

UNIVERSITE DE LILLE1 - SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Ecole Doctorale de Biologie-Santé (ED 446)

Thèse en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR EN BIOLOGIE

Etudes structurales et fonctionnelles du système de sécrétion à deux partenaires HxuA/HxuB de *Haemophilus influenzae*

Soutenue par

Stéphanie BAELEN

Le 13 décembre 2013

Thèse dirigée par Dr Vincent VILLERET

Et co-encadrée par Dr Bernard CLANTIN

Composition du jury :

Dr Philippe DELANNOY	Président de jury
Dr Philippe DELEPELAIRE	Rapporteur
Pr Claude DIDIERJEAN	Rapporteur
Dr Isabelle LANDRIEU	Examineur
Pr Johan WOUTERS	Examineur
Dr Vincent VILLERET	Directeur de thèse
Dr Bernard CLANTIN	Invité

Thèse préparée au Laboratoire de Biochimie et Biologie Structurale Intégrée
Institut de Recherche Interdisciplinaire (IRI) – USR3078 CNRS (Villeneuve d'Ascq)

Remerciements

Je voudrais dans un premier temps remercier Vincent Villeret de m'avoir accordé sa confiance et de m'avoir intégrée dans son équipe.

Je tiens également à remercier tout particulièrement Bernard pour toute l'aide et le soutien qu'il m'a apporté au cours de ses trois années que ce soit pour le travail de labo, l'analyse de données ou pour ses conseils rédactionnels. Merci aussi à lui pour toutes les discussions scientifiques et autres que nous avons eues autour d'un gel d'électrophorèse ou d'un thé.

Merci aussi à toi Fred pour ton aide précieuse et tes bons conseils pour les clonages constituant ni plus ni moins la base d'un bon travail de recherche.

J'en profite pour remercier l'ensemble des personnes qui ont collaboré aux travaux de ma thèse. Pour les observations en microscopie optique, merci à Corentin Spriet pour le temps qu'il m'a consacré et pour ses explications. Merci à Daniel Lévy pour l'analyse par microscopie électronique. Merci à Françoise Jacob-Dubuisson et Jérémy Guérin pour les discussions et réunions ANR. Merci aussi à eux ainsi qu'à Bernard pour cette collaboration autour de la rédaction de la revue. Merci également à Philippe Delepelaire pour les discussions constructives autour du système HxuCBA. Enfin, merci à l'équipe de la ligne de lumière PROXIMA₁ du synchrotron SOLEIL pour les mesures qui y ont été faites.

Bien sûr un laboratoire de recherche comprend plusieurs équipes qui se croisent et travaillent ensemble. Par conséquent, merci à Zoé pour nos discussions, nos repas et soirées jeux. Merci également à mamy Elisabeth, à Jean-Luc, à Didier, à Alexis à qui je squatte régulièrement la chaise de bureau, à Prakash et à Julien avec lesquels j'ai partagé un bureau au cours de cette dernière année. Merci également à l'ensemble des doctorants et post-docs pour les moments de détente entre deux manip à réaliser ou deux chapitres à rédiger.

Un merci tout particulier à Laurence pour son aide administrative et organisationnelle ainsi que pour sa bonne humeur.

Merci aux badistes Prakash, Julien et Haoling de m'avoir refait découvrir ce sport et pour ces bons moments de défoule, ce fût avec grand plaisir ...

Je tiens également à remercier mes amis biologistes, chimistes, informaticiens ou physiciens rencontrés aux Facultés de Namur avec qui j'ai passé au cours de ces neuf dernières années de superbes moments qu'ils seraient difficiles d'énumérer. Merci à Alexandra, Simon, Jérémy, Ivan, Jordan, Ludmilla, aux jeunes mariés Judith et Boris ainsi que Florence et Bertrand. Merci à mes anciennes co-kotteuses Amandine, Dani, Steph, Caro, Bellina et Catherine pour leur grain de folie. Merci aussi à Nath.

Bien évidemment, un grand merci à mes proches et plus particulièrement à mes parents et ma sœur qui m'ont toujours soutenue et encouragée. Merci.

Je souhaite également remercier les membres de mon comité de suivi de thèse les Pr Xavier De Bolle, Dr Isabelle Landrieu, Dr Bernard Clantin et Dr Vincent Villeret. Merci à eux pour leur temps, leur écoute et leurs conseils avisés.

Enfin, merci à vous, membres du jury pour le temps que vous consacrerez à la lecture de ce manuscrit et à l'attention que vous porterez lors de ma soutenance.

Un savant fait travailler une puce. Il lui dit :

- *Saute !*

La puce saute. Il lui coupe les pattes et dit :

- *Saute !*

La puce ne saute pas, le savant note sur son carnet :

"Lorsqu'on coupe les pattes d'une puce, elle devient sourde."

Moralité :

Le fait est une chose, l'explication en est une autre.

Jean Vandenhautte (1941-2013)

Professeur émérite de l'Université de Namur

Résumé :

Le système sécrétion de type V à deux partenaires ou système TPS est un système dédié à la sécrétion de protéines de grandes tailles souvent impliquées dans la virulence. La protéine sécrétée ou protéine TpsA traverse la membrane externe via son partenaire membranaire spécifique, la protéine TpsB. Ces systèmes TPS sont répartis en deux sous-familles, la sous-famille FHA/FhaC et la sous-famille HMW1A/HMW1B, peu caractérisée structuralement, à laquelle appartient le système HxuA/HxuB dédié à l'acquisition de l'hème extracellulaire chez *Haemophilus influenzae*.

Ma thèse est consacrée à l'étude structurale et fonctionnelle du système HxuA/HxuB. A cette fin, le système de sécrétion HxuA/HxuB a été recréé chez *E. coli*. Le domaine N-terminal de HxuA, HxuA301, et son partenaire HxuB entier ont été produits respectivement en surnageant de culture et en membrane externe. Après purification de ces protéines, des essais de cristallogénèse ont été réalisés. Des cristaux ont été obtenus pour HxuA301 et HxuB. Seule la structure de HxuA301 a pu être déterminée avec une résolution de 1,5 Å. HxuA301 présente une structure en hélice- β main droite avec un motif extra-hélice constitué de quatre brins- β antiparallèles. Des croisements entre les systèmes HxuA/HxuB et HMW1A/HMW1B ont été réalisés et ont mis en évidence le fait que HxuB n'est pas indispensable au repliement de HxuA301. On a en effet pu résoudre la structure de HxuA301 produite dans *E. coli* sans HxuB (HxuA301-noB) qui est en tout point identique à celle de HxuA301. Cette observation appuie l'hypothèse selon laquelle le domaine N-terminal des protéines TpsA sert à initier le repliement progressif de la protéine TpsA une fois la surface bactérienne atteinte.

Abstract :

The type V two-partner secretion system or TPS system is a system dedicated to the secretion of large proteins mostly implied in virulence. The secreted protein or TpsA protein crosses the outer membrane thanks to its membrane partner, the TpsB protein. The TPS systems are subdivided into two subfamilies, the FHA/FhaC and HMW1A/HMW1B subfamily, with few structural characterized, in which belongs the system HxuA/HxuB dedicated to the acquisition of extracellular haem in *Haemophilus influenzae*.

My thesis focuses on the structural and functional study of HxuA/HxuB system. In that aim, HxuA/HxuB secretion system has been recreated in *E. coli*. HxuA N-terminal domain, HxuA301, and full length HxuB membrane partner have been produced respectively in the supernatant and in the outer membrane. After purification of these proteins, crystallogenesis assays have been realized. Crystals have been obtained for HxuA301 and HxuB. Only the HxuA301 structure has been determined with a resolution of 1,5 Å. HxuA301 presents a structure in right-handed β -helix with one extra-helix motif constituted a four antiparallel β -strands. Crossing between HxuA/HxuB and HMW1A/HMW1B systems has been realized and highlighted that HxuB is not necessary for the folding of HxuA301. Indeed, we succeed to solve the structure of HxuA301 produced in *E. coli* without HxuB (HxuA301-noB) which is strictly identical to the one of HxuA301. This observation supports the hypothesis that N-terminal domain of TpsA could act as a scaffold pour the progressive folding of TpsA protein once the cell surface reached.

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AEBSF	Inhibiteur de sérine protéase
AT	Autotransporteur
ATP	Adénosine Triphosphate
β -OG	n-Octyl- β -D-glucopyranoside
C-terminal	Carboxy-terminal
CMC	Concentration micellaire critique
Da	Dalton(s)
DO	Densité optique
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
FHA	Protéine TpsA mature du système FHA/FhaC de la sous-famille FHA
Fha30	304 premiers résidus de la protéine FHA
FhaC	Protéine TpsB mature du système FHA/FhaC de la sous-famille FhaC
LPS	Lipopolysaccharide
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> de sérotype b
HMW1A	Protéine TpsA du système HMW1A/HMW1B de la sous-famille de HMW1A
HMW1A-PP	373 premiers résidus de la protéine HMW1A
HMW1A373	373 premiers résidus de la protéine HMW1A
HMW1B	Protéine TpsB du système HMW1A/HMW1B de la sous-famille de HMW1B
HxuA	Protéine TpsA du système HxuA/HxuB de la sous-famille de HMW1A
HxuA301	301 premiers résidus de la protéine HxuA
HxuB	Protéine TpsB du système HxuA/HxuB de la sous-famille de HMW1B
$I/\sigma I$	Rapport des intensités du signal sur bruit
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kDa	Kilodalton(s)
λ	Longueur d'onde
Mean <i>B</i>	Facteur de température moyen
N-terminal	Amino-terminal
NTHi	<i>Nontypeable Haemophilus influenzae</i>
OM	<i>Outer membrane</i>
OMP	<i>Outer membrane protein</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>Protein data bank</i>
PEG	Polyéthylène glycol
POTRA	<i>Polypeptide-transport associated (domain)</i>
RMSD	<i>Root-mean-square-deviation</i>
rpm	<i>Rotation per minute</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TPS	<i>Two-partner secretion system</i>
TpsA	Partenaire protéique sécrété de système TPS
TpsB	Partenaire protéique de la membrane externe de système TPS
v/v	Volume/volume
w/v	Poids/volume

Table des matières

INTRODUCTION	1
1. ENVELOPPE DES BACTERIES A GRAM-NEGATIF	1
1.1. <i>Composition de l'enveloppe des bactéries à Gram-négatif</i>	1
1.2. <i>Fonctions et composition de la membrane externe</i>	2
1.3. <i>Protéines de la membrane externe</i>	2
1.3.1. Biogenèse des OMPs	3
1.3.2. Structure en tonneau β	4
1.3.3. Porines.....	8
2. SYSTEMES DE SECRETION CHEZ LES BACTERIES A GRAM-NEGATIF.....	9
3. SYSTEME DE SECRETION DE TYPE V.....	11
3.1. <i>Diversité des systèmes de sécrétion de type V</i>	11
3.1.1. Système de sécrétion de type Va : les autotransporteurs.....	12
3.1.2. Système de sécrétion de type Vc : les autotransporteurs trimériques	13
3.1.3. Système de sécrétion de type Vd	13
3.1.4. Système de sécrétion de type Ve	13
3.2. <i>Système de sécrétion à deux partenaires ou de type Vb</i>	14
3.2.1. Principe général du système de sécrétion à deux partenaires.....	14
3.2.2. Les sous-familles des systèmes TPS.....	15
3.2.3. Les protéines TpsA	16
3.2.4. Les protéines TpsB.....	20
3.2.5. Superfamille des BamA/TpsB	23
3.2.6. Complexe BAM.....	26
3.2.7. Mécanisme(s) de sécrétion des systèmes TPS	29
3.2.7.1. Interaction TpsA/TpsB	29
3.2.7.2. Translocation de la protéine TpsA au travers du TpsB	30
3.2.7.3. Modèles linéaire et en <i>hairpin</i>	30
4. SYSTEME TPS HXUA/HXUB.....	33
4.1. <i>Haemophilus influenzae</i>	34
4.2. <i>Le système HxuCBA</i>	34
OBJECTIFS	39
RESULTATS	43
1. ETUDE STRUCTURALE DE LA PROTEINE HXUA	45
1.1. <i>Production de la protéine HxuA</i>	45
1.2. <i>Purification de la protéine HxuA</i>	46
1.3. <i>Cristallisation de la protéine HxuA</i>	46
1.4. <i>Collecte et traitement des données de diffraction</i>	48
1.5. <i>Structure de la protéine HxuA301</i>	50
1.6. <i>Analyse comparative des structures des protéines TpsA</i>	54
2. ETUDE STRUCTURALE DE LA PROTEINE HXUB	57
2.1. <i>Production de la protéine HxuB</i>	58
2.2. <i>Extraction membranaire de la protéine HxuB</i>	59
2.3. <i>Purification de la protéine HxuB</i>	61
2.3.1. Etape de chromatographie échangeuse de cations	61
2.3.2. Etape de chromatographie d'affinité	62
2.4. <i>Cristallisation de la protéine HxuB</i>	63
2.5. <i>Analyse de HxuB par microscopie électronique</i>	65
3. ETUDE FONCTIONNELLE DU SYSTEME HXUA/HXUB.....	66
3.1. <i>Test de sécrétion de HMW1A373 par HxuB</i>	67

3.2.	<i>Test d'expression de HxuA301-7his en absence de HxuB</i>	67
3.3.	<i>Caractérisation de HxuA301-7his produite sans HxuB (HxuA301-noB)</i>	68
3.3.1.	Production, purification et cristallisation de HxuA301-noB	68
3.3.2.	Collecte et traitement des données de diffraction de HxuA301-noB.....	69
3.3.3.	Structure de HxuA301-noB.....	71
3.4.	<i>Test d'expression dans d'autres souches d'E. coli</i>	72
3.5.	<i>Etude de l'hypothèse de lyse bactérienne lors de la production de HxuA301-noB</i>	73
3.6.	<i>Mise au point de la production de HxuA301 exempte de lyse</i>	75
3.6.1.	Effet du vecteur d'expression.....	75
3.6.2.	Effet de la position du tag poly-histidine.....	76
3.6.3.	Effet de la concentration en IPTG.....	77
3.6.4.	Effet du vecteur d'expression associé aux nouvelles conditions.....	78
3.7.	<i>Croisements entre systèmes TPS</i>	79
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		81
1.	LA PROTEINE HXUA	83
2.	LA PROTEINE HXUB	87
3.	LES STRUCTURES DE BAMA ET DE TAMA.....	88
4.	PERSPECTIVES.....	91
MATERIELS ET METHODES		93
1.	CLONAGES.....	95
2.	PRODUCTION DE PROTEINES.....	99
3.	EXTRACTION MEMBRANAIRE DE HXUB	100
4.	PURIFICATION DES PROTEINES.....	101
4.1.	<i>Purification des protéines TpsA</i>	101
4.2.	<i>Purification de la protéine HxuB</i>	101
5.	CRISTALLOGRAPHIE.....	102
5.1.	<i>Cristallogénèse des protéines</i>	103
5.2.	<i>Collecte de données de diffraction aux rayons X</i>	105
5.3.	<i>Traitement des données de diffraction</i>	105
5.4.	<i>Le phasage</i>	106
5.5.	<i>Construction et affinement du modèle</i>	106
6.	MICROSCOPIE DE CONTRASTE INTERFERENTIEL DIFFERENTIEL	107
ANNEXES		109
PUBLICATIONS		113
1.	ARTICLE: "STRUCTURE OF THE SECRETION DOMAIN OF HXUA FROM <i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i> " (ÉPREUVE DE L'ARTICLE) 115	
2.	REVUE : " TWO-PARTNER SECRETION : AS SIMPLE AS IT SOUNDS?"	121
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		135

Introduction

1. Enveloppe des bactéries à Gram-négatif

1.1. Composition de l'enveloppe des bactéries à Gram-négatif

Le monde des procaryotes est subdivisé en deux groupes majeurs : les eubactéries et les archéobactéries. Les eubactéries, plus souvent nommées bactéries, sont elles-mêmes subdivisées en deux groupes : les bactéries à Gram-positif et les bactéries à Gram-négatif. Cette dénomination, basée sur la coloration gram développée en 1884 par Christian Gram, révèle des différences fondamentales entre ces deux groupes dans la composition de leur enveloppe bactérienne. L'enveloppe des bactéries à Gram-positif consiste en une membrane plasmique couverte à l'extérieur par une épaisse couche de 20 à 80 nm de peptidoglycane ou muréine. Le peptidoglycane est un réseau de polymères constitués d'une alternance de deux dérivés sucre, les acides N-acétyl-glucosamine (NAG) et N-acétyl-muramique (NAM) (Figure 1-C). Ces polymères sont reliés entre eux par de courtes chaînes d'acides aminés (Willey *et al.*, 2008).

L'enveloppe des bactéries à Gram-négatif est plus complexe (Figure 1-A). Elle comprend deux membranes, la membrane interne (ou membrane plasmique) et la membrane externe, séparées par le périplasme. La membrane interne est une bicouche phospholipidique dans laquelle s'intègrent des protéines périphériques et intégrales. Cette membrane semi-perméable est impliquée dans le transport de nutriments et de déchets, la sécrétion de protéines et dans des processus métaboliques. Le périplasme est un compartiment aqueux riche en protéines telles que celles impliquées dans le transport de nutriments et dans la chimiotaxie ou celles impliquées dans la biogenèse de l'enveloppe bactérienne comme les chaperonnes (Ehrmann, 2007). L'espace périplasmique comprend également une fine couche de peptidoglycane de 2 à 7 nm d'épaisseur (Figure 1-C). A noter que le périplasme est dépourvu d'ATP (Willey *et al.*, 2008).

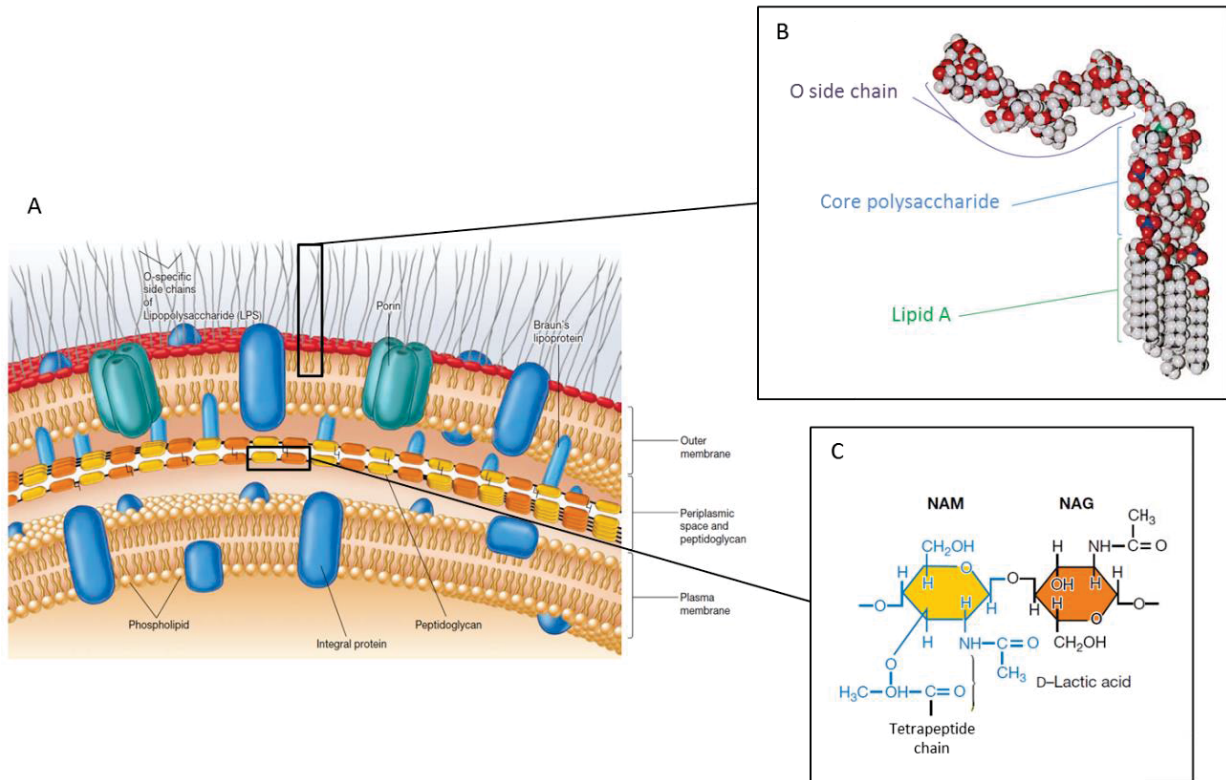


Figure 1. (A) Modèle de l'enveloppe de la bactérie à Gram-négatif. **(B)** Le modèle moléculaire du lipopolysaccharide d'*Escherichia coli*. Le lipide A et le corps de polysaccharide sont droit tandis que la chaîne O se plie et forme un angle avec le reste de la molécule. **(C)** Composition d'une sous-unité de peptidoglycane. NAG : acide N-acétyle-glucosamine. NAM acide N-acétyle-muramique. Adapté de (Willey *et al.*, 2008)

1.2. Fonctions et composition de la membrane externe

La membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique. La partie intérieure de la membrane externe se compose de phospholipides. La partie extérieure est constituée de glycolipides et principalement de lipopolysaccharide (LPS). Le LPS se compose du lipide A, comportant la région hydrophobe d'ancrage à la membrane, auquel est lié et orienté vers le milieu extérieur le noyau (ou *core*) polysaccharidique. A ce noyau est liée une chaîne polysaccharidique, la chaîne latérale O ou antigène O soit un antigène spécifique et variable qui n'est synthétisé que par les souches bactériennes dites lisses (Figure 1-B) (Nikaido, 2003). Les fonctions du LPS sont nombreuses ; le LPS contribue à la charge négative de la membrane externe, à l'attachement de la bactérie à des surfaces et à la formation de biofilms et le lipide A stabilise la membrane externe (Willey *et al.*, 2008).

1.3. Protéines de la membrane externe

Comme les autres membranes biologiques, la membrane externe, de par sa structure en bicouche lipidique, présente une faible perméabilité aux solutés hydrophiles tels que les nutriments. Dès lors la membrane externe intègre de nombreuses protéines aux fonctions diverses telles que le transport

de nutriments, l'efflux de déchets, la sécrétion de protéines, l'activité enzymatique ou encore la transduction de signaux.

La membrane externe est notamment constituée de protéines intégrales ou OMPs (de l'anglais *outer membrane proteins*). Différentes familles de protéines sont rassemblées sous le terme d'OMPs telles que les porines, les canaux spécifiques ou des protéines sécrétrices.

1.3.1. Biogenèse des OMPs

Comme l'ensemble des protéines de la bactérie, les OMPs sont synthétisées dans le cytoplasme obligeant la mise en place de systèmes de translocation vers la membrane externe (Figure 2).

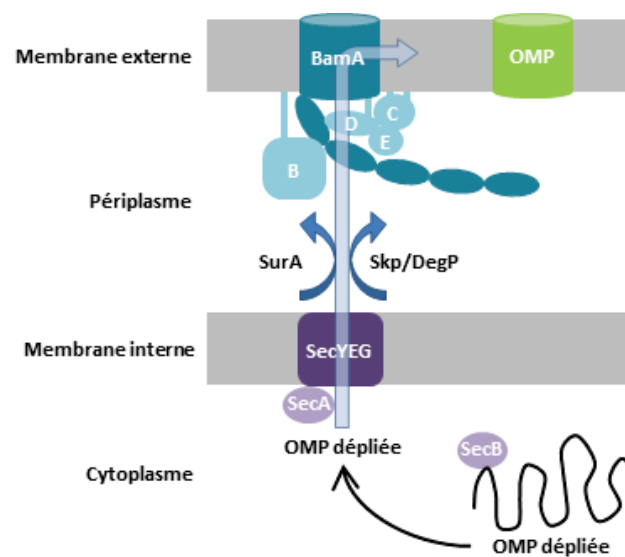


Figure 2. Biogenèse des OMPs chez *E. coli*. Les OMPs sont synthétisées dans le cytoplasme et maintenues sous forme dépliée par SecB (voie SecB-dépendante). Les OMPs sont reconnues par SecA et traversent la membrane interne via le complexe de translocation SecYEG. Des chaperonnes périplasmiques, SurA ou Skp et DegP, reconnaissent les OMPs dépliés et empêchent leur agrégation. Les OMPs sont intégrées à la membrane externe via l'intervention de la machinerie BAM (BamABCDE).

Après synthèse cytoplasmique, les OMPs utilisent la machinerie Sec pour traverser la membrane interne. Cette machinerie ne transporte que des protéines non repliées (du Plessis *et al.*, 2011). Chez *E. coli*, les protéines à destination de l'enveloppe bactérienne peuvent traverser la membrane interne via la translocase Sec soit par la voie SRP-dépendante (*signal recognition particle*), soit par la voie SecB-dépendante. La voie SRP-dépendante est généralement utilisée pour l'insertion des protéines membranaires intégrales dans la membrane cytoplasmique tandis que la voie Sec-dépendante est utilisée par les protéines périplasmiques et les OMPs. Via la voie Sec-dépendante, les protéines sont maintenues après traduction sous forme dépliée par la chaperonne cytoplasmique SecB (Driessen, 2001; Lilly *et al.*, 2009). Le peptide signal N-terminal des OMPs est ensuite reconnu par SecA qui va catalyser la translocation des OMPs au travers du canal formé par le complexe de

translocation SecYEG. Cette translocation est rendue possible grâce à l'énergie fournie lors de l'hydrolyse de l'ATP (du Plessis *et al.*, 2011).

