléculaire utilisant la PMF afin de relier membranes interne, externe et le peptidoglycane. Mon travail a consisté à étudier l'organisation des segments transmembranaires (STs) de TolQ et TolR au sein de la membrane interne d'*E. coli* en utilisant l'approche expérimentale du « cysteine scanning ». Ainsi, nous avons pu identifier les résidus impliqués dans les interactions entre les STs et améliorer la connaissance de l'organisation moléculaire de ce système. Nous avons aussi démontré la dimérisation du ST de TolR et l'importance de la dynamique dans le fonctionnement de ce moteur. Le système Tol est parasité par certaines toxines (comme les colicines) et par des phages filamenteux. Les colicines sont produites par des souches d'*Escherichia coli* et active contre les entérobactéries. Je me suis aussi intéressé à l'organisation structurale de la protéine d'immunité de la colicine A. La colicine A forme un canal ionique dans la membrane interne pour tuer la bactérie cible. Les cellules produisant la Colicine A synthétisent également une protéine d'immunité (Cai) qui les protègent de l'action de la colicine A. Par une approche combinant « cysteine scanning » classique et un « anti-cysteine scanning », nous avons pu apporter des informations nouvelles sur l'organisation des quatre STs de Cai. Nous avons montré que Cai forme un dimère dans la membrane et que ce dimère se dissocie au contact de sa cible, la colicine A.

**Abstract:** The Tol-Pal system is a protein complex of the *Escherichia coli* cell envelope. It consists of five proteins. The TolQ, TolR, TolA proteins form a complex in the inner membrane, the lipoprotein Pal interacts with the peptidoglycan and with the periplasmic protein TolB. This system is conserved in most Gram-negative bacteria. It plays an important role in maintaining the integrity of the outer membrane and in the late stage of cell division. The interaction between Pal and TolA connects inner and outer membranes and depends on TolQ, TolR and the proton motive force (pmf). The TolQ-R-A proteins are suspected to form a molecular motor using pmf to connect the inner and outer membranes and the peptidoglycan. The first aim of my work was to study the organization of the transmembrane helices (TMHs) of *E. coli* TolQ and TolR using the cysteine scanning approaches. We identified residues involved in the interactions between the TMHs and improved the knowledge of the molecular organization of this system. We have also demonstrated the dimerization of the TMH of TolR and the importance of its dynamic movement in the system. The second aim of my work was to analyze the structural organization of the immunity protein to colicin A. The colicins are produced by certain strains of *E. coli* and are active against other Enterobacteriaceae. The colicin A forms an ion channel in the bacterial inner membrane which kill the bacteria. It hijacks the Tol system to enter in the cell. Cells producing colicin A also synthesize the colicin A immunity protein (Cai) which protects the producing cells against the action of colicin A. The approaches combining "cysteine scanning" and "anti-cysteine-scanning", we found that Cai form a dimer in the membrane which dissociates upon contact with its target, the colicin A.

**Mot clef :** Tol-Pal, protéine d'immunité, colicine, interaction hélice-hélice, cysteine scanning, *Escherichia coli*

**Discipline :** Microbiologie moléculaire  
Laboratoire d'ingénierie des Systèmes Macromoléculaires  
Institut de Biologie Structurale et de Microbiologie  
CNRS UPR 9027 13402 Marseille cedex 2