Le passage vers le périplasma des OMPs au travers de la machinerie Sec se fait de leur extrémité N-terminale à la C-terminale (du Plessis *et al.*, 2011). Après la translocation, les OMPs sont libérées dans le périplasma par clivage de leur peptide signal. Dans le périplasma, la stabilisation des OMPs sous forme dépliée, la prévention de leur agrégation et l'aide au repliement dépendent de chaperonnes périplasmiques. Les chaperonnes périplasmiques les plus importantes sont Skp, SurA et DegP.

La chaperonne périplasmique trimérique Skp (*seventeen kilodalton protein*) interagit à la surface de la membrane interne avec les OMPs en translocation dès leur entrée dans le périplasma (Schäfer *et al.*, 1999). SurA interagit spécifiquement avec les OMPs non repliées (Behrens *et al.*, 2001; Bitto and McKay, 2004) et va aider au repliement de celles-ci (Lazar and Kolter, 1996; Rouvière and Gross, 1996; Ureta *et al.*, 2007). DegP est une chaperonne périplasmique qui possède également une activité protéase vis-à-vis de protéines mal repliées (Spiess *et al.*, 1999; Iwanczyk *et al.*, 2007; Meltzer *et al.*, 2008). La synthèse de DegP est induite par une grande variété de stress extra-cytoplasmiques (Subrini and Betton, 2009) et par la présence d'OMPs dans le périplasma (Krojer *et al.*, 2010). Chez *E. coli*, DegP est hexamérique à l'état de repos. L'interaction avec son substrat induit l'activation de DegP et la formation d'un homo-oligomère de 12 ou 24 sous-unités. Cet oligomère enferme le substrat dans une « cage » dont l'environnement favorable permet la dégradation ou le repliement du substrat (Meltzer *et al.*, 2008; Krojer *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2008; Merdanovic *et al.*, 2010).

Bien que l'implication des chaperonnes Skp, SurA et DegP dans la translocation des OMPs au travers du périplasma soit établie, leurs interrelations et leurs rôles exacts ne sont pas clairement définis. Le modèle actuel décrit deux voies parallèles : une voie principale dépendante de SurA et une voie secondaire dépendante de Skp et DegP (Sklar, Wu, Kahne, *et al.*, 2007).

Après la traversée du périplasma, les OMPs sont intégrées dans la membrane externe par le complexe BAM (*β -Barrel Assembly Machinery*) dont le mécanisme est détaillé au point 3.2.6.

1.3.2. Structure en tonneau β

Les OMPs se structurent en tonneau β , monomérique ou oligomérique, composé de 8 (Vogt and Schulz, 1999) à 24 (Remaut *et al.*, 2008) brins β antiparallèles et amphipathiques (Figure 3). L'intérieur du tonneau est essentiellement tapissé par des résidus hydrophiles et l'extérieur par des résidus hydrophobes (Koebnik *et al.*, 2000).

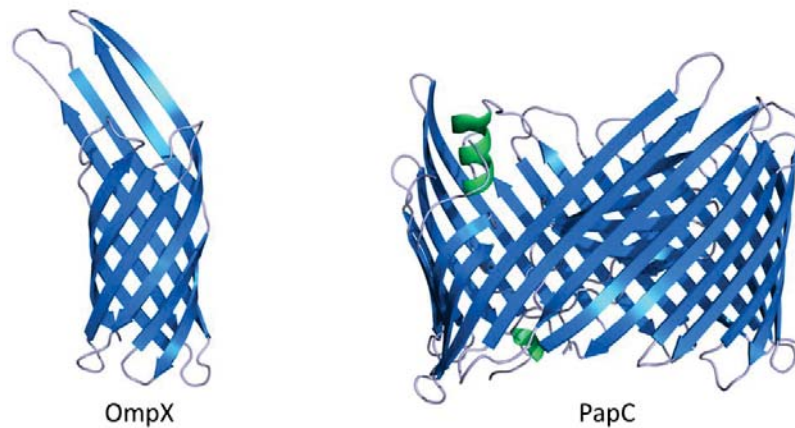


Figure 3. Structures cristallographiques des protéines en tonneau β d'*Escherichia coli*. Représentation en ruban des structures de OmpX (code PDB : 1QJ9), protéine en tonneau β à 8 brins, et de PapC (code PDB : 2VQI), protéine en tonneau β à 24 brins. Vue dans le plan de la membrane externe avec le milieu extérieur au-dessus et le périplasma en-dessous.

Jusqu'à présent, l'ensemble des OMPs de structure connue présente un nombre pair de brins β à l'exception de la protéine mitochondriale VDAC (*voltage-dependent anion channel*) qui est constituée de 19 brins β (Hiller *et al.*, 2008; Bayrhuber *et al.*, 2008; Ujwal *et al.*, 2008).

Les tonneaux β sont caractérisés par leur nombre de brins β et par leur *shear number* qui est une mesure de l'angle d'inclinaison des brins β par rapport à l'axe du tonneau (Schulz, 2002). Plus le *shear number* sera élevé, plus la section du tonneau sera grande (Figure 4).

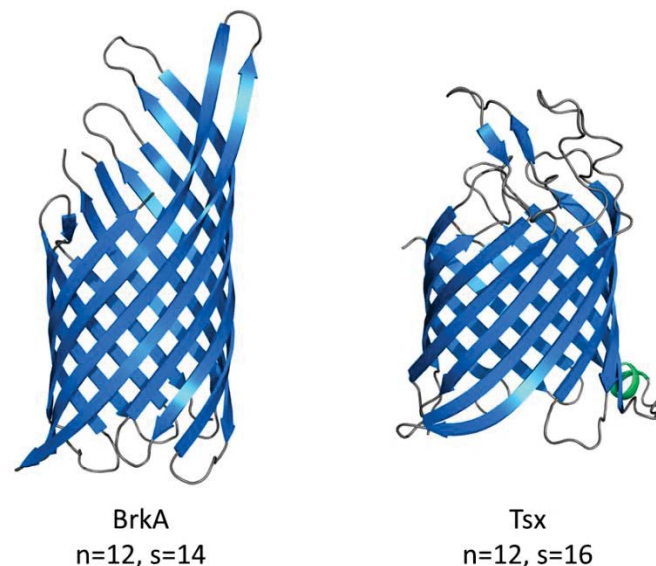


Figure 4. Structures cristallographiques en tonneau β du domaine transporteur de l'autotransporteur BrkA (*Bordetella pertussis*) et du transporteur Tsx (*Escherichia coli*). BrkA (code PDB : 3QQ2) et Tsx (code PDB : 1TLY) sont deux tonneaux à 12 brins β ($n=12$). L'inclinaison des brins de Tsx est plus marquée que celle de BrkA induisant un *shear number* plus élevé pour Tsx ($s=16$) par rapport BrkA ($s=14$). Vue dans le plan de la membrane externe avec le milieu extérieur au-dessus et le périplasma en-dessous.

Les brins β sont reliés entre eux par des boucles hydrophiles. Celles-ci sont généralement courtes du côté périplasmique, on parle de β -tournant ou de β -turn. Du côté du milieu extracellulaire (ou du cytoplasme dans le cas des organelles), ces régions sont souvent de longues boucles ou *loop* en anglais et numérotées L1, L2, et ainsi de suite.

L'angle d'insertion du tonneau β dans la membrane varie d'une protéine à l'autre. Les angles d'insertion des OMPs de structure connue sont modélisés par calcul et reprises dans la base de données « *Orientations of Proteins in Membranes (OPM) database* ».

Les protéines transmembranaires en tonneau β sont le plus souvent monomériques (exemple de la protéine OmpX) (Figure 3) ou de structure quaternaire trimérique (exemple de la porine OmpF) (Figure 5).

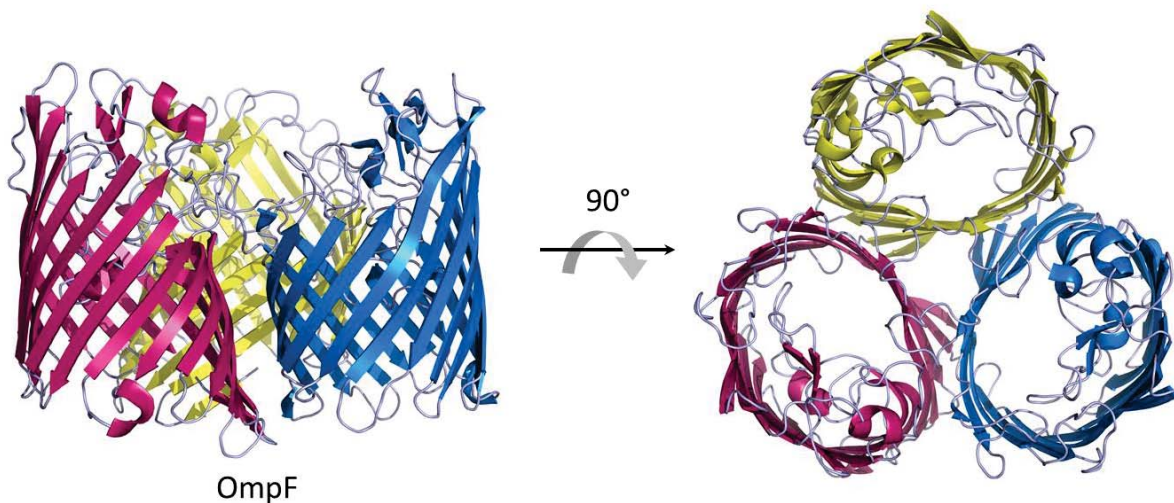


Figure 5. Structure cristallographique de OmpF d'*Escherichia coli*. Représentation en ruban de la structure de OmpF (code PDB : 2POX), protéine en tonneau β à 16 brins de structure quaternaire trimérique. Vue dans le plan de la membrane externe avec le milieu extérieur au-dessus et le périplasmique en-dessous pour la représentation de gauche et vue depuis le milieu extracellulaire pour la représentation de droite. Chaque tonneau est issu d'un polypeptide, coloré différemment.

La phospholipase A (OmpLA) d'*Escherichia coli* est présente sous forme monomérique dans la membrane externe mais, en présence de son substrat et d'ions calcium, elle peut former un dimère réversible et actif (Dekker *et al.*, 1997). La structure cristallographique de la forme dimérique de OmpLA est la seule structure dimérique d'OMP en tonneau β à avoir été décrite à l'heure actuelle (Figure 6) (Snijder *et al.*, 1999).

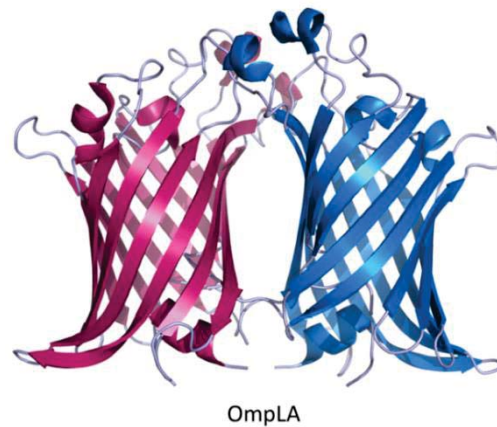


Figure 6. Structure cristallographique du dimère de la phospholipase A (OmpLA) d'*Escherichia coli*. Représentation en ruban de la structure de forme dimérique de OmpLA (code PDB : 1QD6), protéine en tonneau β à 12 brins. Vue dans le plan de la membrane avec le milieu extérieur au-dessus et le périplasma en-dessous. Chaque tonneau est issu d'un polypeptide, coloré différemment.

Dans les cas des dimères et trimères décrits ci-dessus, chaque tonneau β est constitué d'un polypeptide. Il existe aussi des protéines membranaires dont le tonneau β est constitué de plusieurs polypeptides. Quelques cas de structures en tonneau β heptamériques (Figure 7) (Song *et al.*, 1996; De and Olson, 2011; Savva *et al.*, 2013) et octamériques (Faller *et al.*, 2004; Yamashita *et al.*, 2011) ont été décrites. Chacun des monomères de ces multimères contribue à la formation du tonneau β avec deux brins β transmembranaires antiparallèles formant des tonneaux de 14 et 16 brins β respectivement.

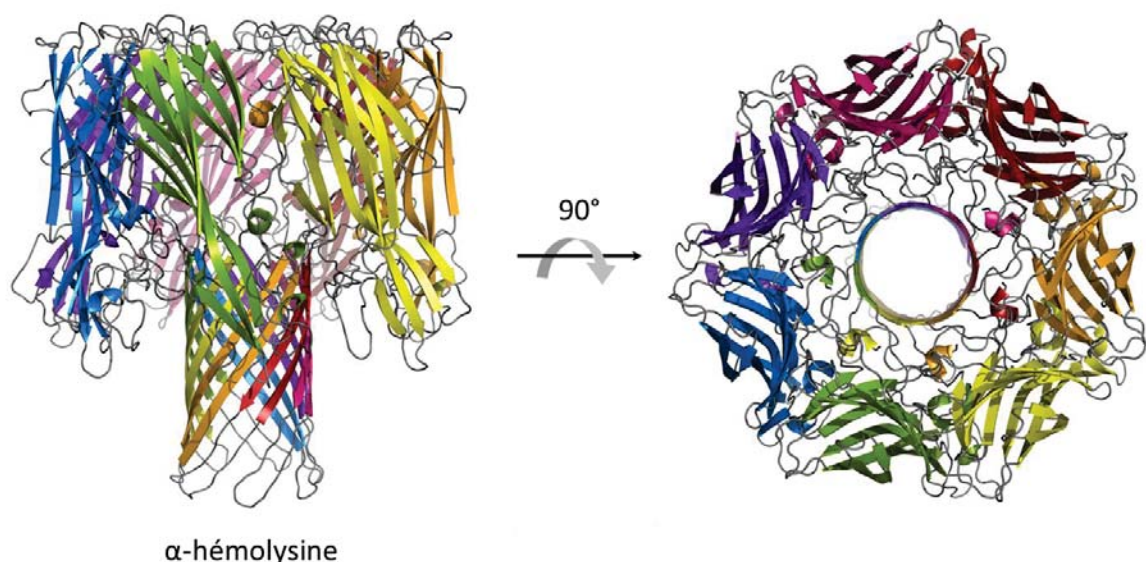
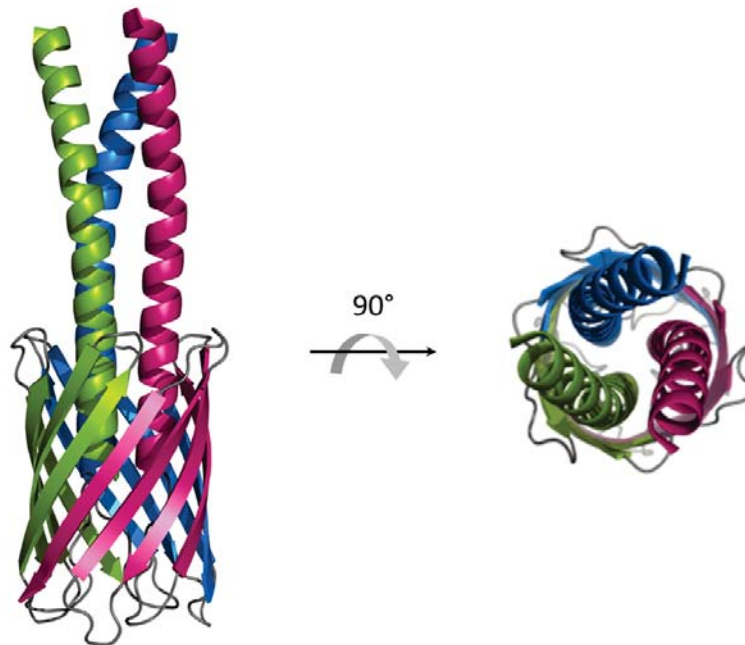


Figure 7. Représentation en ruban de la structure cristallographique de l'α-hémolysine de *Staphylococcus aureus* (code PDB : 7AHL). L'α-hémolysine n'est pas une OMP, elle est exprimée sous forme de monomère soluble et s'assemble en heptamère dans la membrane des cibles eucaryotes (Song *et al.*, 1996). Chaque polypeptide, représenté dans une couleur différente, contribue à deux brins β du tonneau à 14 brins β transmembranaires antiparallèles.

La contribution de plusieurs polypeptides dans la formation d'un tonneau β est aussi retrouvée chez les autotransporteurs trimériques. Dans le cas de l'autotransporteur trimérique Hia de *Haemophilus influenzae* chaque polypeptide contribue à la formation du tonneau β à 12 brins transmembranaires antiparallèles avec 4 brins β (Figure 8) (Meng *et al.*, 2006).



Autotransporteur trimérique Hia

Figure 8. Représentation en ruban de la structure cristallographique de l'autotransporteur trimérique Hia de *Haemophilus influenzae* (code PDB : 2GR7). Chaque polypeptide, représenté dans une couleur différente, contribue à quatre brins β du tonneau à 12 brins β transmembranaires antiparallèles. Vue dans le plan de la membrane externe avec le milieu extérieur au-dessus et le périplasma en-dessous pour la représentation de gauche et vue depuis le milieu extracellulaire pour la représentation de droite.

1.3.3. Porines

Parmi les OMPs, les porines sont les protéines les plus abondantes de la membrane externe. Elles forment des pores permettant la diffusion de petits solutés hydrophiles (< 600 daltons). Les porines ne lient pas leurs substrats mais la diffusion de ceux-ci est guidée par la différence de concentration entre le milieu extracellulaire et le périplasma. Ces porines sans spécificité de substrat hormis une certaine sélectivité pour des cations ou des anions, ont un tonneau β à 16 brins. L'intégration des nutriments présents en faible quantité dans le milieu extracellulaire n'est pas possible par diffusion et est assurée par des transporteurs spécifiques du substrat et des transporteurs actifs. Les porines dont le tonneau comprend 18 brins β sont classifiées comme porines à spécificité de substrat (Schirmer *et al.*, 1995; Forst *et al.*, 1998; Dutzler *et al.*, 2002; Nikaido, 2003; Galdiero *et al.*, 2007; Pagès *et al.*, 2008).

2. Systèmes de sécrétion chez les bactéries à Gram-négatif

Afin de pouvoir coloniser une large variété de milieux et de pouvoir communiquer avec leurs semblables, les bactéries à Gram-négatif ont développé divers modes d'interaction. Ces interactions sont majoritairement assurées par six différents types de systèmes de sécrétion classifiés de I à VI (Figure 9).

Certains de ces systèmes permettent la sécrétion directement aux travers des deux membranes des bactéries à Gram-négatif. D'autres utilisent les systèmes de translocation au travers de la membrane interne : le système de sécrétion Sec et le système de sécrétion Tat (*Twin-Arginine Translocation*). Dans les deux cas, une reconnaissance spécifique d'un peptide signal à l'extrémité N-terminale du substrat se fait et ce peptide signal est clivé lors de la translocation au travers de la membrane interne (Natale *et al.*, 2008). La différence la plus marquante entre ces deux systèmes est que le système Sec transporte les chaînes polypeptidiques sous leur forme dépliée tandis que le système Tat transporte des protéines déjà repliées (Berks *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006).

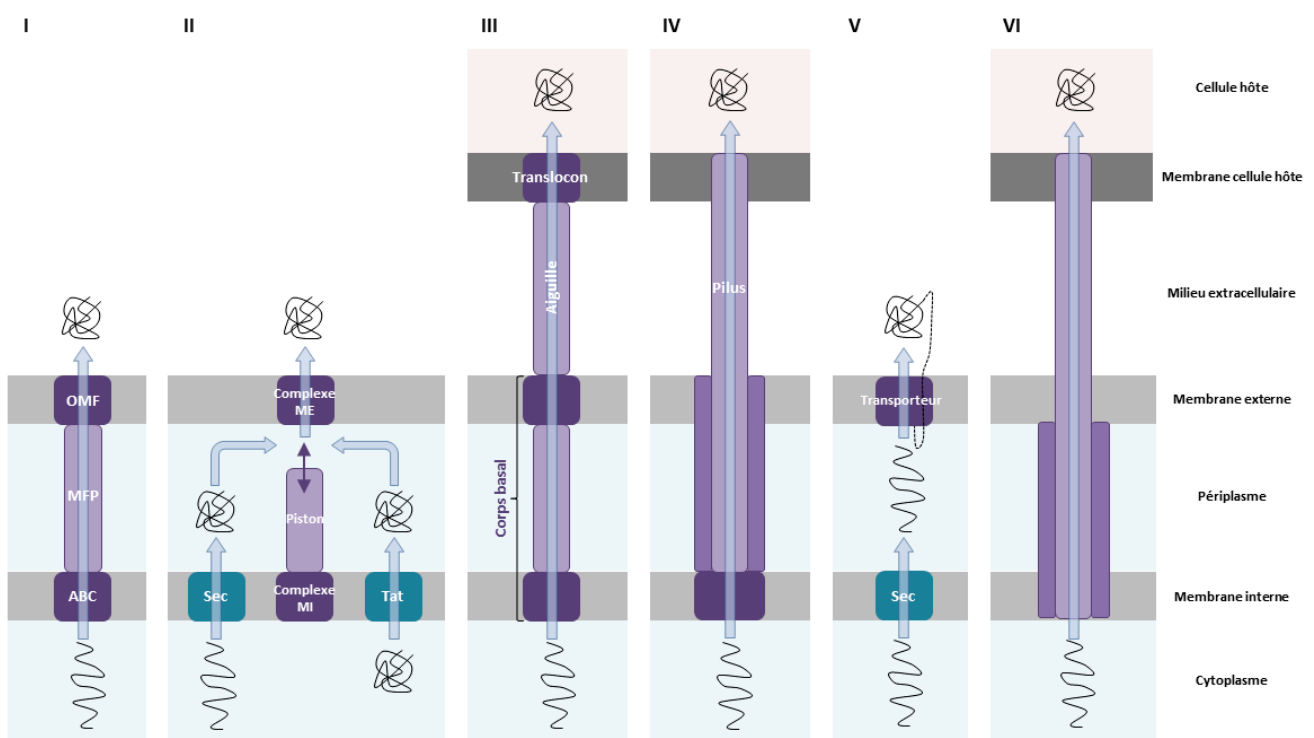


Figure 9. Représentation simplifiée des systèmes de sécrétion de type I à VI. Le pointillé indique la liaison présente entre le domaine transporteur et le domaine passager dans le cas de certains systèmes de type V tels que les autotransporteurs. OMF, *outer membrane factor* ; MFP, *membrane fusion protein* ; ABC, transporteur transmembranaire de type *ATP-binding cassette* (ABC) ; Sec, système de sécrétion Sec ; Tat, système de sécrétion Tat (*Twin-Arginine Translocation*) ; MI, membrane interne ; ME, membrane externe.

Le système de sécrétion de type I est constitué de trois composants : un transporteur transmembranaire de type *ATP-binding cassette* (transporteur ABC) au niveau de la membrane

interne, la protéine de fusion des membranes ou MFP (*membrane fusion protein*) qui constituerait le lien entre le transporteur ABC et le facteur de la membrane externe ou OMF (*outer membrane factor*), le dernier composant de ce système. Les protéines sont adressées à ce système grâce à un peptide signal C-terminal non-clivé lors du transport. Ce système de sécrétion de type I permet le transfert direct de protéines depuis le cytoplasme vers le milieu extérieur sans transiter par le périplasme (Dinh *et al.*, 1994; Saurin *et al.*, 1999; Delepelaire, 2004).

Plus complexes, les systèmes de sécrétion de type II et IV ont des similarités fonctionnelles et structurales laissant supposer une origine commune (Russel, 1998; Peabody *et al.*, 2003). Ces systèmes sont constitués de deux complexes séparés : l'un au niveau de la membrane interne et le second au niveau de la membrane externe. Ensemble, ces deux complexes s'étirent sur l'entière épaisseur de l'enveloppe bactérienne (Crowther *et al.*, 2004; Robert *et al.*, 2005; Daniel *et al.*, 2006; Lybarger *et al.*, 2009).

Le système de sécrétion de type II permet la sécrétion de protéines, telles que des facteurs de virulence, préalablement repliées et/ou oligomériques depuis le périplasme vers le milieu extérieur via un mécanisme de type piston. Ce système utilise le système Tat lorsqu'un repliement cytoplasmique est requis et le système Sec lorsque le repliement se fait dans le périplasme (Pugsley, 1993; Voulhoux *et al.*, 2001).

Le système de sécrétion de type IV présente une grande variété de fonctions et permet le transport de protéines monomériques et multimériques, des complexes nucléoprotéiques et d'ADN (Rêgo *et al.*, 2010). Le transfert de protéines par voie de sécrétion de type IV est le plus souvent retrouvé chez les bactéries pathogènes. Ce système leur permet d'établir une relation hôte-pathogène d'interaction et/ou de transfert de protéines effectrices toxiques ou de complexes protéiques directement dans le cytoplasme de l'hôte (Alvarez-Martinez and Christie, 2009).

Le système de sécrétion de type III est souvent associé à des rôles essentiels dans la pathogénicité. En effet, il permet l'injection directement dans le cytosol de l'hôte de protéines effectrices (Rosqvist *et al.*, 1991; Sory and Cornelis, 1994; Rosqvist *et al.*, 1995; Cornelis and Wolf-Watz, 1997). Le système de sécrétion de type III est un complexe qui comprend plus de 20 composants. Le corps basal de ce système qui s'étend au travers de toute l'enveloppe bactérienne est associé à un appendice extracellulaire de type aiguille. Ce dernier permet le transport des protéines sécrétées vers l'interface hôte-pathogène. La translocation dans la cellule hôte eucaryote est probablement réalisée par un translocon bactérien formant un canal. Le système de sécrétion de type III fait également référence au système flagellaire, important organelle pour la mobilité des bactéries. Le flagelle est connecté au corps basal du système de type III par des protéines formant un coude ou crochet.

Le système de sécrétion de type V est Sec-dépendant et inclut cinq types de systèmes dont les plus connus sont les autotransporteurs ou type Va et les systèmes de sécrétion à deux partenaires ou type Vb (Leo *et al.*, 2012). Ces deux systèmes sont dévolus à la translocation au travers de la membrane externe de grandes protéines (1500 à 5000 acides aminés) essentiellement liées à la virulence. Ces systèmes seront décrits plus en détails dans le point suivant.

Le système de sécrétion de type VI, récemment décrit, est largement présent chez les bactéries à Gram-négatif et plus particulièrement chez les protéobactéries (Bingle *et al.*, 2008; Cascales, 2008; Boyer *et al.*, 2009). Ces systèmes de sécrétion sont dédiés à la virulence dirigée contre des cellules hôtes eucaryotes ainsi qu'à la régulation des interactions entre bactéries et à la compétition bactérienne (Schwarz, West, *et al.*, 2010; Hood *et al.*, 2010; Jani and Cotter, 2010; MacIntyre *et al.*, 2010; Schwarz, Hood, *et al.*, 2010; Russell *et al.*, 2011; Murdoch *et al.*, 2011). Le système de sécrétion de type VI est requis pour tuer les bactéries avoisinantes non-immunisées par la sécrétion de protéines antibactériennes directement dans leur cytoplasme grâce à un contact cellule-cellule (Hood *et al.*, 2010; Russell *et al.*, 2011). De nombreux composants du corps du système de sécrétion de type VI présentent des similarités structurales avec des protéines de bactériophages (Cascales and Cambillau, 2012).

3. Système de sécrétion de type V

3.1. Diversité des systèmes de sécrétion de type V

Comme indiqué précédemment, le système de sécrétion de type V inclut cinq types de systèmes de sécrétion : le système Va ou système autotransporteur classique ou monomérique, le système Vb ou système de sécrétion à deux partenaires (détaillé au point 3.2), le système Vc ou système autotransporteur trimérique et les systèmes Vd et Ve. Ces systèmes de sécrétion de type V, qui sont Sec-dépendants, ont en commun la présence d'un domaine en tonneau β qui s'insère dans la membrane externe et qui participe à la sécrétion d'un domaine passager ou d'une protéine passagère (Leo *et al.*, 2012; Grijpstra *et al.*, 2013). La traversée du périplasma est assistée par les chaperonnes périplasmiques SurA, Skp et DegP (Grosskinsky *et al.*, 2007; Ruiz-Perez *et al.*, 2009). Le complexe d'assemblage de tonneau β ou complexe BAM (*β -barrel assembly machinery*) est crucial pour la biogenèse des ATs (Knowles *et al.*, 2009; Lehr *et al.*, 2010) et l'implication de BamA (nommée antérieurement Omp85 chez *N. meningitidis* et YaeT chez *E. coli*) dans l'insertion en membrane a été démontrée (Jain and Goldberg, 2007; Ieva and Bernstein, 2009; Sauri *et al.*, 2009) (Figure 10).

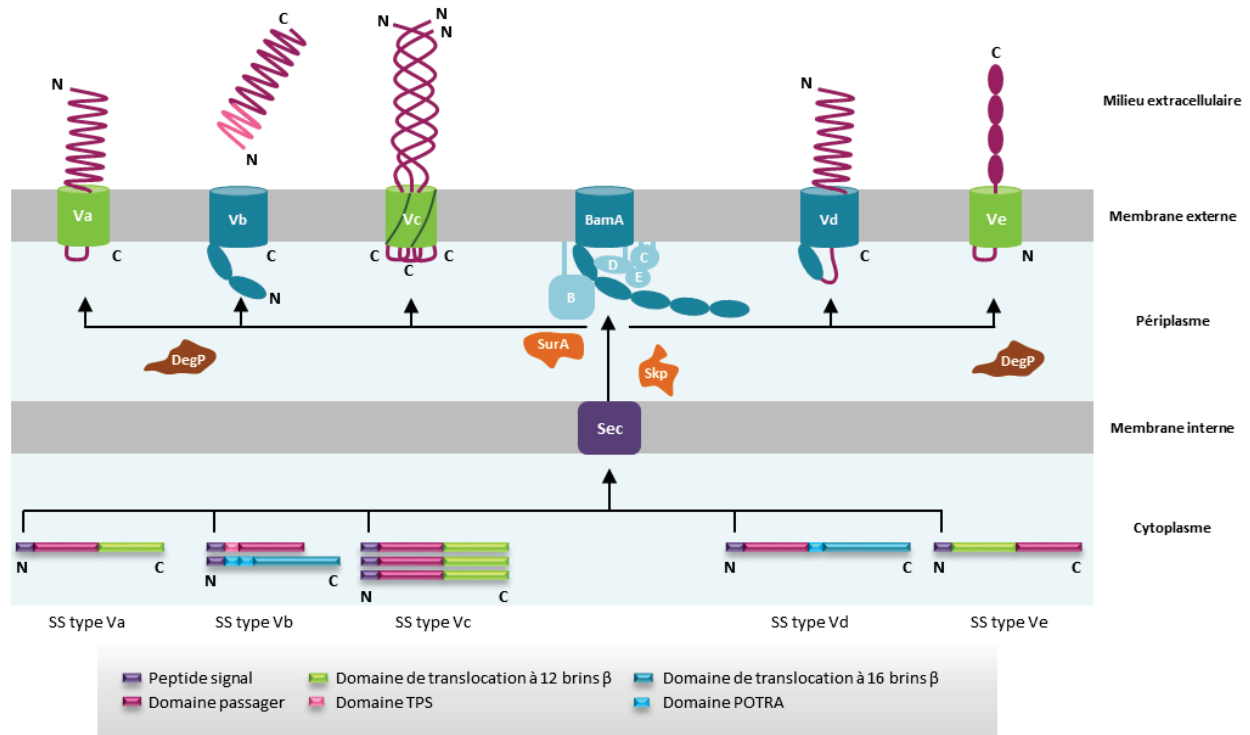


Figure 10. Schéma des différents systèmes de sécrétion de type V (SS type V). Les systèmes de sécrétion de type V sont Sec-dépendants et leurs protéines sont par conséquent porteuses d'un peptide signal N-terminal. Ces systèmes ont en commun un domaine de translocation en tonneau β à 12 (en vert) ou 16 (en bleu) brins β. L'insertion de ce tonneau est facilitée par le complexe BAM. Les domaines de translocation peuvent comprendre des domaines périplasmiques de type POTRA également présents chez BamA du complexe BAM. L'ordre dans lequel sont encodés les domaines de translocation et les domaines passagers varie en fonction des systèmes. Ces systèmes peuvent être trimériques (cas du SS type Vc) ou monomériques (autres cas). Une protéine des SS type V comprend le peptide signal, le domaine passager et le domaine de translocation sauf dans le cas des SS type Vb où l'encodage de ces deux domaines est réalisé par deux protéines distinctes et où la protéine passagère est précédée d'un domaine de reconnaissance, le domaine TPS, pour la protéine de translocation. Figure inspirée de (Grijpstra *et al.*, 2013)

3.1.1. Système de sécrétion de type Va : les autotransporteurs

Les autotransporteurs (ATs) monomériques ou autotransporteurs classiques (système de sécrétion Va) sont des protéines modulaires composées, de l'extrémité N-terminale à la C-terminale, d'un peptide signal, d'un domaine passager et d'un domaine de translocation.

Le domaine passager constitue le domaine fonctionnel de la protéine. Les unités de translocation de structure connue ont toutes une structure en tonneau β à 12 brins inséré dans la membrane externe (Oomen *et al.*, 2004; Barnard *et al.*, 2007; van den Berg, 2010; Tajima *et al.*, 2010; Zhai *et al.*, 2011). Cette unité de translocation permet le passage du domaine passager au travers de la membrane de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale. Le repliement du domaine passager se réalise au fur et mesure qu'il est sécrété (Pohlner *et al.*, 1987; Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004; Henderson *et al.*, 2004; van den Berg, 2010). Il est fort probable que le repliement progressif du domaine passager constitue le moteur de sa propre translocation (Peterson *et al.*, 2010). La plupart des ATs de type Va

sont des protéases autocatalytiques ce qui leur permet de relâcher le domaine passager dans le milieu extracellulaire (Leo *et al.*, 2012).

3.1.2. Système de sécrétion de type Vc : les autotransporteurs trimériques

Les autotransporteurs (ATs) trimériques sont généralement des adhésines (TAA pour *trimeric autotransporter adhesins*) dont le domaine passager reste ancré au tonneau β (Linke *et al.*, 2006). Les ATs trimériques ont une architecture modulaire semblable à celle des ATs monomériques (SS type Va) mais dont les domaines passagers et de translocation sont capables de se trimériser (Szczyzny and Lupas, 2008).

Le tonneau β du domaine de translocation des TAA est formé à partir de trois chaînes polypeptidiques. Chacune d'entre elles contribue à la formation de 4 des 12 brins β du tonneau (Figure 8, structure cristallographique de l'autotransporteur trimérique Hia) (Hoiczky *et al.*, 2000; Linke *et al.*, 2006; Wollmann *et al.*, 2006).

3.1.3. Système de sécrétion de type Vd

Un nouveau type d'autotransporteur (AT) a récemment été décrit, le système de sécrétion de type Vd. Le prototype de ce système est PlpD, la protéine *patatin-like* de *Pseudomonas aeruginosa* (Salacha *et al.*, 2010). Le domaine passager de PlpD est clivé de manière autocatalytique après sa complète translocation comme chez les ATs classiques (Va). La particularité du système Vd est la présence d'un domaine POTRA (*polypeptide-transport-associated domain*) entre le domaine passager et le domaine de translocation en tonneau β . Ce type de domaine est retrouvé chez les protéines de la superfamille BamA/TpsB (voir point 3.2.5). Les domaines POTRA de BamA du complexe BAM sont impliqués dans l'interaction avec son substrat initiant le mécanisme d'insertion en membrane du substrat. Dans le cas de PlpD, cette fonction serait remplie par son domaine POTRA intrinsèque. Le tonneau β de PlpD a également pour particularité de comprendre 16 brins β contrairement aux autres systèmes ATs qui en ont 12 (Salacha *et al.*, 2010).

3.1.4. Système de sécrétion de type Ve

Le système de sécrétion de type Ve regroupe l'intimine d'*E. coli* et l'invasine des espèces entéropathiques *Yersinia* spp. qui sont des adhésines avec des domaines immunoglobulines (Ig) ancrées dans la membrane externe (Liu *et al.*, 1999; Leo *et al.*, 2012). Ces protéines modulaires sont des ATs inversés où le tonneau β à 12 brins β du domaine de translocation est N-terminal tandis que le domaine passager, qui adopte un repliement de type immunoglobuline, est C-terminal (Tsai *et al.*, 2010; Leo *et al.*, 2012; Fairman *et al.*, 2012).

3.2. Système de sécrétion à deux partenaires ou de type Vb

C'est en 2001 qu'apparaît le terme de systèmes de sécrétion à deux partenaires ou système TPS (*two-partner secretion system*) (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001). Peu après, la voie des TPS est intégrée au système de sécrétion de type V en parallèle de la voie des autotransporteurs (ATs) (Henderson *et al.*, 2004). Ce regroupement sous le type V a été basé sur diverses propriétés communes au système TPS et au système des ATs dont celles de la translocation au travers de la membrane externe via un tonneau β , de la sécrétion de grandes protéines ou encore de la transition par le périplasma suggérée en conformation dépliée (Guédin *et al.*, 1998; Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001). De plus, les systèmes TPS et ATs sont tous deux dépendants de transporteurs appartenant à la superfamille de BamA/TpsB (Sánchez-Pulido *et al.*, 2003; Jain and Goldberg, 2007; Ieva and Bernstein, 2009; Sauri *et al.*, 2009).

Depuis ce regroupement, des centaines de systèmes TPS ont été identifiés. Le système TPS est largement répandu au sein des bactéries à Gram-négatif et particulièrement chez les pathogènes. Ce système leur permet de sécréter des facteurs de virulence tels que des cytolysines comme HpmA de *Proteus mirabilis* (Uphoff and Welch, 1990) ou ShlA de *Serratia marcescens* (Hertle, 2000), des adhésines comme FHA de *Bordetella pertussis* (Locht *et al.*, 1993) ou HMW1A de *Haemophilus influenzae* (St Geme *et al.*, 1993), ou encore, des protéines liant l'hémopexine comme HxuA de *Haemophilus influenzae* (Cope *et al.*, 1994; Cope *et al.*, 1998).

3.2.1. Principe général du système de sécrétion à deux partenaires

Le système de sécrétion à deux partenaires est constitué d'une protéine sécrétée ou TpsA, qui confère la fonction effectrice au système TPS, et de son transporteur spécifique ou TpsB qui est une protéine en tonneau β intégrée dans la membrane externe (Figure 11). Contrairement aux ATs, les deux composants sont encodés séparément et sont souvent présents sous forme d'opéron (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001). Le TpsA et son TpsB sont produits dans le cytoplasme avec à leur extrémité N-terminale un peptide signal. Ce dernier sera clivé après leur transport au travers de la membrane interne via la voie de translocation Sec (Braun *et al.*, 1992; Grass and St Geme, 2000; Chevalier *et al.*, 2004). Une fois dans le périplasma, la protéine TpsB transite vers la membrane externe dans laquelle elle s'intègre sous la forme d'un tonneau β à 16 brins transmembranaires antiparallèles (Könninger *et al.*, 1999; Guédin *et al.*, 2000; Clantin *et al.*, 2007). La protéine TpsA transite dans le périplasma maintenue sous forme étirée grâce à l'intervention de chaperonnes périplasmiques comme cela a été démontré pour la protéine TpsA FHA et la chaperonne DegP (Baud *et al.*, 2009). En effet, FhaC, la protéine TpsB de FHA, reconnaît FHA uniquement lorsque cette dernière est dans une conformation

étirée, non-native (Hodak *et al.*, 2006). Grâce à son domaine TPS, un domaine conservé constitué approximativement des 250 premiers résidus N-terminaux de la protéine mature, la TpsA interagit avec le domaine périplasmique du TpsB (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001; Clantin *et al.*, 2004; Hodak *et al.*, 2006). Le domaine périplasmique du TpsB comprend deux domaines POTRA. Cette interaction initie la sécrétion de la protéine TpsA au travers du pore du TpsB et le repliement progressif du TpsA. Dans certains systèmes TPS, une maturation protéolytique du TpsA et/ou son relargage depuis la surface bactérienne a/ont lieu (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004).

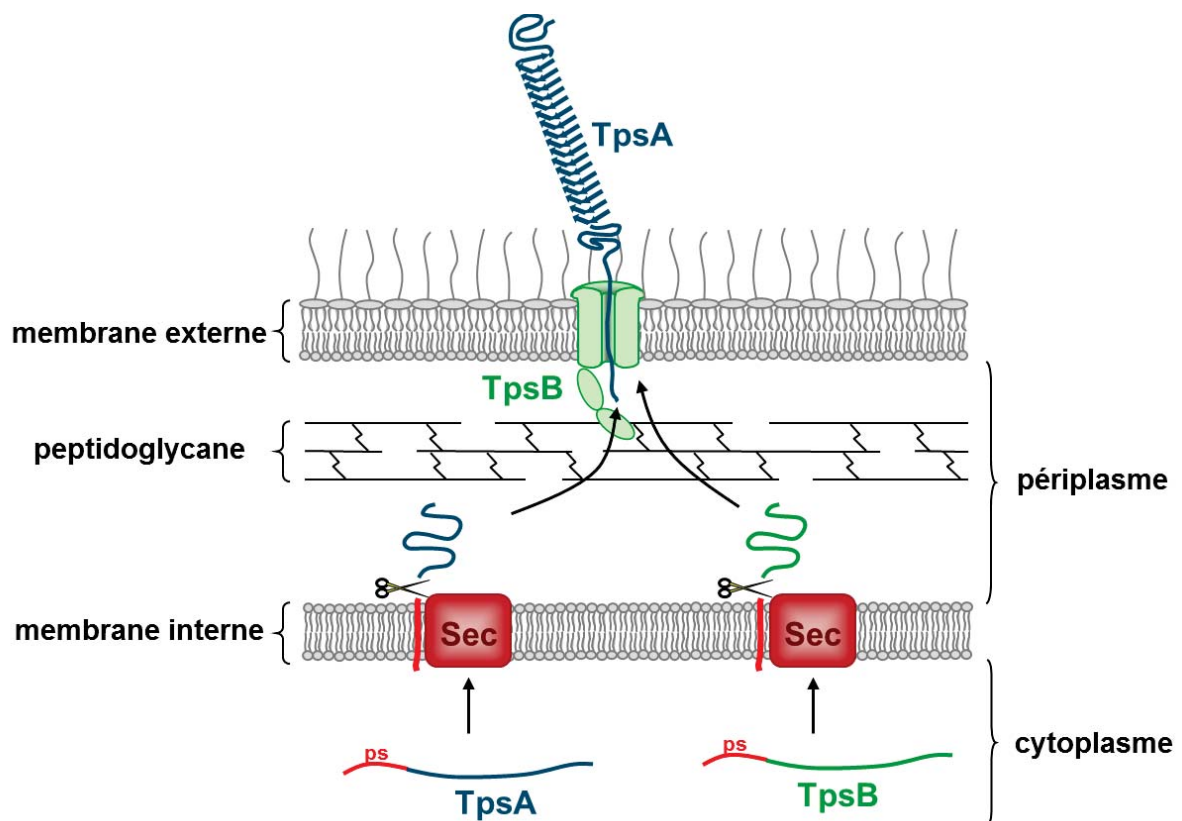


Figure 11. Modèle de système de sécrétion à deux partenaires (Vb). Les protéines TpsA (bleu) et TpsB (vert) sont exprimées dans le cytoplasme. Elles traversent la membrane interne par la voie Sec. Au cours de cette translocation, leur peptide signal (ps) est clivé. Une fois inséré dans la membrane externe, le TpsB réalise la translocation du TpsA qui se replie progressivement à la surface de la bactérie.

3.2.2. Les sous-familles des systèmes TPS

Les systèmes TPS sont subdivisés en deux sous-familles portant les noms des couples TpsA/TpsB des systèmes les plus étudiés. La première sous-famille est la sous-famille FHA/FhaC de *Bordetella pertussis* et la seconde sous-famille est celle de HMW1A/HMW1B de *Haemophilus influenzae*. Cette subdivision a été mise en évidence pour les TpsA par des alignements de séquences du domaine TPS (Yeo *et al.*, 2007). Pour les TpsB, cette même subdivision a été mise en évidence par des alignements de séquences des deux domaines POTRA et d'un motif conservé, dit motif 3, appartenant au tonneau

β (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2009). Les alignements de séquences sont disponibles en annexe (Figure 74, Figure 75).

3.2.3. Les protéines TpsA

Les protéines TpsA comprennent un peptide signal suivi de deux régions (Figure 12). La première est le domaine TPS qui comprend environ 250 résidus. Ce domaine conservé parmi les protéines TpsA est nécessaire à la sécrétion (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1997; Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001) et est à l'origine de l'interaction spécifique entre le TpsA et son partenaire membranaire TpsB (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001; Clantin *et al.*, 2004; Hodak *et al.*, 2006). Le domaine TPS comporte des motifs conservés. Le premier, le motif NPNGI, est conservé dans l'ensemble des protéines TpsA tandis que le second, le motif NPNL, est uniquement présent chez les TpsA de la sous-famille de FHA.

A la suite du domaine TPS se trouve la région du domaine fonctionnel qui est peu conservé en séquence et est de taille très variable d'une protéine à l'autre allant d'environ 700 résidus jusqu'à plus de 5000 résidus parmi lesquels peuvent se trouver des répétitions en tandem (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001).

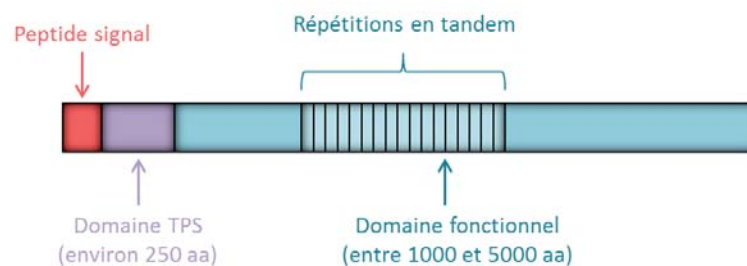


Figure 12. Schéma de l'architecture d'une protéine TpsA. Sont représentés en rouge le peptide signal, en violet le domaine TPS et en bleu le domaine fonctionnel avec ses éventuelles répétitions en tandem (hachure) (aa, acides aminés).

Avant les publications de structures cristallographiques de TpsA, deux modélisations de FHA ont été publiées sur base d'analyse de séquence, de microscopie électronique et de dichroïsme circulaire (Figure 13). La protéine FHA est une hémagglutinine filamenteuse de *Bordetella pertussis*. Dans les deux modèles, deux régions de répétition en tandem de 19 résidus (R1 et R2) avaient été décrites. Le premier modèle est celui d'une *hairpin* modélisée par deux longs feuillets β antiparallèles (Makhov *et al.*, 1994) et le second est une hélice β constituée de trois longs feuillets β parallèles (Kajava *et al.*, 2001).

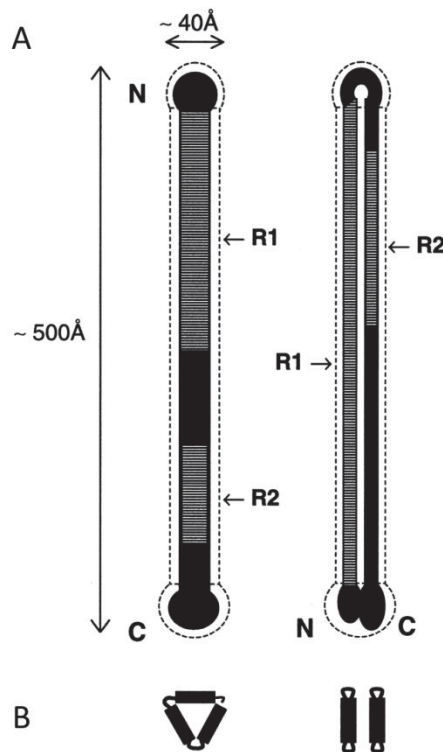


Figure 13. (A) Représentation schématique des deux modèles pour FHA : le modèle en hélice β (à gauche) et le modèle en hairpin (à droite). Les extrémités N- et C-terminales ainsi que les régions de répétition en tandem (R1 et R2) sont indiquées. **(B) Sections transversales des deux modèles** où les brins β sont représentés par des barres connectées entre elles par les boucles. Illustration de (Kajava *et al.*, 2001).

La publication de la structure cristallographique du domaine TPS de FHA, nommé Fha30, en 2004 a démontré la validité du second modèle décrit par Andrey V. Kajava. Ce modèle décrivait également qu'à chaque répétition en tandem des régions R1 et R2 de FHA correspondait un tour d'hélice β . La structure de Fha30 comprend les deux premiers tours d'hélice β de la région R1 et confirme l'hypothèse de la modélisation (Kajava *et al.*, 2001; Clantin *et al.*, 2004). A la suite de la résolution de cette première structure de TpsA, les structures cristallographiques de deux autres domaines TPS ont été publiées : celle de HMW1A de *Haemophilus influenzae* en 2007 (Yeo *et al.*, 2007) et celle de HpmA de *Proteus mirabilis* en 2009 (Weaver *et al.*, 2009) (Figure 14).

HMW1A, pour *high molecular weight*, est une adhésine non pilus de *Haemophilus influenzae* (Barenkamp and Leininger, 1992). Le domaine TPS de HMW1A est compris dans le domaine N-terminal, nommé HMW1A-*propiece* (HMW1A-PP), qui a la particularité d'être clivé et relâché dans le milieu extérieur après sécrétion. C'est ce domaine HMW1A-PP qui a été cristallisé. La protéine mature de HMW1A portant la fonction d'adhésine est maintenue à la surface bactérienne par son extrémité C-terminale comprenant deux cystéines formant un pont disulfure (Grass and St Geme, 2000; Grass *et al.*, 2003; Buscher *et al.*, 2006). Contrairement à FHA, HMW1A appartient à la 2^{de} sous-famille de TpsA (Yeo *et al.*, 2007).

HpmA est une hémolysine de *Proteus mirabilis* (Weaver *et al.*, 2009) et appartient, comme FHA, à la 1^{ière} sous-famille de TpsA (Yeo *et al.*, 2007).

Les trois domaines TPS ont une structure en hélice β main droite constituée de trois feuillets β parallèles ; PB1, PB2 et PB3 pour *parallel* β *sheet* (Figure 14). Ces feuillets constituent 9, 6 et 12 tours d'hélice pour Fha30, HpmA265 et HMW1A-PP respectivement. L'extrémité N-terminale des hélices est protégée par des brins β antiparallèles ; deux dans le cas de HpmA265 et trois dans les autres cas. Ces structures présentent également des motifs extra-hélices. Un premier motif est constitué de 4 brins β antiparallèles pour Fha30 (β 16/ β 25) et HpmA265 (β 14/ β 22) et de 3 brins β antiparallèles et d'une hélice α chez HMW1A-PP (β 15/ β 23). Ce motif se place à flan du PB1. Un second motif extra-hélice comprenant deux brins β antiparallèles est observé. Il a pour particularité de comprendre la tétrade conservée NP \underline{N} L propre à la 1^{ière} sous-famille, celle de FHA. Il est intéressant de noter que la mutation ponctuelle en isoleucine de la première asparagine de la tétrade NPNL annihile la fonction de sécrétion dans le système FHA/FhaC (Hodak *et al.*, 2006). Le motif extra-hélice associé à la tétrade conservée NP \underline{N} L n'est présent que dans les structures de Fha30 (β 7/ β 8) et HpmA265 (β 5/ β 6). Un autre motif conservé, NPNGI, constitue un tournant ou *turn* entre deux brins β parallèles au sein des trois structures de domaine TPS connues (Clantin *et al.*, 2004; Yeo *et al.*, 2007; Weaver *et al.*, 2009).

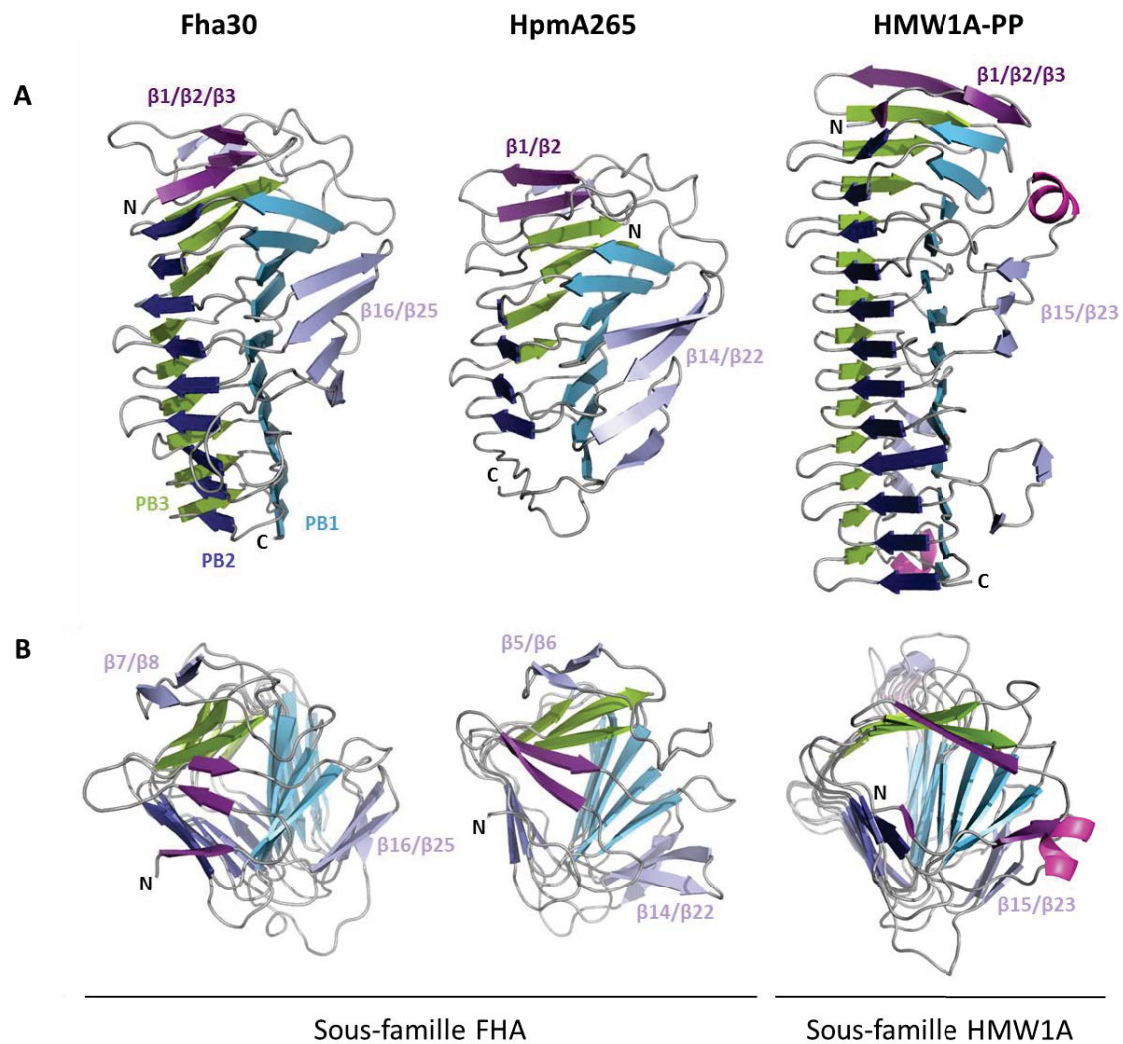


Figure 14. Structures cristallographiques des domaines TPS de FHA, HpmA et HMW1A : Fha30 (code PDB : 1RWR), HpmA265 (code PDB : 3FY3) et HMW1A-PP (code PDB : 2ODL). Représentation en ruban des structures des domaines TPS vue de côté avec l'extrémité N-terminale en haut (A) et vue du dessus de l'extrémité N-terminale (B). Les extrémités N- et C-terminales sont indiquées. Les trois feuillets β parallèles PB1, PB2 et PB3 sont annotés pour Fha30, le code couleur restant le même pour les autres structures. A l'extrémité N-terminale, les brins β antiparallèles protégeant l'hélice β sont colorés en violet foncé. Les motifs extra-hélices de brins β antiparallèles $\beta 16/\beta 25$, $\beta 14/\beta 22$ et $\beta 15/\beta 23$ de Fha30, HpmA265 et HMW1A-PP respectivement sont indiqués. Le motif extra-hélice comprenant le motif NPNL, conservé au sein de la sous-famille de FHA, est indiqué pour Fha30 ($\beta 7/\beta 8$) et HpmA265 ($\beta 5/\beta 6$).

Les domaines TPS de ces trois protéines présentent une structure cristallographique proche malgré des pourcentages limités d'identité de séquence : 35,9% d'identité de séquence entre Fha30 et HpmA265, 28,6% d'identité de séquence entre HpmA265 et HMW1A-PP et 21% d'identité de séquence entre HMW1A-PP et Fha30 (Yeo *et al.*, 2007; Weaver *et al.*, 2009). Les sections transversales des hélices β de ces trois protéines sont de taille et de forme identique (Figure 15).

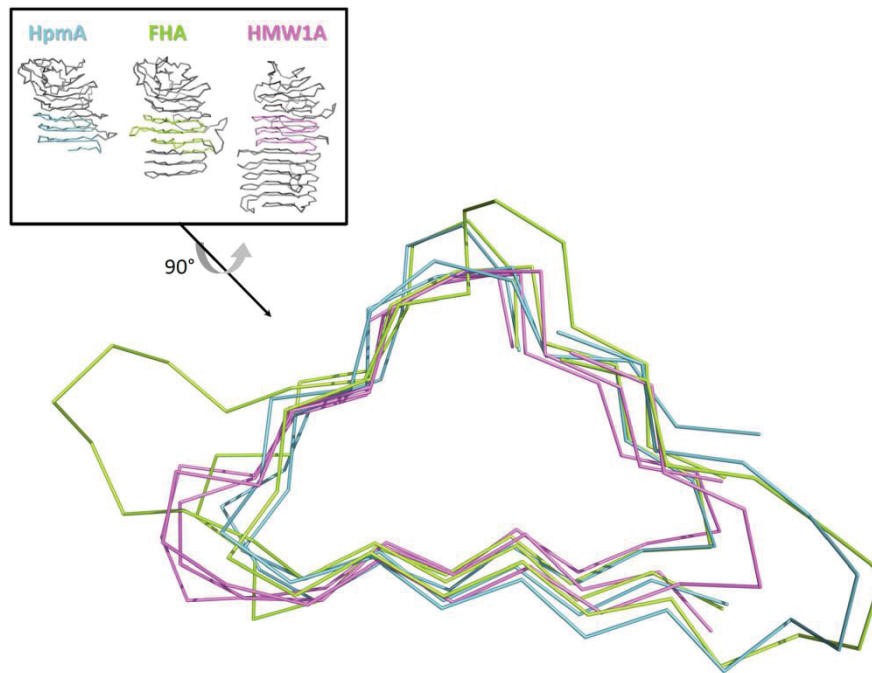


Figure 15. Superposition de trois tours d'hélice des domaines TPS des protéines TpsA HpmA (en bleu), FHA (en vert) et HMW1A (en rose). Les éléments structuraux extra-hélices ont été ôtés pour plus de clarté. Puisque HpmA265, Fha30 et HMW1A-PP comprennent, 6, 9 et 12 tours d'hélice respectivement, leurs longueurs diffèrent considérablement mais leurs sections sont de taille et de forme similaires. L'encadré dans le coin gauche montre les portions des hélices β utilisées pour la superposition (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2013).

Ainsi, les domaines TPS présentent une structure en hélice β . Et, comme observé pour FHA, chaque répétition en tandem constitue un tour d'hélice β . Or ces répétitions sont majoritaires chez les TpsA. Il est donc fort probable que les protéines TpsA aient une structure de type grande hélice β .

3.2.4. Les protéines TpsB

Le transporteur FhaC sert de modèle pour les TpsB. Il est à l'heure actuelle le seul TpsB dont la structure cristallographique ait été résolue (Figure 16) (Clantin *et al.*, 2007). FhaC est le transporteur spécifique de l'hémagglutinine filamenteuse FHA, l'adhésine majeure de *Bordetella pertussis*, l'agent infectieux à l'origine de la coqueluche.

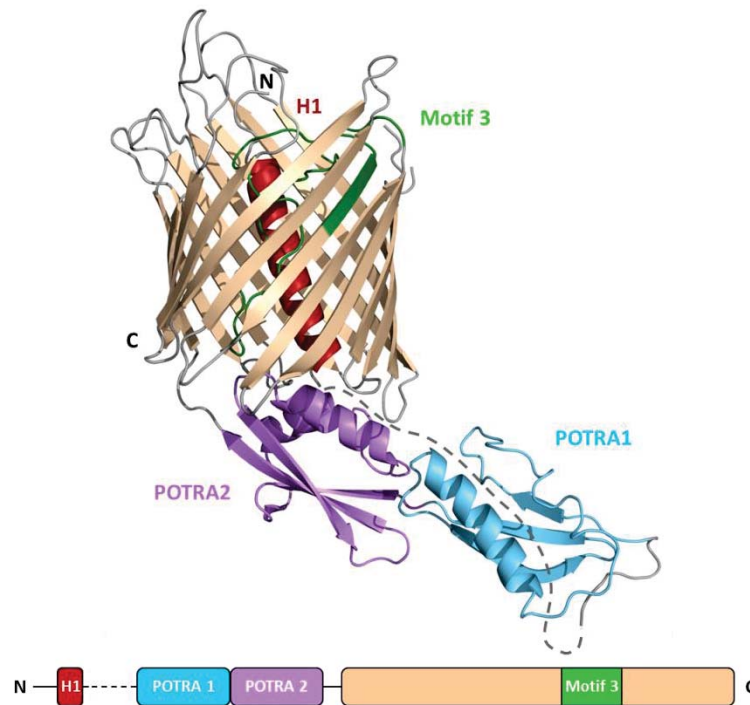


Figure 16. Structure cristallographique de FhaC et schéma de la protéine. Représentation en ruban de la structure de FhaC vue dans le plan de la membrane externe où le milieu externe est en haut et le périplasma en bas. Les extrémités N- et C-terminales sont annotées. L'hélice α H1 qui obstrue le pore, est colorée en rouge. Le linker reliant l'hélice α H1 au POTRA1 n'étant pas défini en densité électronique est représenté par un pointillé gris. Le domaine périplasmique comprend le POTRA1 en bleu clair et le POTRA2 en violet. Le motif 3 conservé, représenté en vert, comprend une longue boucle qui s'insère dans le pore du tonneau β , la boucle L6.

La protéine est monomérique et comporte un tonneau β à 16 brins β transmembranaires antiparallèles ($\beta 1$ à $\beta 16$) d'une hauteur de 35 Å. Le tonneau β constitue la moitié C-terminale de la protéine. Les faces périplasmiques et extracellulaires du tonneau sont respectivement caractérisées par des boucles courtes ou *turns* et par des longues boucles ou *loops* (L1 à L8) annotées suivant un modèle topologique antérieur (Guédin *et al.*, 2000).

L'extrémité N-terminale de la protéine est exposée au milieu extracellulaire et est suivie de l'hélice α H1 constituée de 20 résidus dont 12 sont chargés, 6 positivement et 6 négativement, et qui se place dans le canal du tonneau β . L'extrémité C-terminale de l'hélice émerge dans le périplasma et est liée au premier domaine POTRA par un *linker* de 30 résidus. Celui-ci n'est pas défini dans la densité électronique (représenté en pointillé dans la figure).

Le domaine périplasmique est constitué des domaines POTRA1 et POTRA2 comprenant environ 75 résidus chacun. La présence du domaine POTRA1 avait été prédite *in silico* sur base d'analyse de séquences de protéines de la superfamille BamA/TpsB (Sánchez-Pulido *et al.*, 2003). Les domaines POTRA sont repliés en un feuillet à 3 brins β additionné d'une ou deux hélice(s) α , H2 pour le POTRA1 et H3-H4 pour le POTRA2. Bien que structurellement conservés, ces deux domaines POTRA ne partagent que 14% d'identité de séquence. Les résidus constituant la signature des domaines POTRA

sont soit impliqués dans le cœur hydrophobe, sous forme de brins β et d'hélices α , soit sont des glycines positionnées entre ces éléments de structure secondaire. La contribution de ces résidus signature est donc essentiellement structurale. La surface des domaines POTRA est constituée de résidus peu conservés probablement liés à la spécificité entre un TpsA et son TpsB. Cette spécificité est en effet liée à leurs surfaces d'interaction (Clantin *et al.*, 2007).

A la suite des domaines POTRA se trouve le domaine en tonneau β . L'intérieur de ce tonneau, globalement hydrophile, comprend trois clusters de résidus chargés et est obstrué par l'hélice α H1 et la boucle extracellulaire L6. Cette boucle dont l'extrémité comprend une tétrade conservée VRGY/F, est mal définie dans la carte de densité électronique. Il est suggéré que le canal formé par le tonneau β constitue le pore de translocation de FHA. En effet, une corrélation existe entre les propriétés de canal et les propriétés de sécrétion de la protéine FhaC : lorsqu'une mutation affecte les premières, elle affecte aussi les secondes (Méli *et al.*, 2006). La présence de l'hélice α H1 et de la boucle L6 dans le pore du tonneau β ne laisse qu'un passage étroit d'environ 3 Å (Figure 17). Cet espace est insuffisant pour permettre le passage de FHA en conformation native ou même en conformation étendue. Le passage de FHA par le pore de FhaC nécessiterait que l'hélice α H1 et/ou la boucle L6 sorte(nt) du pore augmentant ainsi le diamètre moyen du pore. Cette hypothèse s'appuie sur différents faits. La délétion de l'hélice α H1 n'affecte pas la sécrétion de FHA. En présence de son substrat, la boucle L6 de FhaC présenterait un changement de conformation qui la rendrait plus accessible depuis le milieu extérieur. La délétion de cette boucle abolit la sécrétion de FHA (Guédin *et al.*, 2000; Clantin *et al.*, 2007).

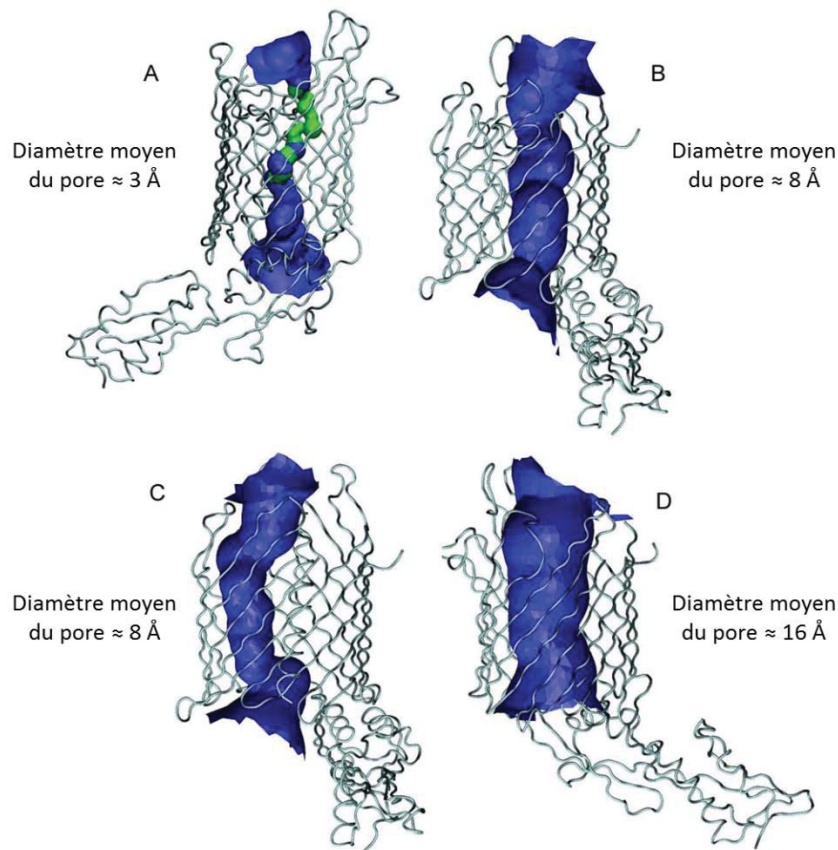


Figure 17. Visualisation des dimensions du pore de FhaC. Les images montrent les surfaces du canal à l'intérieur de la structure tel qu'évaluées par le programme *Hole* (Smart *et al.*, 1993) et visualisées avec le programme *VMD* (Humphrey *et al.*, 1996). L'analyse est réalisée pour la protéine FhaC sauvage (A), la structure de FhaC délétée de l'hélice α H1 (B), la structure de FhaC délétée de la boucle L6 (C) et la structure de FhaC délétée de l'hélice α H1 et de la boucle L6 (D). Les canaux sont illustrés en bleu et les zone de constriction pour FhaC sauvage en vert. Le diamètre moyen du pore a été estimé pour chaque cas de figure. (Clantin *et al.*, 2007)

La boucle L6 ainsi qu'une partie du brin β 12 appartiennent au motif 3 conservé au sein de la superfamille BamA/TpsB (Moslavac *et al.*, 2005).

3.2.5. Superfamille des BamA/TpsB

Les protéines TpsB appartiennent à la superfamille des BamA/TpsB. Les protéines de cette superfamille sont caractérisées par la présence de un à sept domaine(s) POTRA à leur extrémité N-terminale et d'un tonneau β à 16 brins β antiparallèles transmembranaires à leur extrémité C-terminale (Sánchez-Pulido *et al.*, 2003; Arnold *et al.*, 2010). Le tonneau comprend le motif 3, motif conservé comprenant la boucle L6 et sa tétrade conservée VRGY/F (Moslavac *et al.*, 2005). Un second motif conservé F/GxDxG (où x est un résidu hydrophobe) est présent dans le tonneau au niveau du brin β 13 (Figure 18) (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2013).

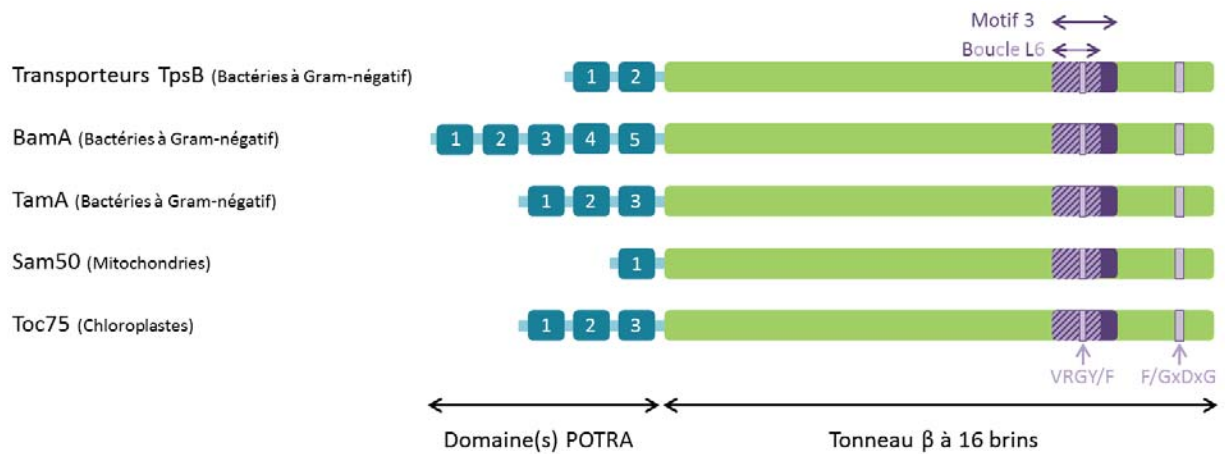


Figure 18. Représentation schématique de quelques membres de la superfamille BamA/TpsB et des domaines qui les composent.

Les protéines de cette superfamille sont représentées au sein de nombreux organismes, tels que les bactéries à Gram-négatif et les eucaryotes au sein des mitochondries et des chloroplastes, et sont impliquées soit dans l'insertion en membrane externe de protéines en tonneau β (OMPs) (Voulhoux *et al.*, 2003; Genevrois *et al.*, 2003; Kozjak *et al.*, 2003; Paschen *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005) soit dans le transport de protéines au travers de la membrane externe (Schnell *et al.*, 1994; Hinnah *et al.*, 1997).

Chez les bactéries à Gram-négatif, elle est représentée par les protéines BamA, TamA et les TpsB. Chez les eucaryotes, elle est représentée par la protéine Sam50 chez les mitochondries et par les protéines Toc75-III et Toc75-V chez les chloroplastes (Yen *et al.*, 2002; Gentle *et al.*, 2004; Selkrig *et al.*, 2012) (Figure 19).

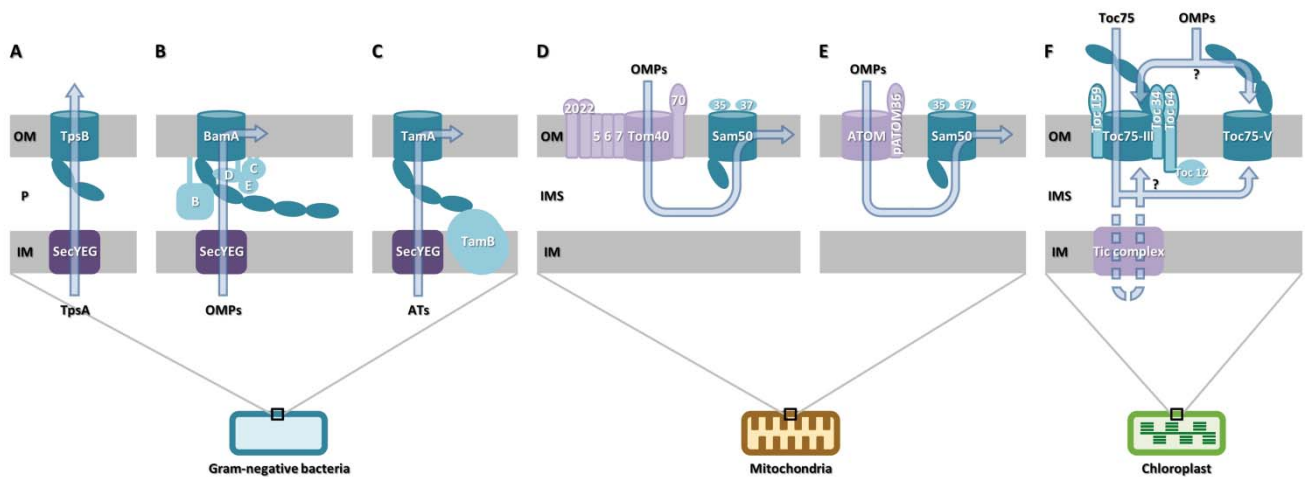


Figure 19. Représentation schématique de la superfamille BamA/TpsB (en bleu foncé) et de leurs fonctions majeures chez les bactéries à Gram-négatif (A-C), chez les mitochondries (D-E) et chez les chloroplastes (F). (A) Système de sécrétion à deux partenaires. Le TpsB sécrète son partenaire TpsA dans le milieu extracellulaire. (B) BamA est le cœur du complexe essentiel BAM (β -Barrel *A*ssembly *M*achinery) responsable de l'intégration en membrane externe des OMPs. (C) Les protéines TamA et TamB constituent le complexe TAM (*T*ranslocation and *A*ssembly *M*odule) impliqué dans le transport et l'assemblage de certains autotransporteurs (ATs). (D) Chez les mitochondries, les pré-protéines sont transportées au travers de la membrane externe par le complexe TOM (*T*ranslocase of the *O*uter *M*embrane). Le complexe SAM (*S*orting and *A*ssembly of *M*itochondria), comprenant la protéine Sam50, est nécessaire à l'insertion en membrane d'OMP en tonneau β et potentiellement de certains composants en hélice α du complexe TOM. (E) Les mitochondries des trypanosomatides ne comprennent pas Tom40. Sa fonction est réalisée par la protéine ATOM (*A*rchaic *T*ranslocase of the *O*uter *M*itochondrial membrane) dont l'origine phylogénétique est sujette à débat. (F) Toc75-III appartient au complexe TOC (*T*ranslocon of the *O*uter membrane of the *C*hloroplasts) et est requis pour la translocation dans les chloroplastes des protéines produites dans le cytosol. La protéine Toc75-V est impliquée dans l'assemblage des OMPs. OM, membrane externe; IM, membrane interne; P, périplasme; IMS, espace intermembranaire; SecYEG, complexe de translocation du système de sécrétion Sec; OMPs, protéines de la membrane externe; ATs, autotransporteurs. (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2013)

La protéine essentielle BamA appartient au complexe BAM (β -Barrel *A*ssembly *M*achinery), la machinerie d'insertion en membrane externe des OMPs (Figure 19-B). Les aspects structuraux et fonctionnels de ce complexe sont discutés un peu plus loin (point 3.2.6). Le complexe TAM, récemment mis en évidence, comprend la protéine intégrale de membrane interne TamB et la protéine intégrale de la membrane externe TamA appartenant à la superfamille BamA/TpsB (Figure 19-C) (Selkig *et al.*, 2012). L'insertion en membrane externe du tonneau β des autotransporteurs (ATs) est assistée par le complexe BAM (Jain and Goldberg, 2007; Ieva *et al.*, 2008; Rossiter *et al.*, 2011; Ieva *et al.*, 2011) et par le complexe TAM (Selkig *et al.*, 2012).

Chez les mitochondries, l'équivalent du complexe BAM est le complexe SAM (*S*orting and *A*ssembly of *M*itochondria) aussi appelé complexe TOB (*T*opogenesis of the *O*uter mitochondrial membrane β -*B*arrel proteins) (Figure 19-D-E) (Kozjak *et al.*, 2003; Paschen *et al.*, 2003). Ce complexe insère dans la membrane externe des mitochondries les protéines en tonneau β (Wiedemann *et al.*, 2003; Paschen *et al.*, 2003; Hoppins *et al.*, 2007) et serait aussi impliqué dans l'assemblage de composants en hélice α du complexe TOM (*T*ranslocase of the *O*uter *M*embrane) (Hoppins *et al.*, 2007; Stojanovski *et al.*, 2007; Thornton *et al.*, 2010). Le complexe TOM transporte les pré-protéines en tonneau β

synthétisées dans le cytosol au travers de la membrane externe de la mitochondrie vers l'espace intermembranaire. Les pré-protéines entrent en interaction avec le complexe SAM qui va insérer ces protéines dans la membrane externe. Le complexe SAM est constitué de trois protéines : Sam35 et Sam37, deux protéines cytoplasmiques, et Sam50, protéine de la membrane externe de la superfamille des BamA/TpsB dont l'unique domaine POTRA est orienté vers l'espace intermembranaire (Habib *et al.*, 2007; Lackey *et al.*, 2011; Klein *et al.*, 2012). Le domaine POTRA de Sam50 permettrait l'interaction avec le substrat du complexe (Habib *et al.*, 2007).

Chez les chloroplastes, le système équivalent au complexe SAM des mitochondries est le complexe TOC (*Translocon of the Outer membrane of the Chloroplasts*) (Figure 19-F). Ce complexe TOC comprend deux protéines de la superfamille BamA/TpsB doté de trois domaines POTRA : Toc75-III et Toc75-V (Schleiff and Becker, 2011). Toc75-III fonctionnerait comme un pore de translocation du complexe TOC permettant l'import de pré-protéines du cytosol vers l'espace intermembranaire (Schleiff and Becker, 2011). La protéine Toc75-V permettrait l'insertion des OMPs en membrane externe du chloroplaste (Soll and Schleiff, 2004). La biogenèse des protéines Toc75 semble différer. Contrairement à Toc75-III, Toc75-V suivrait la même voie d'importation vers le chloroplaste que les autres OMPs. Cette voie impliquerait un import vers l'espace intermembranaire suivi d'une insertion en membrane par Toc75-V (Schleiff and Becker, 2011). Les domaines POTRA des protéines Toc75 ne sont pas orientés vers l'espace intermembranaire comme c'est le cas chez la mitochondrie mais vers le cytosol. Les implications mécanistiques de cette orientation restent à élucider (Sommer *et al.*, 2011).

3.2.6. Complexe BAM

Chez les bactéries à Gram-négatif, après la traversée du périplasme les OMPs, dont les TpsB, vont être repliées et intégrées à la membrane externe. Les mécanismes impliqués sont encore peu connus mais il est certain que l'assemblage *in vivo* des OMPs dépend du complexe BAM (Voulhoux *et al.*, 2003; Gentle *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005; Arnold *et al.*, 2010; Haarmann *et al.*, 2010). Chez *E. coli*, le complexe BAM comprend la protéine de membrane externe en tonneau β BamA (anciennement dénommée YaeT chez *E. coli* et dénommée Omp85 chez *Neisseria meningitidis*) et quatre lipoprotéines BamBCDE (anciennement dénommées YfgL, NlpB, YfiO et SmpA respectivement) (Wu *et al.*, 2005; Sklar, Wu, Gronenberg, *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007).

BamA et BamD sont essentielles pour la croissance et très conservées au sein des bactéries à Gram-négatif (Wu *et al.*, 2005; Malinverni *et al.*, 2006). Les lipoprotéines BamB, BamC et BamE ne sont pas essentielles mais leurs délétions impliquent un défaut modéré dans l'assemblage des OMPs (Ruiz *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2005; Malinverni *et al.*, 2006; Sklar, Wu, Gronenberg, *et al.*, 2007). *In vitro*, les

lipoprotéines BamB et BamD sont capables de se lier à du substrat non replié. BamB et BamD sont également capables de se lier à la protéine BamA non repliée ce qui faciliterait son assemblage (Hagan *et al.*, 2013).

La protéine BamA est constituée d'un domaine C-terminal en tonneau β à 16 brins β transmembranaires et d'un domaine périplasmique comprenant cinq domaines POTRA. Les lipoprotéines BamB et BamD sont en association directe avec un ou plusieurs des domaines POTRA de BamA (Kim *et al.*, 2007) tandis que BamC et BamE sont indirectement liées à BamA via leur interaction avec BamD (Figure 19-B) (Malinverni *et al.*, 2006; Sklar, Wu, Gronenberg, *et al.*, 2007). Les domaines POTRA 1 et 2 ne sont pas indispensables au fonctionnement du complexe BAM contrairement aux domaines POTRA 3 à 5 (Kim *et al.*, 2007).

Le fonctionnement exact de BamA dans l'assemblage des OMPs reste à élucider. Toutefois, l'interaction entre les domaines POTRA de BamA et ses substrats se réaliserait par β -augmentation (Kim *et al.*, 2007). Ce type d'interaction consiste en l'ajout d'un brin β , ici issu du peptide d'une OMP, à un feuillet β existant comme ceux des domaines POTRA (Harrison, 1996). En 2007, la première structure de domaines POTRA de BamA d'*E. coli* est publiée. Il s'agit des domaines POTRA 1 à 4 et des 8 premiers résidus du POTRA5. La structure secondaire de ces domaines s'ordonne en β - α - α - β - β (Kim *et al.*, 2007), réfutant une prédiction antérieure (Sánchez-Pulido *et al.*, 2003). Les premier et second brins β forment les bords du feuillet et le troisième brin β est pris en sandwich entre eux. (Kim *et al.*, 2007). D'autres publications de structure de domaines POTRA de BamA suivirent : les POTRA 1 et 2 de BamA d'*E. coli* (Knowles *et al.*, 2008), les POTRA 1 à 4 et quelques résidus du POTRA 5 de BamA d'*E. coli* (Gatzeva-Topalova *et al.*, 2008), les trois domaines POTRA de BamA de *Thermosynechococcus elongatus* (Arnold *et al.*, 2010), les trois domaines POTRA de BamA de la cyanobactérie *Anabaena sp.* (Koenig *et al.*, 2010) et les domaines POTRA 4 et 5 de BamA d'*E. coli* (Zhang *et al.*, 2011).

La comparaison des deux structures des domaines POTRA 1 à 4 de BamA d'*E. coli* (Kim *et al.*, 2007; Gatzeva-Topalova *et al.*, 2008) montre qu'individuellement les domaines POTRA, hormis les POTRA 3, se superposent bien. La valeur du RMSD¹ se situe pour ces POTRA dans une fourchette de 0,6 à 0,8 Å. D'une vue d'ensemble par contre, la structure de Kim et de ses collaborateurs est plus compacte. Cette différence s'explique par l'angle très différent au sein de ces deux structures entre les POTRA2 et 3 (Figure 20) (Gatzeva-Topalova *et al.*, 2008).

¹ RMSD, *root-mean-square-deviation*, est une mesure permettant de décrire le degré de similarité entre deux protéines et équivaut à la mesure de la distance moyenne entre les atomes de carbone- α correspondants de deux protéines superposées.

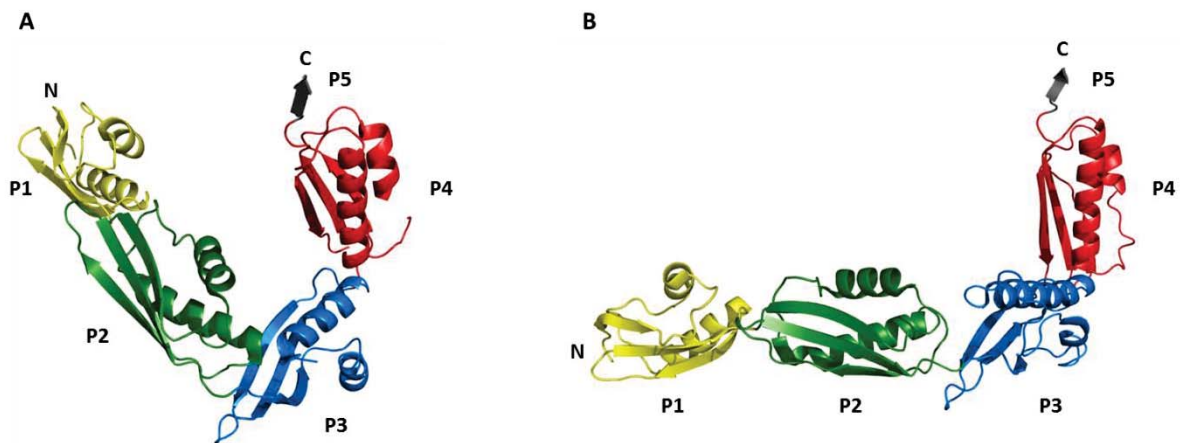


Figure 20. Structure des domaines POTRA 1 à 4 de BamA d'*E. coli*. Représentation en ruban des structures des domaines POTRA 1 à 4 (numérotés P1 à P4) et des premiers résidus du POTRA 5 (P5). Les extrémités N- et C-terminale sont annotées. **(A)** La structure obtenue par Kim *et al.* (code PDB : 2QCZ) et **(B)** celle obtenue par Gatzeva-Topalova *et al.* (code PDB : 3EFC) (Kim *et al.*, 2007; Gatzeva-Topalova *et al.*, 2008).

Dans ces deux structures, le feuillet β du POTRA 3 interagit par β -augmentation avec le brin β du POTRA 5 d'une seconde molécule de BamA malgré des conditions de cristallisation différentes. Cette interaction est parallèle dans un cas (Kim *et al.*, 2007) et antiparallèle dans l'autre (Gatzeva-Topalova *et al.*, 2008) (Figure 21). Une interaction de β -augmentation parallèle a également été observée dans des cristaux de domaines POTRA de BamA de la cyanobactérie *Anabaena sp.* (Koenig *et al.*, 2010).

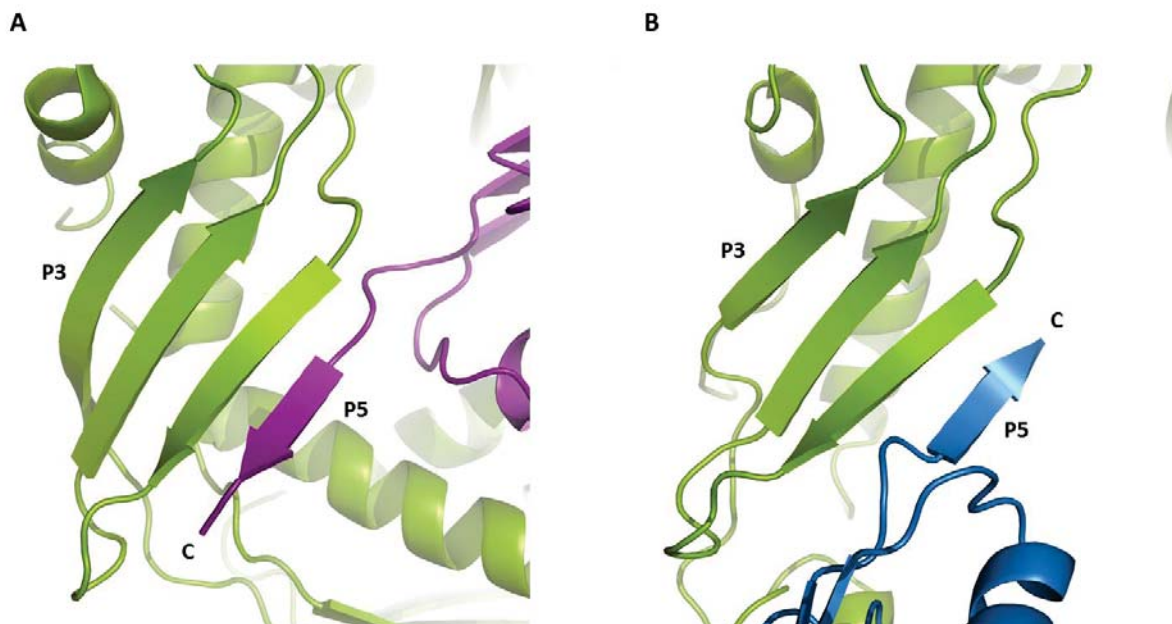


Figure 21. Interaction par β -augmentation au sein de structures de domaines POTRA de BamA d'*E. coli*. **(A)** β -augmentation parallèle entre le feuillet β du POTRA 3 et le brin β du POTRA 5 d'une seconde molécule POTRA 1-4 du cristal (Kim *et al.*, 2007). **(B)** β -augmentation antiparallèle entre le feuillet β du POTRA 3 et du brin β du POTRA 5 d'une autre molécule POTRA 1-4 du cristal (Gatzeva-Topalova *et al.*, 2008). C, extrémité C-terminale ; P3, POTRA3 ; P5, POTRA5.

Ces observations appuient l'hypothèse selon laquelle BamA interagirait avec les brins β amphipatiques des OMPs par β -augmentation (Kim *et al.*, 2007; Gatzeva-Topalova *et al.*, 2008; Koenig *et al.*, 2010).

Contrairement à BamA, à Sam50, à Toc75-III et à Toc75-V, les protéines TpsB ne sont pas essentielles et ne font pas partie de grands complexes protéiques. Dès lors, les protéines TpsB semblent être *a priori* des modèles simples idéaux pour déchiffrer les principes essentiels régissant la superfamille des BamA/TpsB (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2009).

3.2.7. Mécanisme(s) de sécrétion des systèmes TPS

Malgré les connaissances structurales et fonctionnelles, il subsiste des zones d'ombre concernant le mécanisme de sécrétion des systèmes TPS.

3.2.7.1. Interaction TpsA/TpsB

Dans le cas de BamA il a été suggéré que les domaines POTRA interagissent avec leur substrat par β -augmentation (Kim *et al.*, 2007; Gatzeva-Topalova *et al.*, 2008; Koenig *et al.*, 2010). Les protéines TpsB et BamA ont en commun d'avoir des substrats riches en brins β amphipatiques. D'où l'hypothèse que les protéines TpsB interagissent avec leur TpsA par β -augmentation. Dans le cas de système FHA/FhaC, il existe un sillon hydrophobe au sein de chacun des domaines POTRA (Figure 22). Dans le sillon du POTRA2, la double mutation des résidus hydrophobes V169 et I176 de l'hélice H4 en résidus moins hydrophobes abolit l'interaction entre le TpsA et le TpsB ainsi que la sécrétion du TpsA. Or, les chaînes latérales de ces deux résidus sont significativement exposées à la surface les rendant potentiellement disponibles pour interagir avec les brins β amphipatiques de FHA. Ce résultat appuie donc l'hypothèse de l'interaction par β -augmentation entre le TpsA et son TpsB (Delattre *et al.*, 2011).

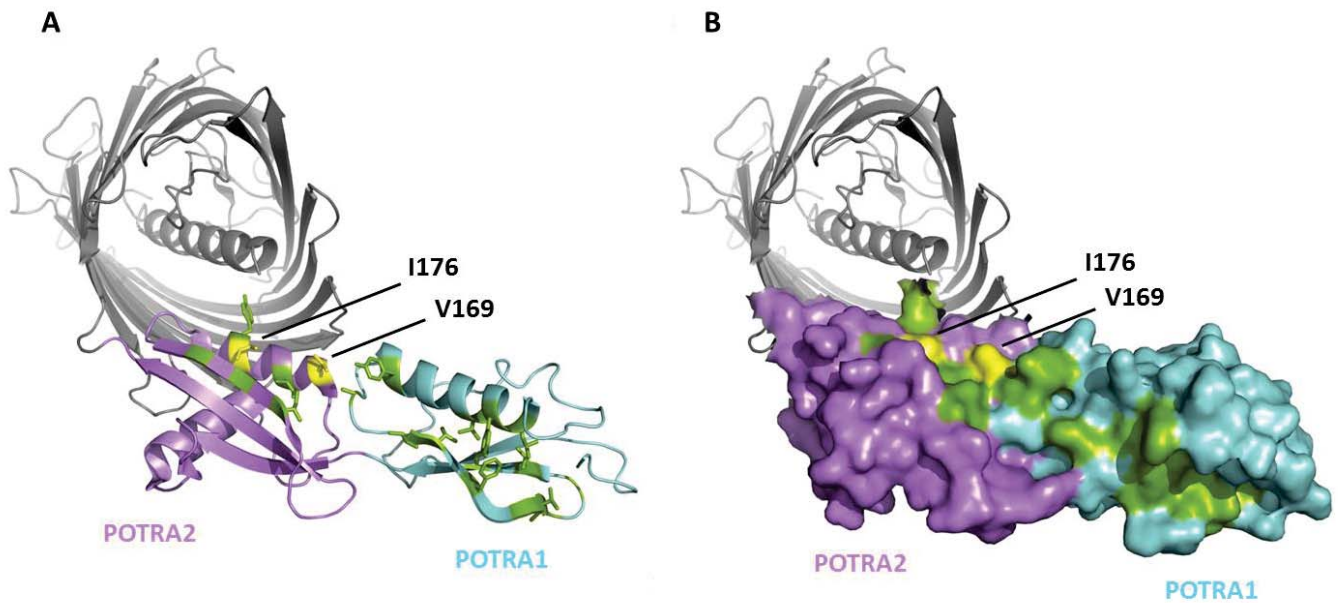


Figure 22. Sillons hydrophobes au sein des domaines POTRA de FhaC (vue depuis le périplasma). (A) Représentation en ruban et en bâtonnet. **(B)** Représentation de la surface des domaines POTRA. Le POTRA1 (en bleu) et le POTRA2 (en violet) comprennent chacun un sillon hydrophobe. Les résidus impliqués dans ces sillons sont représentés en vert ou jaune et sous forme de bâtonnet en (A). La double mutation des résidus V169 et I176 (en jaune) abolit l'interaction entre FhaC et FHA ainsi que la sécrétion de FHA. Illustration inspirée de (Delattre *et al.*, 2011)

3.2.7.2. Translocation de la protéine TpsA au travers du TpsB

Comme mentionné au point 3.2.4 pour le modèle de FhaC, le canal formé par le tonneau β est obstrué par l'hélice α H1 et la boucle L6 (Clantin *et al.*, 2007). L'hélice α H1 n'est pas indispensable à la fonction de sécrétion de FHA et la délétion de cette hélice n'affecte pas les propriétés de canal de FhaC (Guédin *et al.*, 2000; Méli *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'hélice α H1 a pu être détectée dans le périplasma (J. Guérin, données non publiées). La boucle L6 est essentielle à la fonction de sécrétion (Clantin *et al.*, 2007). Un site de clivage protéase-spécifique inséré dans la boucle L6 de FhaC (après le résidu S462) est rendu accessible depuis la surface bactérienne lorsque FHA est coproduit avec FhaC (Guédin *et al.*, 2000). L'hypothèse qui en a découlé est que l'hélice α H1 et la boucle L6 serviraient de bouchon lorsque FhaC est au repos. En présence du substrat FHA, l'hélice α H1 sortirait du pore et la boucle L6 changerait de conformation, la rendant plus accessible, de sorte que le diamètre du pore soit suffisant pour permettre le passage de FHA en conformation étendue (Clantin *et al.*, 2007).

3.2.7.3. Modèles linéaire et en *hairpin*

L'orientation dans laquelle le TpsA sort du TpsB est encore sujette à question. Deux mécanismes compatibles avec le diamètre du pore du TpsB s'opposent : le modèle linéaire et le modèle en *hairpin*.

La position N-terminale du domaine TPS du TpsA lui assure d'émerger le premier de la machinerie Sec dans le périplasma. Il est donc dans une position favorable pour interagir avec son partenaire membranaire. Le modèle linéaire de la sécrétion du TpsA par le TpsB propose que le domaine TPS conservé soit le premier à émerger du TpsB et que le repliement de ce domaine à la surface bactérienne serve de base au repliement progressif de l'hélice β du TpsA (Figure 23) (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004; Henderson *et al.*, 2004; Thanassi *et al.*, 2005).

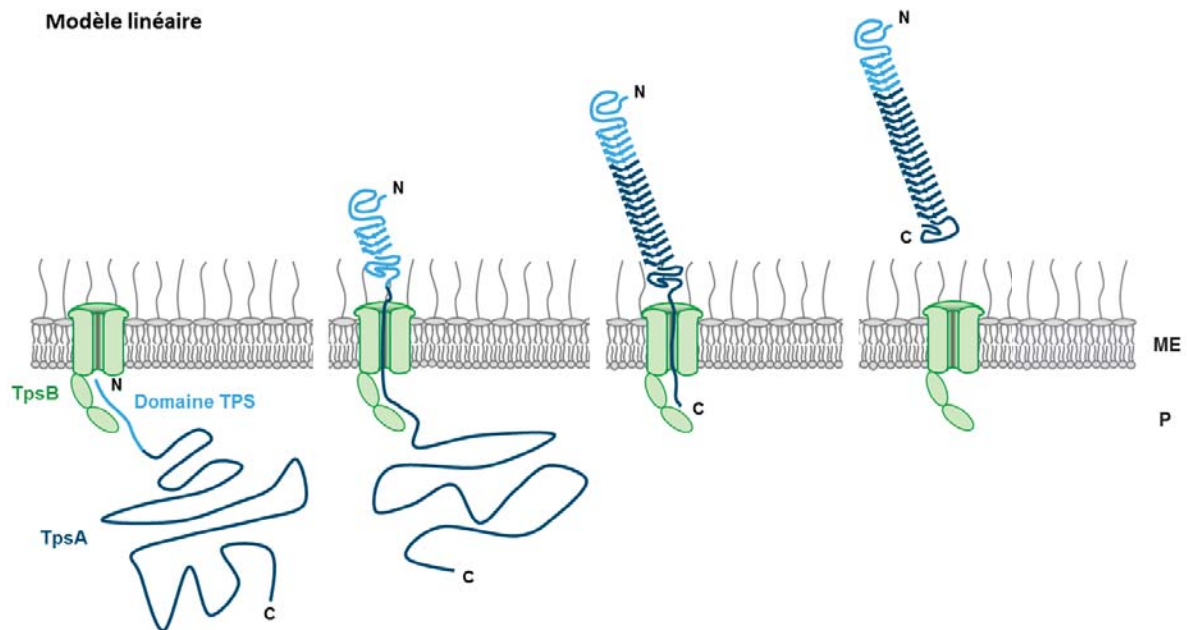


Figure 23. Modèle linéaire de la sécrétion du TpsA par son TpsB. De gauche à droite, le domaine TPS du TpsA interagit avec les domaines POTRA du TpsB. Le domaine TPS émerge le premier à la surface bactérienne et son repliement sert de base au repliement progressif du TpsA qui est ensuite relâché dans le milieu extracellulaire. ME, membrane externe ; P, périplasma ; N, extrémité N-terminale ; C, extrémité C-terminale.

Un autre modèle de mécanisme de sécrétion a été proposé, le modèle en *hairpin* proposé pour le système FHA/FhaC (Mazar and Cotter, 2006). Ce modèle se base sur des expérimentations de détection des extrémités N-terminale et C-terminale au cours de la sécrétion par reconnaissance antigénique. Les résultats indiqueraient que l'extrémité C-terminale de FHA serait exposée à la surface bactérienne et non l'extrémité N-terminale (Mazar and Cotter, 2006). Dans ce modèle, le domaine TPS du TpsA interagit avec les domaines POTRA du TpsB et cette interaction est maintenue jusqu'au terme de la translocation. La protéine TpsA forme une *hairpin* dans sa partie la plus N-terminale en aval du domaine TPS pour s'engager dans le pore. Le repliement de l'hélice β est progressif et débute par la partie la plus N-terminale en aval du domaine TPS jusqu'à l'extrémité C-terminale. Une fois l'extrémité C-terminale du TpsA repliée, le domaine TPS sort à son tour du pore et se replie, relâchant ainsi le TpsA dans le milieu extracellulaire (Figure 24).

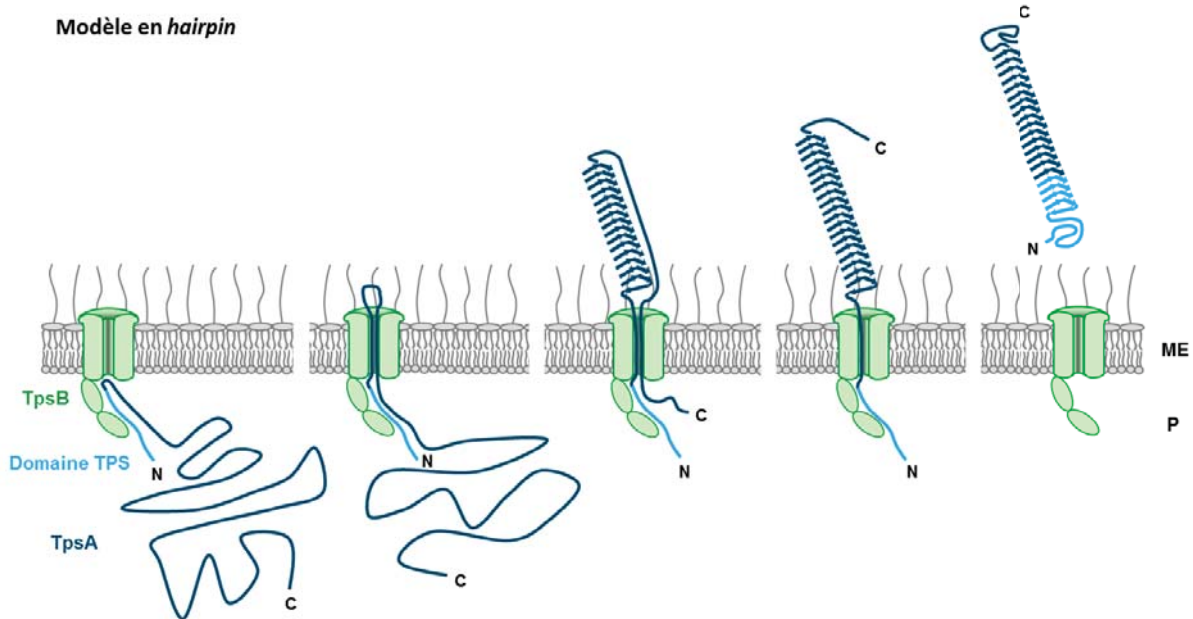


Figure 24. Modèle en *hairpin* de la sécrétion du TpsA par son TpsB. De gauche à droite, le domaine TPS du TpsA interagit avec les domaines POTRA du TpsB. Le domaine TPS est maintenu de la sorte jusqu'à la fin de la translocation. La partie la plus N-terminale de la protéine TpsA en aval du domaine TPS émerge du pore en formant une *hairpin* et initie le repliement de l'hélice β . Une fois l'extrémité C-terminale repliée, la partie N-terminale de la protéine y compris le domaine TPS du TpsA traverse à son tour le pore et se replie relâchant la protéine TpsA mature dans le milieu extracellulaire. ME, membrane externe ; P, périplasme ; N, extrémité N-terminale ; C, extrémité C-terminale.

Ces deux modèles permettent d'expliquer comment des protéines aussi longues que les TpsA peuvent être transportées au travers de la membrane externe en l'absence de source d'énergie. L'énergie nécessaire à la sécrétion du TpsA serait fournie par le repliement progressif de cette protéine à la surface de la bactérie.

Toutefois, plusieurs arguments tendent à contredire le modèle en *hairpin*. Il a notamment été montré via des mesures en temps réel de RPS (résonance plasmonique de surface) que le taux d'association et de dissociation entre le domaine TPS de FHA et la partie N-terminale de FhaC semble être très rapide (K_D ou constante d'équilibre de dissociation de $3,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$) (Delattre *et al.*, 2011). L'interaction entre le domaine TPS et les domaines POTRA est donc très dynamique ce qui rend peu probable que cette interaction soit maintenue tout au long de la sécrétion. Aussi, dans le modèle en *hairpin*, la partie du TpsA située entre la sortie du pore et la zone de repliement le long de l'hélice β en formation est sous forme étirée dans le milieu extracellulaire ce qui la rendrait vulnérable face aux protéases. De plus, le modèle en *hairpin* est difficilement conciliable avec le mode de sécrétion du système HMW1A/HMW1B. Dans ce système, le domaine N-terminal du TpsA, HMW1A-PP, est naturellement clivé du reste de la protéine en cours de sécrétion et relâché dans le milieu extracellulaire. La protéine mature est maintenue dans le pore de HMW1B par son extrémité C-terminale comprenant un pont disulfure (Figure 25) (Buscher *et al.*, 2006; St Geme and Yeo, 2009).

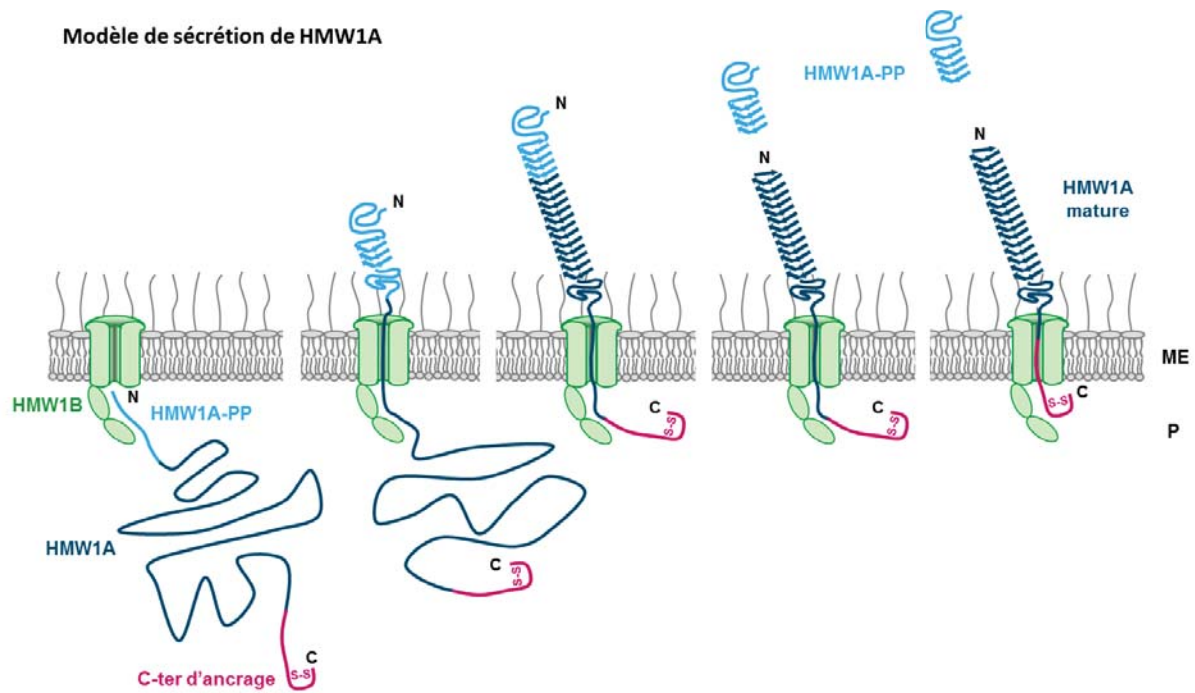


Figure 25. Modèle du mécanisme de sécrétion de HMW1A par HMW1B. De gauche à droite, le domaine TPS compris dans la *propiece* de HMW1A (HMW1A-PP) interagit avec les domaines POTRA de HMW1B. L'extrémité N-terminale de HMW1A (HMW1A-PP) émerge la première à la surface bactérienne et son repliement sert de base au repliement progressif du TpsA. En cours de sécrétion, HMW1A-PP est clivée du reste de la protéine et relâchée dans le milieu extracellulaire. La protéine HMW1A mature reste ancrée dans le pore de HMW1B par son extrémité C-terminale comportant un pont disulfure. ME, membrane externe ; P, périplasma ; N, extrémité N-terminale ; C, extrémité C-terminale ; S-S, pont disulfure.

Tenant compte de ces arguments, le modèle linéaire semble être le mécanisme de translocation le plus plausible. Toutefois, aucun des deux modèles n'a pu à ce jour être validé ou invalidé (Hodak and Jacob-Dubuisson, 2007).

Il n'est pas exclu qu'entre les deux sous-familles de système TPS, il y ait des différences dans le mécanisme de sécrétion. On suspecte que les systèmes TPS de la sous-famille FHA/FhaC fonctionnent suivant le modèle en *hairpin* et que ceux de la sous-famille HMW1A/HMW1B fonctionnent suivant le modèle linéaire. Sur ce constat, il serait intéressant d'étudier d'un point de vue structural un système TPS de cette seconde sous-famille. C'est la raison pour laquelle des essais de production de divers TpsB de cette sous-famille ont été mis en œuvre au sein de notre laboratoire. Des premiers résultats concluants ont été obtenus pour la protéine HxuB et par conséquent, l'étude du système TPS HxuA/HxuB a été engagée.

4. Système TPS HxuA/HxuB

Le système TPS HxuA/HxuB appartient à la seconde sous-famille de systèmes TPS, la sous-famille HMW1A/HMW1B. HxuA et HxuB sont des composantes d'un système d'acquisition de l'hème de

Haemophilus influenzae dans lequel intervient une troisième protéine, HxuC, protéine réceptrice de l'hème (Cope *et al.*, 1995; Cope *et al.*, 1998).

4.1. *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae est une bactérie à Gram-négatif qui existe sous forme encapsulée et non-encapsulée. Les souches encapsulées sont classifiées en six sérotypes, de a à f, sur base de leur capsule polysaccharidique (Pittman, 1931). Le sérotype b de *H. influenzae* (Hib) a été identifié comme la principale souche encapsulée à l'origine des infections par cette bactérie. La vaccination contre Hib a débuté dans les années 1970 (Rodrigues *et al.*, 1971; Anderson *et al.*, 1972). Les vaccins à l'encontre de cette souche ont bien évolué depuis et ont fortement réduit les cas infectieux dus à celle-ci. Cependant ces vaccins n'ont pas d'effet sur les formes non encapsulées de *H. influenzae*.

Les souches non encapsulées de *Haemophilus influenzae* ou *Nontypeable Haemophilus influenzae* (NTHi) sont des coccobacilles. Elles sont communément présentes dans les voies respiratoires supérieures chez l'homme et sont à l'origine de diverses infections chez les enfants et chez les adultes.

Chez les adultes, NTHi est principalement à l'origine d'infections des voies respiratoires surtout chez les personnes dont le système immunitaire muqueux est déjà affaibli par une broncho-pneumopathie chronique obstructive ou une mucoviscidose (Murphy and Sethi, 1992; St Geme, 1993; Murphy *et al.*, 2004). Les infections provoquées par NTHi chez les enfants sont l'otite moyenne, la sinusite, la conjonctivite et la pneumonie. Les bactériémies et méningites, plus rares, apparaissent chez les nouveau-nés et les personnes immunodéficientes.

Les bactéries NTHi expriment à leur surface de nombreuses adhésines. Ces dernières sont spécifiques à la variété de types cellulaires retrouvés dans les voies respiratoires de l'homme. Parmi ces adhésines, on retrouve la protéine TpsA HMW1A (St Geme *et al.*, 1993; Gilsdorf *et al.*, 1996; Barenkamp and St Geme, 1996:1996; St Geme *et al.*, 1998; St Geme, 2002; Swords *et al.*, 2002; Fink *et al.*, 2003; Avadhanula *et al.*, 2006).

4.2. Le système HxuCBA

Les bactéries ont besoin d'un apport en fer pour divers processus métaboliques. Chez l'homme, l'hôte exclusif de *Haemophilus influenzae*, la plupart du fer est intracellulaire où il est lié à la ferritine ou sous forme de composant contenant de l'hème. La plupart du fer extracellulaire est lié à la transferrine.

Les complexes protoporphyrine-fer, autrement dit l'hème, sont des groupes prosthétiques des protéines requis pour le transport d'électrons et la détoxification de dérivés oxygène. *H. influenzae* a acquis des mécanismes d'acquisition du fer comme de nombreuses autres bactéries pathogènes (Pidcock *et al.*, 1988). Toutefois, *H. influenzae* est une des rares bactéries anaérobiques facultatives dont la voie de synthèse de l'hème est incomplète (White and Granick, 1963; Panek and O'Brian, 2002). Par conséquent, *H. influenzae* a également dû développer des mécanismes d'acquisition de l'hème. Chez l'homme, l'hème circule sous forme de complexe hème-protéine (Muller-Eberhard and Nikkilä, 1989). Ainsi, l'hème est fortement lié à l'albumine et l'hémopexine, deux protéines abondantes dans le sérum (Hrkal *et al.*, 1974; Koskelo and Muller-Eberhard, 1977). L'hème extracellulaire est aussi présent dans l'hémoglobine qui se lie fortement à l'haptoglobine (Arcoleo and Greer, 1982). *In vitro*, *H. influenzae* est capable d'utiliser ces différentes sources d'hème (Stull, 1987).

Le système HxuCBA, dont les composantes HxuA et HxuB sont les sujets d'étude de cette thèse, permet à *H. influenzae* d'acquérir de l'hème issu du complexe hème-hémopexine qui est présent dans le plasma et dans tous les fluides corporels (Hanson *et al.*, 1992; Cope *et al.*, 1995).

Le système HxuCBA (Hxu pour *haemopexin utilization*) a été découvert pour la première fois en 1992 dans une souche de *Haemophilus influenzae* de type b (Hib) (Hanson *et al.*, 1992) et s'est avéré être présent dans toutes les souches de *H. influenzae* testées (Cope *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 1995). Ce système est composé de trois protéines, HxuA, HxuB et HxuC, dont les gènes sont encodés en opéron (Figure 26).

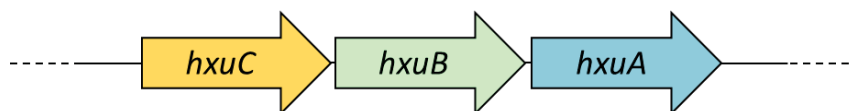


Figure 26. Représentation de l'opéron des trois gènes *hxC*, *hxB* et *hxA*.

HxuC est une protéine de la membrane externe de 78 kDa, TonB-dépendante, qui serait impliquée dans l'utilisation par *H. influenzae* de l'hème libre présent en très faible quantité (Cope *et al.*, 1995). HxuC permettrait également à *H. influenzae* d'utiliser l'hémoglobine comme source d'hème lorsque les trois protéines de membrane externe HgbA, HgbB et HgbC, liant l'hémoglobine et le complexe hémoglobine-haptoglobine, sont délétées (Cope *et al.*, 2001).

Les protéines HxuA et HxuB constituent le système de sécrétion à deux partenaires dont l'étude structurale est l'objet de cette thèse. HxuB est une protéine TpsB de 60 kDa. Elle comprend un domaine périplasmique N-terminal constitué de deux domaines POTRA et un domaine en tonneau β

INTRODUCTION

inséré dans la membrane externe de la bactérie (Figure 27). HxuB a pour fonction de permettre la translocation de son partenaire spécifique, HxuA, vers le milieu extracellulaire (Cope *et al.*, 1995).

	Hélice α H1	
FhaC	QAQLLPGAR RD LNRI DD RQ RKEQLQ RDI ER ALTRPPVELNPQSEAAAAPARKPDATSGHTV VT	60
HxuB	-----LDRPDTGS LN RELE QRQIQ SEAKPSGELFNQTANSPYTAQYKQGLK FLK	50
	POTRA1	
FhaC	VHAVDLDFGVEGR LFDP APL VQDY LN RPLD NEQL FL L VKALS AALYDRGYATSIVTFV PP	120
HxuB	QVQILDRNNQ EVVT DELAHILK NYV G KEV LS DL SNLANEISEFYRHNNYL VAKA IL PPQ	110
	POTRA2	
FhaC	GVVDGVLK LK VEW GRI K W LIDG KPLE GTRDRMMVFSAMP GWQ DKVLNVFDIDQ AI YNIN	180
HxuB	EIEQ GT VKILL LK GV GEI R LQ NHSALS NK FVSRLSNTTV NA SEFIL KDE LE KF ALT IND	170
	Tonneau β	
FhaC	NGGKTGNITIVPADEYGY SYLDLQ L QR RALPRVSLGMDNSGP GT PENGRYKYNASV TAND	240
HxuB	VPGVNAGL QLS AG KK VG EAN LLIK INDA K R FSSYVSVD NQG --NKYTGRY RLA AGTK VSN	228
FhaC	LLGLNDTLGLYIGNRYRDAGHDAERNYDLMSVPLG--RTRLDLQ TG YSTYR NLL KTRY	298
HxuB	LNGWGDELKLDLMS-----SNQANLKNARIDYSS LI DGYSTRFGVTANYLDYK--LGG NF	281
FhaC	GQYQ SAG NSRSFGLKAT RL LYRDT RSQ F SVY GGLK L RQ N KNYLAG TR LDVSSKHYS DVT	357
HxuB	KSLQ SQ GHSHTLGAYLLHPT IR TP N FRL ST KV S FNH Q N L TDK Q AVY V K Q KRK IN SL TAG	341
FhaC	VGMQYSTQ R GANAYFGDLS F TRGVG--VNNGKYAAYDERG PQ GNVSRFNGSLAWTRY MAL	415
HxuB	IDGS W N L IKDGT TY F S LS T L F GNLAN Q TSEKK Q Y T KED F Q P Q S H F TVYNY RL SHEQ I L PK	401
	Motif 3	
FhaC	AGQPIQWASQLGFQ YSR Q QL LNSYQ IT V G DEY T VR GY N LR T S Q SGD S GVYLSNTLT V VP Q	475
HxuB	S---FAFNIGIN Q F AD K T LESS Q K M LL G LS G VR GH Q AGAAS V DEGH L I Q TE F KHY L EV	458
FhaC	F S LL G Q A SVAPFVGADVGALKSNHPDA--RTIRMAGLAAGV R FDLP--YARMSFTY S K P	531
HxuB	F S Q S VLV S SLFYDYGLGKY Y KNS Q FLE K GV K NS V KL Q SVGAGLSLS D AGSYAINV S V A K P	518
FhaC	VGAQ P GGAP R AP V WLYINAGLS F	554
HxuB	LDNNINNADKH Q F W LSMI K T F --	539

Figure 27. Alignement des séquences protéiques de FhaC et HxuB. Sur base de la structure cristallographique de FhaC et de prédiction de domaine pour HxuB (Zdobnov and Apweiler, 2001), les domaines suivants sont présentés : l'hélice α H1, les domaines POTRA 1 et 2 et le domaine C-terminal en tonneau β comprenant le motif 3 conservé et sa tétrade VRGY/F (VRGH, pour HxuB).

La protéine HxuA comprend le domaine TPS à son extrémité N-terminale, domaine conservé parmi les protéines TpsA, qui permettrait l'interaction avec les domaines POTRA de HxuB. Le domaine C-terminal de HxuA lui est spécifique et est impliqué dans sa fonction effectrice de libération de l'hème (Fournier *et al.*, 2011).

HxuA, tout comme HMW1A, comprend deux cystéines à son extrémité C-terminale qui forment probablement un pont disulfure. Ces cystéines sont responsables de l'ancrage de HxuA à la surface bactérienne (Fournier *et al.*, 2011). Toutefois, au sein de certaines souches de *H. influenzae*, la

protéine HxuA est totalement ou partiellement relâchée dans le milieu extracellulaire (Wong *et al.*, 1995; Fournier *et al.*, 2011).

HxuA a une faible affinité pour l'hème (Fournier *et al.*, 2011) et une forte affinité pour l'hémopexine (Wong *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 1995) que ce soit pour l'apo-hémopexine ou le complexe hème-hémopexine (Fournier *et al.*, 2011). Cette interaction entre HxuA et l'hémopexine aurait pour effet soit la libération de l'hème à proximité d'un récepteur à hème tel que HxuC soit une diminution de l'affinité entre l'hémopexine et l'hème rendant ce dernier plus disponible pour la bactérie. On sait que le complexe hème-hémopexine est rapidement soustrait au système sanguin et que les affinités de HxuA pour apo-hémopexine et le complexe hème-hémopexine sont d'ordre similaire. Il est donc possible que l'activité principale de HxuA soit de maintenir l'hémopexine sous une forme inactive rendant l'hème plus disponible (Figure 28) (Fournier *et al.*, 2011).

Modélisation du système HxuCBA

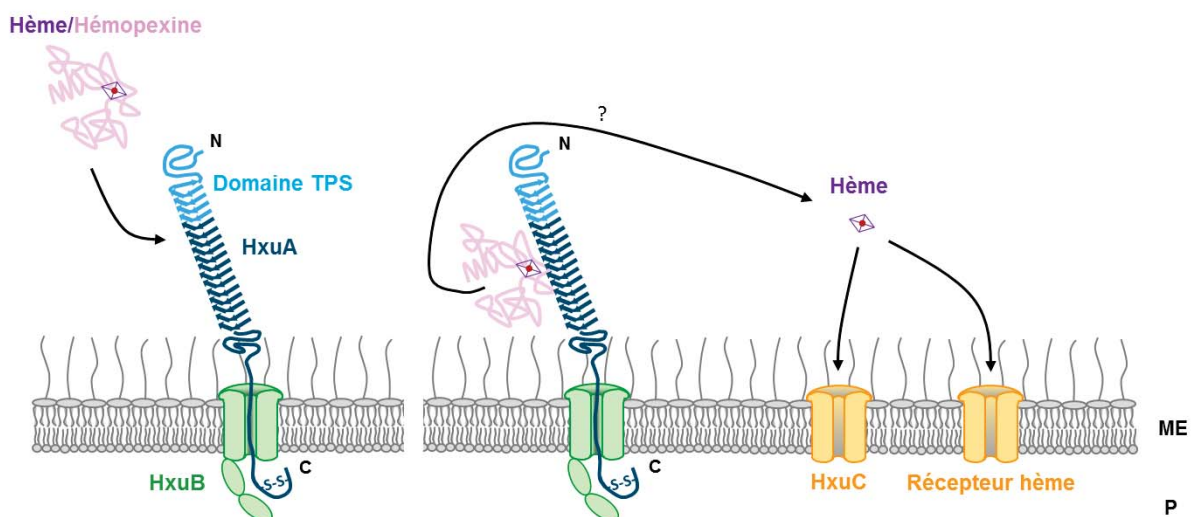


Figure 28. Modélisation du système HxuCBA. La protéine HxuB sécrète son partenaire spécifique HxuA qui reste ancré dans le pore grâce à son extrémité C-terminale comportant un pont disulfure. HxuA interagit fortement avec l'apo-hémopexine (non représentée) ou le complexe hème-hémopexine. Cette interaction, dont le mécanisme exact reste à élucider, rend l'hème plus disponible pour HxuC, un transporteur de l'hème, ou pour tout autre récepteur à l'hème. ME, membrane externe ; P, périplasme ; N, extrémité N-terminale ; C, extrémité C-terminale ; S-S, pont disulfure.

Préalablement à mes travaux de thèse, la protéine HxuB a pu être produite en membrane externe de la bactérie *Escherichia coli*, extraite et purifiée. Un premier cristal de la protéine HxuB sans tag a été obtenu dans les conditions suivantes : 20mM tampon sodium phosphate pH 7,0, 1% β -OG, 500 mM imidazole pH 6,5 et 22 % PEG 1000. Un jeu de données de diffraction aux rayons X à 4 Å de résolution a été collecté. Mais le problème des phases n'a pu être résolu par remplacement moléculaire à partir

INTRODUCTION

de la structure de FhaC. C'est sur cette base que j'ai procédé à la suite des travaux sur HxuB et entamé ceux concernant son partenaire spécifique HxuA.

Objectifs

OBJECTIFS

L'objectif de ma thèse est de réaliser l'étude structurale du système TPS HxuA/HxuB appartenant à la sous-famille HMW1A/HMW1B. A cette fin, les partenaires HxuA et HxuB sont produits en grande quantité dans *E. coli*, purifiés et testés en cristallogénèse.

Sur base des résultats de l'étude structurale et après analyse comparative avec les autres structures de protéines TPS disponibles, le système HxuA/HxuB sera croisé avec le système HMW1A/HMW1B dans le but d'étudier la spécificité du système TPS au sein de cette sous-famille.

Enfin, une étude fonctionnelle du mécanisme de sécrétion du système HxuA/HxuB sera réalisée par mutagenèse dirigée.

Résultats

1. Etude structurale de la protéine HxuA

1.1. Production de la protéine HxuA

Dans le cadre de l'étude structurale de la protéine TpsA HxuA, le système HxuA/HxuB de *Haemophilus influenzae* a été recréé chez *Escherichia coli* (souche BL21(DE3)omp5). Ce système permet la production du TpsA dans le surnageant de culture. Les constructions de HxuA et HxuB requièrent la présence d'un peptide signal afin de traverser la membrane interne via le système de translocation Sec. Pour toutes les constructions qui seront décrites, le peptide signal de la protéine OmpA d'*E. coli* a été utilisé.

Plusieurs constructions ont été envisagées pour HxuA. La première construction mise en œuvre vise à produire la protéine HxuA entière de 882 résidus (Figure 29). Les clones obtenus présentaient systématiquement une mutation « stop » au sein de la séquence codante de HxuA. La protéine HxuA entière n'a donc pas pu être produite.

Deux autres constructions contenant les 373 et 301 premiers résidus de HxuA ont été élaborées respectivement sur base des structures résolues des domaines TPS de HMW1A et FHA, HMW1A-PP et Fha30 (Figure 29) (Clantin *et al.*, 2004; Yeo *et al.*, 2007).

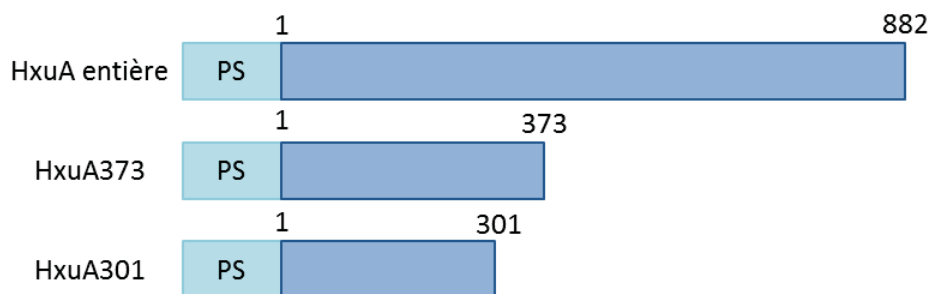


Figure 29. Schéma des différentes constructions envisagées pour la protéine HxuA. HxuA373 et HxuA301 sont de taille équivalente à HMW1A-PP (Yeo *et al.*, 2007) et Fha30 (Clantin *et al.*, 2004) respectivement. Les numéros indiqués correspondent au nombre de résidus. PS, peptide signal de la protéine OmpA d'*E. coli*.

Afin de faciliter la purification des protéines HxuA373 et HxuA301, leurs constructions comprennent un tag poly-histidine (7his) à l'extrémité 5'.

L'expression des protéines HxuA301-7his et HxuA373-7his est induite par l'addition de 1mM d'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) dans le milieu de culture lorsque la densité optique atteint 0,6 ($\lambda=600\text{nm}$). Ces protéines sont produites en culture d'un litre induite durant trois heures. Les surnageants de culture contenant HxuA301-7his ou HxuA373-7his sont récupérés après centrifugation.

1.2. Purification de la protéine HxuA

Avant d'être chargés sur une colonne de chromatographie d'affinité (HisTrap FF Crude), de l'imidazole à pH 6,5 est ajouté au surnageant de culture de sorte à atteindre 20 mM d'imidazole de même qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases est ajouté au surnageant. L'éluion des protéines HxuA301-7his et HxuA373-7his est réalisée avec 1M d'imidazole à pH 6,5 (Figure 30).

Un litre de culture permet d'obtenir 2 mg de protéine HxuA301-7his pure.

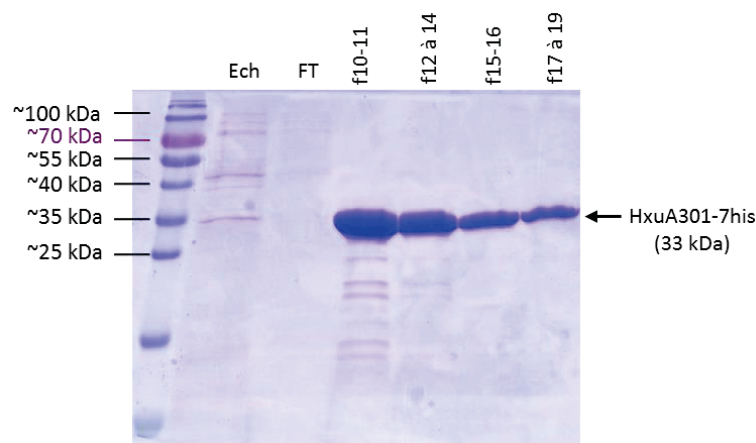


Figure 30. Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) après purification sur colonne d'affinité pour HxuA301-7his (33 kDa). 1^{ier} puits : marqueur de poids moléculaire. 2^{ième} puits : surnageant de culture (15 μ l). 3^{ième} puits : *flow-through* (15 μ l). Du 4^{ième} au dernier puits : différentes fractions de purification groupées en fonction des concentrations en protéines (3 μ l).

1.3. Cristallisation de la protéine HxuA

Après éluion, l'éluat est dialysé contre une solution de 20mM imidazole à pH6,5.

Des essais de cristallogénèse ont été réalisés sur différents échantillons de HxuA en goutte suspendue en mélangeant 1 μ l de solution protéique et 1 μ l de solution de cristallogénèse (voir Matériels et méthodes).

Dans le cas de HxuA301-7his, plusieurs conditions de cristallogénèse ont été testées. Dans un premier temps, le kit *Cryo suite* (Qiagen), comprenant 96 conditions, a été testé sur plusieurs échantillons de HxuA301-7his de concentration protéique variant entre 1 et 3,45 mg/ml.

Dans une des conditions du kit *Cryo suite* sont apparues des sphérulites soit des ensembles quasi-cristallins qui constituent une piste à approfondir (Figure 31-A). Cette condition est la suivante : 0,085M tampon HEPES à pH 7,5, 8,5% (v/v) d'isopropanol, 15% (v/v) de glycérol et 17% (w/v) de PEG 4000 (PEG, polyéthylène glycol). Des essais d'optimisation de cette condition ont été réalisés en

RESULTATS

faisant varier la concentration en PEG 4000 de 6 à 20%. Ces essais ont permis d'obtenir des sphérulites plus grandes mais pas de cristaux (Figure 31-B).

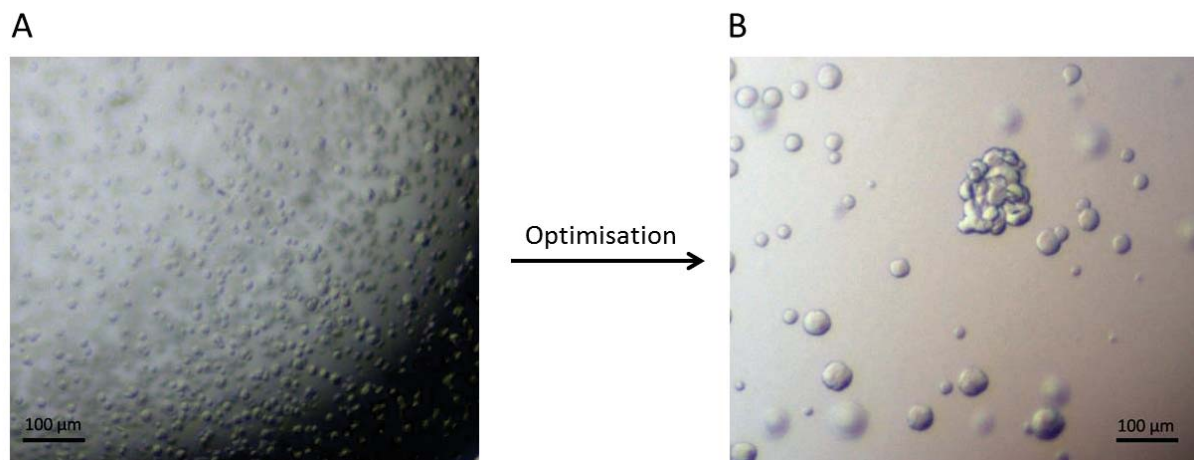


Figure 31. Sphérulites obtenues avec la protéine HxuA301-7his en goutte suspendue. L'échantillon de HxuA301-7his est à une concentration de 3,45 mg/ml en tampon 20mM imidazole à pH 6,5 **(A)** Condition de cristallogenèse avant optimisation : 0,085M tampon HEPES à pH 7,5, 8,5% (v/v) d'isopropanol, 15% (v/v) de glycérol et 17% (w/v) de PEG 4000. **(B)** Condition de cristallogenèse après optimisation : 0,085M tampon HEPES à pH 7,5, 8,5% (v/v) d'isopropanol, 15% (v/v) de glycérol et 14% (w/v) de PEG 4000.

En sortie de colonne de chromatographie, l'échantillon de protéine HxuA301-7his est en tampon 1M imidazole à pH 6,5. Des essais de cristallogenèse avec le kit *Cryo suite* ont été réalisés à partir de ces échantillons de HxuA301-7his en sortie de colonne (1,6 mg/ml) et d'échantillons de HxuA301-7his mis à 200 mM d'imidazole à pH 6,5 par dialyse (1,7 mg/ml).

Après trois heures d'incubation, des micro-cristaux sont apparus pour une condition du kit que ce soit avec 1M ou 200 mM d'imidazole à pH 6,5. Cette condition est la suivante : 0,095M tri sodium citrate pH 5,6, 19% (v/v) isopropanol, 5% (v/v) glycérol et 19% (w/v) PEG 4000. Les micro-cristaux obtenus avec 1M d'imidazole étant de meilleure qualité, cette concentration a été choisie pour l'optimisation des conditions de cristallogenèse. Pour optimiser cette condition, nous avons choisi de varier la concentration en protéine de 1 à 2,8 mg/ml, de varier la concentration en PEG 4000 de 0 à 23%, de varier la concentration en isopropanol de 0 à 30% et de varier la concentration en glycérol de 0 à 15%.

Après optimisation, la condition qui a permis l'obtention des cristaux de meilleure qualité est 0,095M tri sodium citrate pH 5,6, 19% (v/v) d'isopropanol, 5% (v/v) de glycérol et 12% (w/v) de PEG 4000 (Figure 32). Les mesures de diffraction de ces cristaux sont présentées dans le point suivant.

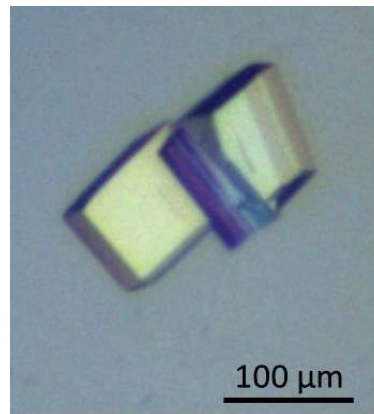


Figure 32. Cristal de la protéine HxuA301-7his obtenu en goutte suspendue. Condition de cristallisation avec une protéine à 2mg/ml en 1M imidazole à pH 6,5 : 0,095M tri sodium citrate pH 5,6, 19% (v/v) isopropanol, 5% (v/v) glycérol et 12% (w/v) PEG 4000.

Sur base des résultats obtenus pour HxuA301-7his, les premiers essais de cristallogenèse pour la protéine HxuA373-7his (2,8 à 6 mg/ml) ont été réalisés avec les conditions suivantes : 1M imidazole à pH 6,5 (issu de la solution protéique), 0,095M tri sodium citrate pH 5,6, 19% (v/v) d'isopropanol, 5% (v/v) de glycérol et 1 à 12% (w/v) de PEG 4000. Ces conditions n'ayant pas permis d'obtenir de cristaux, d'autres essais de cristallogenèse ont été entrepris avec le kit *Cryo suite* (Qiagen), le kit *pHClear suite* (Qiagen) et un kit PEG maison. Les cristaux de HxuA373-6his obtenus n'ont pas diffracté sous l'effet des rayons X.

1.4. Collecte et traitement des données de diffraction

Préalablement à la collecte de données, les cristaux de HxuA301-7his sont trempés dans une solution cryo-protectrice de 0,095M tri sodium citrate pH 5,6, 19% (v/v) isopropanol, 5% (v/v) glycérol et 19% (w/v) PEG 4000. Les données de diffraction aux rayons X sont collectées à une température de 100°K. Un premier jeu de données à 2,04 Å de résolution a été collecté sur le diffractomètre du laboratoire équipé d'un générateur de rayons X à anode tournante Bruker–Nonius FR591 et d'un détecteur Mar345 *Image Plate Detector*. Un jeu à plus haute résolution à 1,5 Å a ensuite été collecté sur la ligne de lumière PROXIMA1 du synchrotron SOLEIL (Gif-sur-Yvette, France).

Avec le logiciel XDS (Kabsch, 2010), les données de diffraction aux rayons X sont indexées, intégrées et mises à l'échelle. Les statistiques des données sont résumées dans la Table 1.

RESULTATS

Table 1. Statistiques de collecte de données et d'affinement de HxuA301-7his. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la dernière tranche de résolution (2,04-2,16 Å et 1,59-1,50 Å). *Les valeurs statistiques du diagramme de Ramachandran ont été obtenues avec le logiciel Procheck de la suite CCP4 v.6.1.13 (Winn *et al.*, 2011).

Collecte de données	Diffractomètre du laboratoire	Synchrotron SOLEIL
Paramètres de maille (Å)	a=38,79 b=70,58 c=104,49 $\alpha=90,00 \beta=98,09 \gamma=90,00$	a=38,99 b=70,84 c=104,98 $\alpha=90,00 \beta=98,10 \gamma=90,00$
Groupe d'espace	P 2 ₁	P 2 ₁
Générateur de RX/Ligne de lumière	Anode tournante Bruker-Nonius FR591	PROXIMA1
Longueur d'onde (Å)	1,5418	0,98011
Température (K)	100	100
Détecteur	Mar345	PILATUS 6M
Distance cristal-détecteur (mm)	174,228	269,631
Degré de rotation par image (°)	1,0	0,2
Temps d'exposition par image (s)	300	0,2
Images collectées	179	1200
Résolution (Å)	2,04 (2,16)	1,50 (1,59)
No. réflexions		
Observées	129739 (18570)	397746 (62011)
Uniques	35540 (5423)	89861 (14222)
Mosaïcité du cristal (°)	0,26	0,20
Complétude (%)	98,3 (94,2)	99,2 (97,8)
Redondance	3,6 (3,4)	4,4 (4,4)
R _{merge} (I) (%)	7,3 (31,1)	3,6 (27,8)
R _{meas} (%)	8,5 (36,6)	4 (31,7)
I/ σ I	15,35 (4,46)	21,75 (4,64)
Affinement		
R _{work} (%)	17,36	15,9
R _{free} (%)	26,36	21,0
Mean B (Å ²)	20,3	20,9
No. d'atomes non-H		
Protéines	4104	4708
Eau	370	171
R.m.s.d.		
Longueurs des liaisons (Å)	0,022	0,027
Angles des liaisons (°)	1,871	2,236
Statistiques de Ramachandran*		
Préférés (%)	97,5	97,5
Autorisés (%)	1,5	2,5
Défavorables (%)	1,0	0,0
Code PDB		4I84

La structure de HxuA301-7his a été déterminée à 1,5 Å de résolution avec les données obtenues au synchrotron. Le problème des phases a été résolu par remplacement moléculaire en utilisant pour modèle la structure tridimensionnelle de HMW1A-PP (code PDB : 2ODL). Le choix du modèle s'est arrêté sur HMW1A-PP car cette protéine a le plus grand pourcentage de similarité de séquence avec

HxuA301 (66,34%) comparativement à Fha30 (55,24% de similarité) et HpmA265 (57,26% de similarité).

Le remplacement moléculaire est réalisé à l'aide du logiciel Molrep v.9.2 de la suite CCP4 v.6.1.13 (Winn *et al.*, 2011). Le coefficient de Matthews, calculé avec la suite CCP4, indique la présence de deux molécules de HxuA301-7his par unité asymétrique et un pourcentage de solvant de 40,8%. Une première reconstruction de la structure de HxuA301-7his est obtenue grâce au logiciel ARP/wARP v.7.1 (Langer *et al.*, 2008) couplé à la suite CCP4. A partir de ce modèle et grâce au logiciel de visualisation Coot (Emsley *et al.*, 2010), le placement et l'orientation de chaque résidu placé par ARP/wARP sont vérifiés manuellement. Les résidus manquants sont ajoutés manuellement. Ces étapes de construction sont alternées avec des étapes d'affinement du modèle réalisées avec le logiciel REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 2011).

Chacun des monomères comprend une boucle mal définie avec une zone non construite qui s'étend pour le monomère A du résidu L126 au résidu Q130 et pour le monomère B du résidu K127 au résidu E134. Le monomère B est moins bien défini en densité ce qui explique la présence de quatre autres zones qui n'ont pu être construites car non définies en densité : E113 à N118, T181 à S185, E192 à A195 et G217 à Q220. Cette différence de définition entre les monomères est en accord avec les valeurs de B-facteur moyen qui sont de 19,2 Å² pour le monomère A et de 22,6 Å² pour le monomère B.

Le tag poly-histidine n'est pas visible en densité électronique raison pour laquelle le terme HxuA301 remplacera celui de HxuA301-7his par la suite.

1.5. Structure de la protéine HxuA301

Le domaine TPS de HxuA301 a une structure en hélice- β parallèle main droite constituée de dix tours d'hélice (Figure 33-A). L'hélice- β comprend trois feuillets- β parallèles dénommés PB1, PB2 et PB3 (PB pour *parallel* β -*sheet*). Chaque tour de l'hélice- β est constitué de trois brins- β appartenant respectivement à PB1, PB2 et PB3. Une hélice- β est dite main droite ou gauche selon le sens dans lequel s'enroulent les tours de l'hélice autour de l'axe moléculaire. Les rouleaux- β , où chaque tour implique deux brins- β (Yoder, Keen, *et al.*, 1993; Baumann *et al.*, 1993; Yoder and Jurnak, 1995), et les hélices- β appartiennent au groupe topologique des solénoïdes- β qui comprennent de nombreux facteurs de virulence, des toxines et des allergènes (Kajava and Steven, 2006).

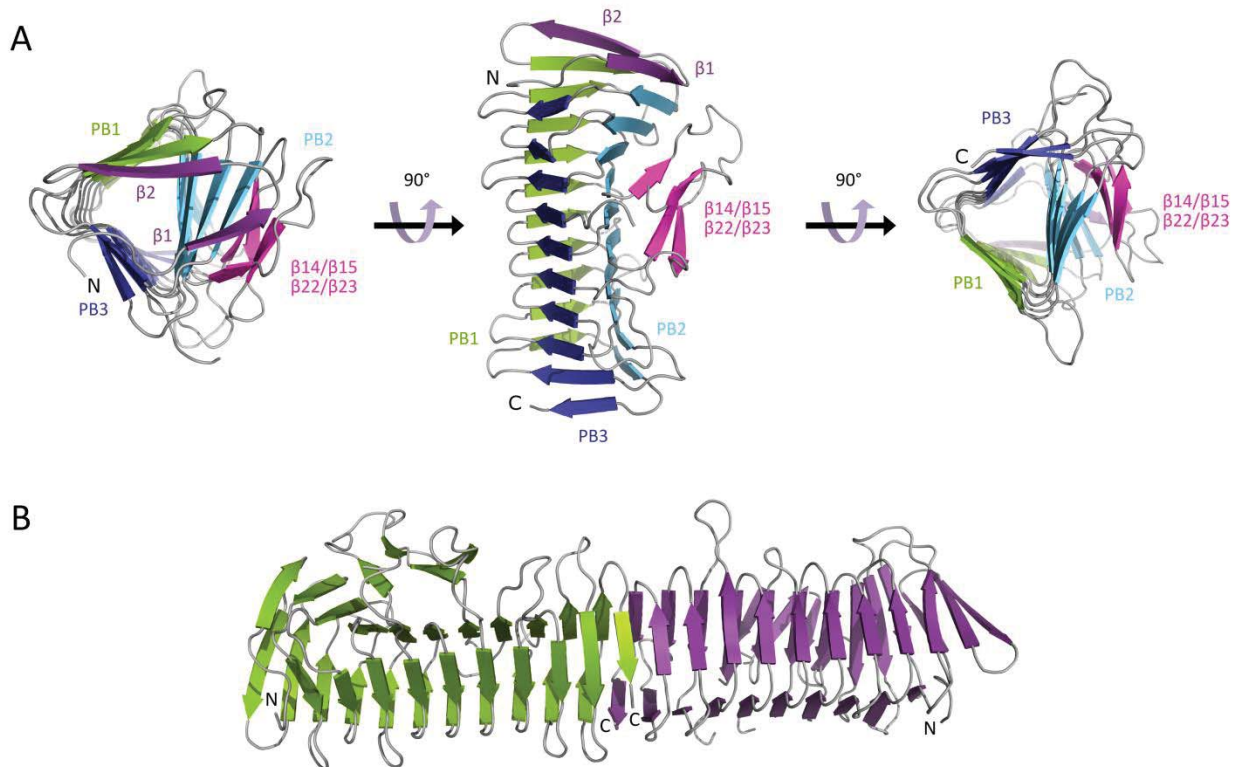


Figure 33. Représentation en ruban de la structure cristallographique de HxuA301. (A) L'hélice- β est formée par les feuillets- β parallèles PB1, PB2 et PB3 ainsi que par le motif extra-hélice à quatre brins- β antiparallèles (β 14, β 15, β 22 et β 23). Les deux premiers brins, β 1 et β 2, sont représentés en pourpre. Les extrémités N- et C-terminales sont annotées. **(B)** Représentation du dimère non physiologique observé dans le cristal. Les extrémités N- et C-terminales des deux monomères sont indiquées.

Les chaînes latérales des résidus constituant les brins des feuillets- β sont alternativement orientées vers l'intérieur et vers l'extérieur de l'hélice- β . Les résidus dont les chaînes latérales sont orientées vers l'intérieur sont majoritairement (à près de 85%) aliphatiques ou aromatiques. Par nombre décroissant les résidus aliphatiques et aromatiques trouvés sont la valine, l'isoleucine, la leucine, l'alanine, la phénylalanine, le tryptophane et la méthionine. L'agencement des chaînes latérales au sein de l'hélice- β est illustré pour un tour de l'hélice- β dans la figure 34-C.

La plupart (près de 68%) des tournants- β et des boucles reliant les brins- β comprennent au moins un résidu glycine caractérisé par un faible encombrement stérique (Figure 34-B).

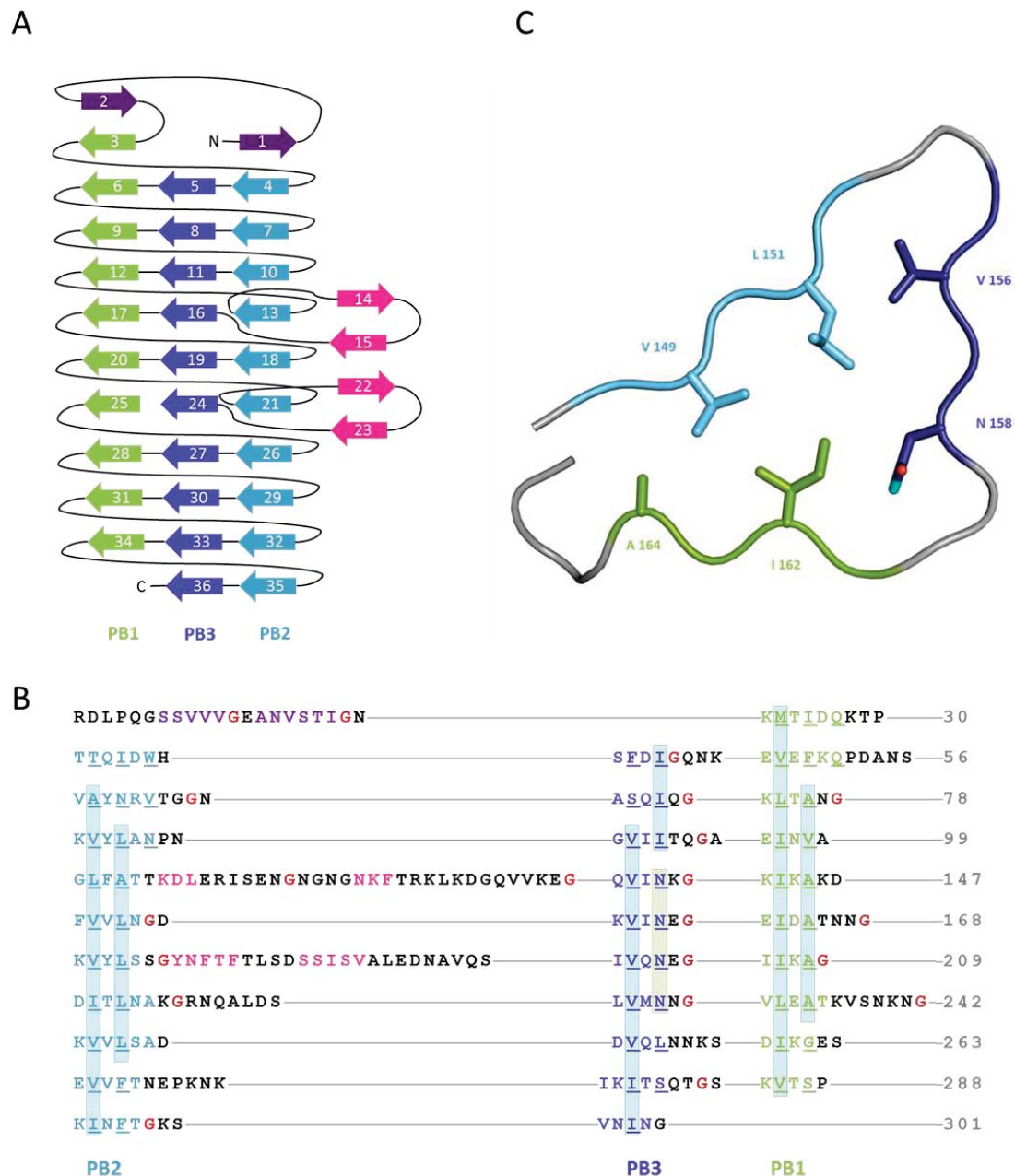


Figure 34. Représentation schématique de la topologie de HxuA301 (A), de sa séquence peptidique (B) et de l'agencement des chaînes latérales dans l'hélice- β (C). (A) Les brins- β des feuillets- β parallèles PB1, PB2 et PB3 ainsi que les autres brins- β sont représentés. (B) Les résidus soulignés ont leur chaîne latérale orientée vers l'intérieur de l'hélice- β . Les glycines impliquées dans les tournants- β ou dans les boucles sont en rouge. Les encadrés bleus mettent en évidence les résidus impliqués dans les empilements aliphatiques et l'encadré vert met en évidence l'échelle d'asparagines. (C) Agencement des chaînes latérales des résidus V149, L151, V156, N158, I162 et A164 à l'intérieur de l'hélice- β .

Une des caractéristiques des hélices- β est la présence d'empilements de résidus. Ces empilements sont définis comme des résidus similaires situés à des positions équivalentes dans les tours d'hélice adjacents et avec des angles χ similaires (Yoder, Lietzke, *et al.*, 1993; Petersen *et al.*, 1997; Jenkins and Pickersgill, 2001). HxuA301 ne déroge pas à la règle et comprend deux types d'empilement, l'empilement de résidus aliphatiques et l'échelle d'asparagines (Figure 34-B). Les empilements de résidus aliphatiques se composent de résidus alanine, valine, leucine, isoleucine et méthionine. Ce

type d'empilement est le plus représenté dans la protéine HxuA301 où ils sont au nombre de six dispersés parmi les trois feuillets- β parallèles. Ces empilements aliphatiques comprennent entre trois et dix résidus. Celui constitué des dix résidus, situé dans le PB1, s'étend sur toute la longueur du feuillet- β parallèle. Le second type d'empilement observé pour HxuA301 est un empilement de résidus polaires qui peut être composé des résidus asparagine, glutamine, thréonine and sérine. Dans le cas de HxuA301, l'empilement observé est uniquement composé de quatre résidus asparagines, N139, N158, N202 et N228 appartenant aux brins β 16, β 19, β 24 et β 27 respectivement, d'où le terme d'échelle d'asparagines (Figure 35) (Jenkins and Pickersgill, 2001).

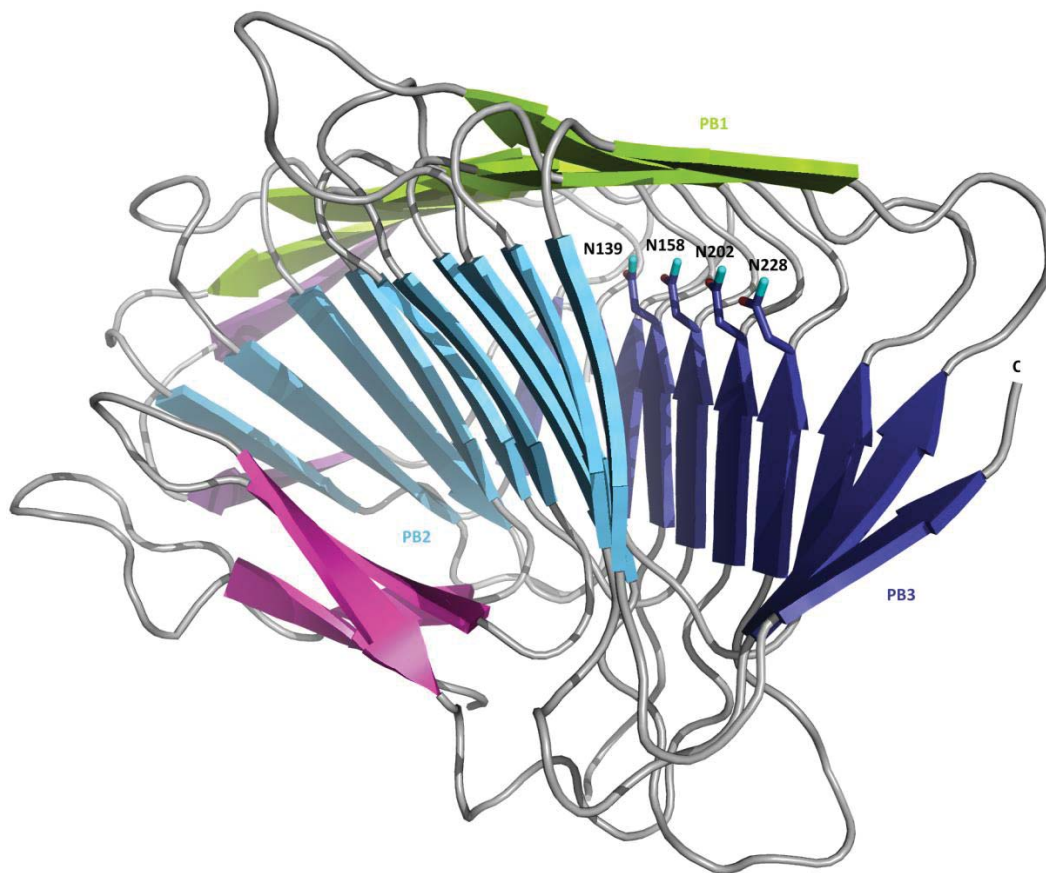


Figure 35. Représentation en ruban et bâtonnets de l'échelle d'asparagines de HxuA301. Les résidus asparagine impliqués sont représentés en bâtonnets et sont annotés (N139, N158, N202 et N228). Sont également annotés, les trois feuillets- β parallèles PB1, PB2 et PB3 ainsi que l'extrémité C-terminale.

Dans la plupart des hélices- β main droite, l'extrémité N-terminale du cœur hydrophobe de l'hélice est protégée du solvant par une hélice- α amphipathique (Jenkins and Pickersgill, 2001). Dans le cas de HxuA301, l'extrémité N-terminale de l'hélice- β n'est pas protégée par une hélice- α mais par les brins β 1 et β 2. Les brins β 1 et β 2 initient respectivement les feuillets PB2 et PB1 et représentent les seuls brins- β antiparallèles trouvés dans les feuillets PB1, PB2 et PB3 (Figure 33-A et Figure 34-A).

Les tours d'hélice de HxuA301 deviennent plus réguliers au fur et à mesure que l'on progresse vers l'extrémité C-terminale et forment une section transversale triangulaire (Figure 33-A). La protéine HxuA301 a cristallisé sous la forme d'un homodimère. Cette organisation dimérique résulte de l'interaction des extrémités C-terminales de chaque monomère de sorte à former une seule hélice- β longue de 100 Å (Figure 33-B). Sous cette forme dimérique, l'extrémité C-terminale est protégée du milieu extérieur.

La protéine HxuA301 comprend également un motif extra-hélice constitué d'un feuillet- β à quatre brins- β antiparallèles β 14, β 15, β 22 et β 23 (motif β 14/ β 23). Ce motif interagit fortement avec le feuillet PB2 par un pont salin (entre les résidus R61 du brin β 7 et D107 du brin β 14), par un cluster hydrophobe et par un réseau d'interactions aromatique-aromatique impliquant huit résidus : 3 tyrosines (Y59, Y81 et Y171) et 5 phénylalanines (F102, F122, F148, F178 et F180) (Figure 36).

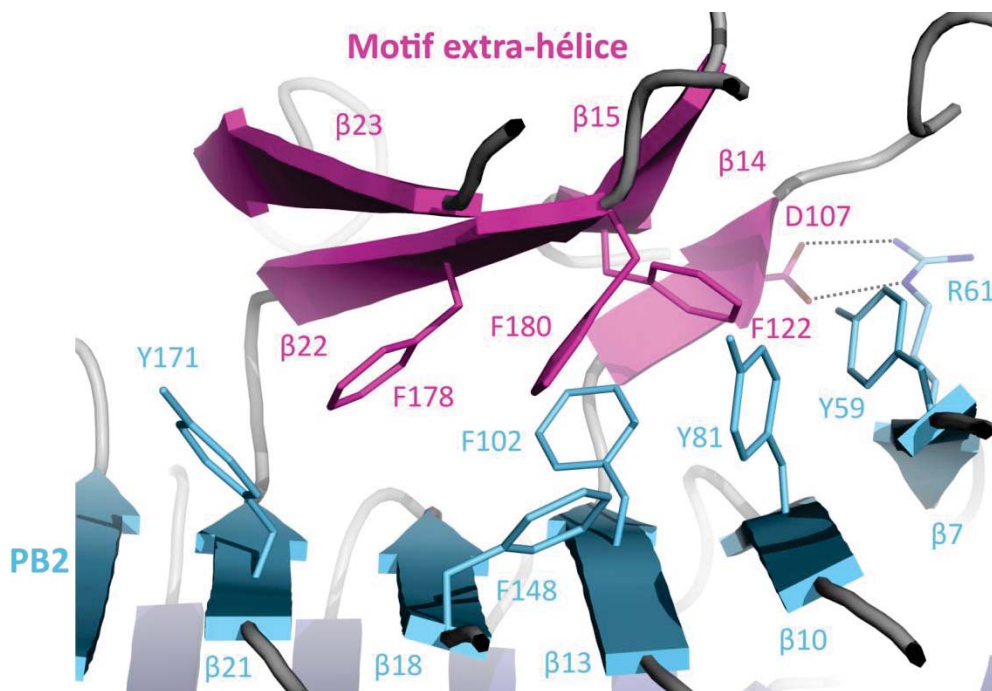


Figure 36. Représentation en ruban et bâtonnets de l'interaction entre le motif extra-hélice et le PB2 de HxuA301. Le motif interagit avec le feuillet PB2 par un pont salin (entre les résidus R61 du brin β 7 et D107 du brin β 14), par un cluster hydrophobe et par un réseau d'interactions aromatique-aromatique impliquant huit résidus : 3 tyrosines (Y59, Y81 et Y171) et 5 phénylalanines (F102, F122, F148, F178 et F180)

1.6. Analyse comparative des structures des protéines TpsA

HxuA301 de *H. influenzae* est la quatrième structure résolue de domaine de sécrétion de TpsA après Fha30 de *B. pertussis* (code PDB : 1RWR) (Clantin *et al.*, 2004), HMW1A-PP de *H. influenzae* (code PDB : 2ODL) (Yeo *et al.*, 2007) et HpmA265 de *P. mirabilis* (code PDB : 3FY3) (Weaver *et al.*, 2009).

et al., 2007; Weaver *et al.*, 2009). La présence d'un tryptophane (W438) dans le dernier tour d'hélice et d'une longue boucle dans l'avant-dernier tour d'hélice empêche l'organisation en dimère de HMW1A-PP.

Les quatre structures de domaine de sécrétion des protéines TpsA présentent un motif extra-hélice commun. Ce motif extra-hélice est constitué de quatre brins- β antiparallèles sauf dans le cas de HMW1A-PP où le premier brin est remplacé par une hélice- α (en jaune dans la figure 37-A). Dans le cas de HxuA301, ce motif interagit avec le PB2 par un réseau d'interactions aromatique-aromatique constitué de huit résidus (Figure 36). Au sein de la sous-famille de HMW1A, un réseau d'interactions aromatique-aromatique aussi étendu est uniquement trouvé chez HxuA. La structure de HMW1A-PP révèle un plus petit réseau impliquant quatre résidus à l'interface entre le motif extra-hélice et le feuillet PB2. Par contre, un tel réseau d'interactions aromatique-aromatique n'est retrouvé ni chez Fha30 ni chez HpmA265.

Les protéines TpsA de la sous-famille de FHA présentent un second motif extra-hélice constitué d'une longue boucle contenant deux brins- β antiparallèles dénommé motif $\beta 7^*/\beta 8^*$ (Figure 37). Ce motif comprend la tétrade NPNL conservée au sein de cette sous-famille et nécessaire à la sécrétion.

L'échelle d'asparagines observée pour HxuA301 (Figure 35) est également présente chez HMW1A-PP au sein des brins $\beta 16$, $\beta 19$, $\beta 24$ et $\beta 27$ comme l'illustre la figure 38 et l'alignement de séquence de la figure 37-B.

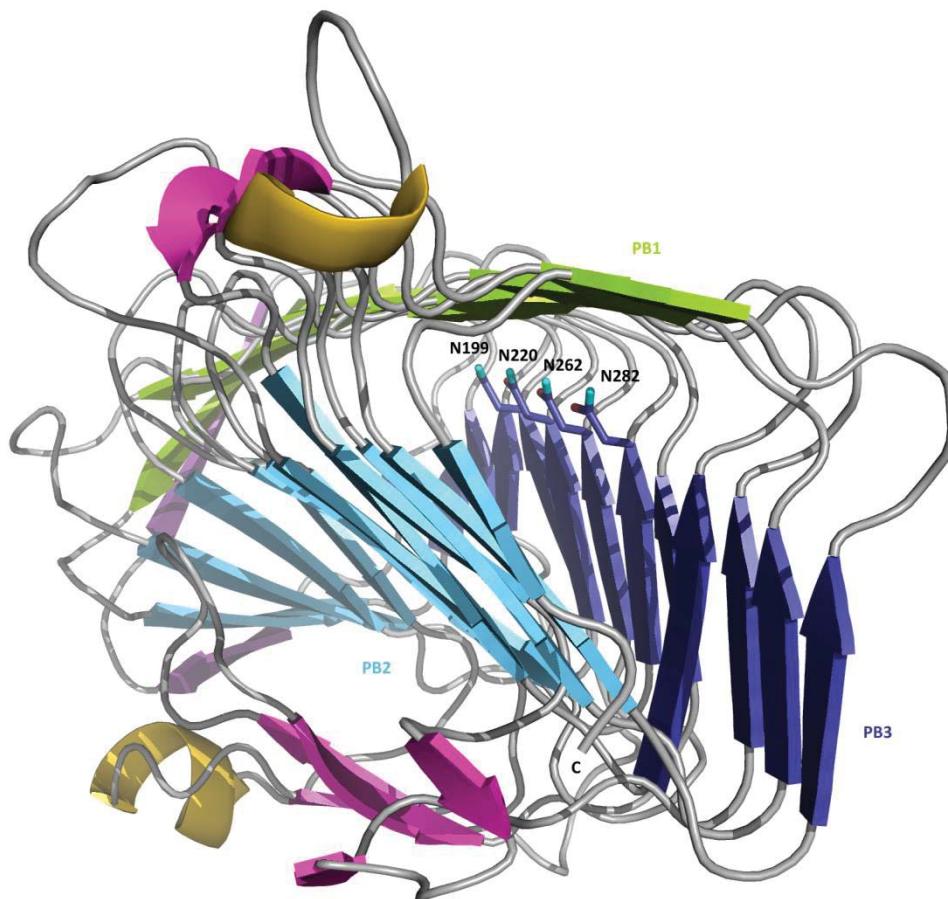


Figure 38. Représentation en ruban et bâtonnets de l'échelle d'asparagines de HMW1A-PP. Les résidus asparagine impliqués sont représentés en bâtonnets et sont annotés (N199, N220, N262 et N282). La numérotation des résidus correspond à celle utilisée dans Yeo *et al*, 2007. Sont également annotés, les trois feuillets- β parallèles PB1, PB2 et PB3 ainsi que l'extrémité C-terminale.

HMW1A-PP, Fha30 et HpmA265 partagent respectivement 30%, 14% et 14% d'identité avec HxuA301. Malgré cette faible identité de séquence, de fortes similarités structurales sont observées entre ces hélices- β . Ainsi les RMSD¹ calculés pour les résidus dont les chaînes latérales sont orientées vers l'intérieur de l'hélice- β (marqués par un triangle noir dans la figure 37-B) sont équivalents à 0,55 Å entre HxuA301 et HMW1A-PP, à 1,41 Å entre HxuA301 et HpmA265 et à 1,29 Å entre HxuA301 et Fha30.

2. Etude structurale de la protéine HxuB

En vue de son étude structurale, le partenaire membranaire HxuB de la protéine HxuA a été produit en membrane externe de la bactérie *Escherichia coli* de souche BL21(DE3)omp5. La forme sauvage

¹ RMSD, *root-mean-square-deviation*, est une mesure permettant de décrire le degré de similarité entre deux protéines et équivaut à la mesure de la distance moyenne entre les atomes de carbone- α correspondants de deux protéines superposées.

(HxuB) et la forme comprenant un tag poly-histidine à l'extrémité N-terminale (HxuB-6his) ont été chacune clonées dans le vecteur d'expression pFLAG-CTS.

Le protocole de production, d'extraction et de purification de la protéine FhaC (Clantin *et al.*, 2007) a été appliqué à HxuB (Figure 39). La production est effectuée à 37°C avec 4 litres de culture induits durant 3 heures avec 1 mM d'IPTG lorsque la densité optique à 600 nm atteint 0,6. Les culots récupérés par centrifugation sont lysés. Deux extractions membranaires utilisant 0,8% et 1,5% de détergent non ionique n-octyl- β -D-glucopyranoside ou β -OG sont appliquées aux débris membranaires des bactéries. La protéine est ensuite purifiée en deux étapes de chromatographie. La première est une chromatographie échangeuse de cations et la seconde une chromatographie d'affinité du tag poly-histidine pour le nickel (Ni^{+2}).

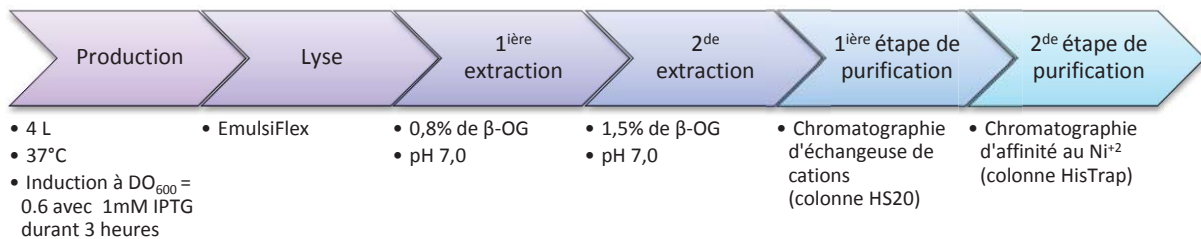


Figure 39. Schéma du protocole de production, d'extraction et de purification de FhaC appliqué à HxuB.

2.1. Production de la protéine HxuB

En appliquant le protocole de production de FhaC à HxuB-6his, la quantité de protéine obtenue après purification est insuffisante pour la cristallogénèse et la formation de corps d'inclusion dans lesquels s'accumule la protéine HxuB-6his est observée (données non présentées). Par conséquent, une optimisation du protocole de production a été nécessaire. Afin d'augmenter la quantité de protéine produite, différents paramètres ont été ajustés. Les tests décrits ci-après ont été réalisés avec des cultures de 100 ml.

Un premier paramètre est la concentration en IPTG. En diminuant cette concentration, on peut parvenir à accroître la proportion de protéine HxuB en membrane externe par rapport à celle retrouvée dans les corps d'inclusion. Différents essais ont été effectués avec des concentrations en IPTG allant de 0,0001mM à 1mM en parallèle d'une culture non induite (Figure 40-A). Les résultats indiquent qu'après purification, HxuB-6his est obtenue en plus grande quantité en membrane externe lorsque la culture est induite avec 0,001mM d'IPTG.

Augmenter la durée d'induction est également un moyen d'augmenter la quantité de protéine produite. Des tests d'induction ont été réalisés, avec 0,001mM d'IPTG, durant une période allant de

RESULTATS

trois à six heures (Figure 40-B). Une durée d'induction de 4 heures améliore significativement la quantité de protéine HxuB-6his obtenue. Au-delà, avec 5 ou 6 heures d'induction, la quantité de protéine obtenue n'augmente plus.

Enfin, parallèlement aux essais d'optimisation de la durée d'induction, l'effet de la présence de 0,5% de D-(+)-glucose dans le milieu de culture a été testé (Figure 40-B). Bien que la présence de glucose dans le milieu de culture n'ait pas d'effet sur la quantité de HxuB-6his observée, elle induit une nette diminution en protéines contaminantes.

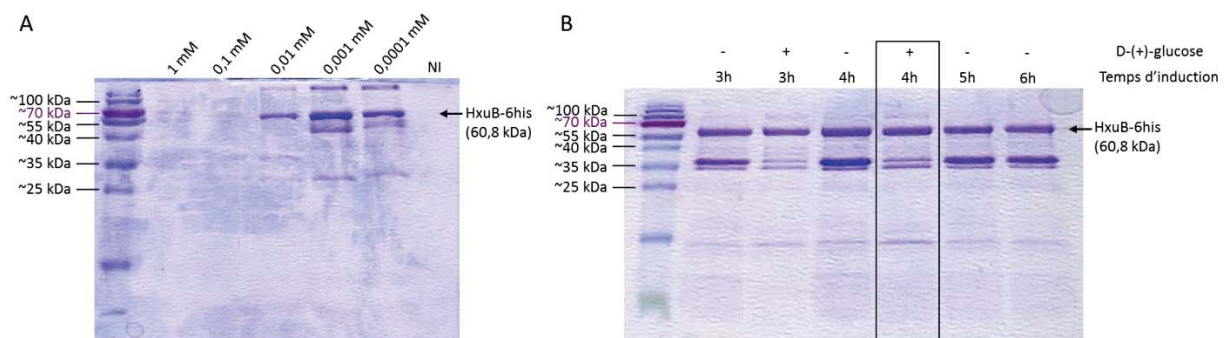


Figure 40. Gels d'électrophorèse (SDS-PAGE) des extraits membranaires (2^{de} extraction) issus des productions d'optimisation de la protéine HxuB-6his (60,8 kDa). (A) Effet de la concentration en IPTG. 1^{ier} puits : marqueur de poids moléculaire. 2^{ième} au 6^{ième} puits : extraits membranaires de productions de la protéine HxuB-6his effectuées avec différentes concentrations en IPTG (induction de 3h). 7^{ième} puits : extrait membranaire d'une culture non induite (NI). (B) Effet de la durée d'induction et de la présence de 0,5% de D-(+)-glucose dans le milieu de culture. 1^{ier} puits : marqueur de poids moléculaire. 2^{ième} au dernier puits : extraits membranaires de productions de la protéine HxuB-6his effectuées avec différents temps d'induction allant de 3 à 6 heures et avec ou sans D-(+)-glucose (0,5%). Dépôt de 10 μ l d'extrait/puits.

En conclusion, la production de la protéine HxuB-6his pour la cristallogénèse est réalisée en milieu de culture (Luria-Bertani) contenant 0,5% de D-(+)-glucose incubée à 37°C et induite avec 0,001mM (ou 1 μ M) d'IPTG pendant 4 heures.

Afin d'obtenir encore plus de protéines HxuB-6his, le volume de culture initialement de 4 litres est triplé.

Les culots bactériens récupérés par centrifugation sont lavés avec du tampon sodium phosphate (20mM, pH 7,0) et congelés avant les étapes de lyse (par EmulsiFlex) et d'extraction membranaire.

2.2. Extraction membranaire de la protéine HxuB

L'extraction membranaire est une technique qui va permettre d'isoler les protéines membranaires de la membrane externe à l'aide de détergent. L'extraction de la protéine HxuB-6his est obtenue à l'aide d'un détergent non ionique, le n-octyl- β -D-glucopyranoside ou β -OG. La propriété amphipathique du détergent va induire une compétition entre le détergent et les constituants de la membrane pour les protéines membranaires (Figure 41). L'extraction est effectuée avec une concentration en détergent

supérieure à la concentration micellaire critique (CMC), spécifique à chaque détergent, qui correspond à la concentration minimale en détergent permettant la formation de micelles.

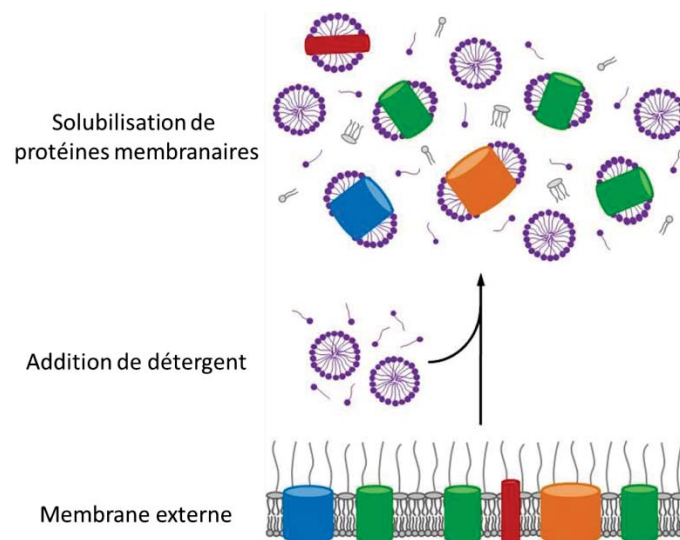


Figure 41. Schématisation du principe d'extraction membranaire en détergent.

Préalablement aux étapes d'extraction membranaire de la protéine HxuB-6his, les culots bactériens sont solubilisés et lysés (EmulsiFlex). Les débris membranaires qui contiennent la protéine d'intérêt sont récupérés par des étapes de centrifugation et d'ultracentrifugation.

La première extraction permet de solubiliser une partie des protéines membranaires contaminantes. La seconde extraction permet la solubilisation en détergent de la protéine HxuB-6his ainsi que d'autres protéines membranaires.

Le protocole d'extraction membranaire de FhaC a été appliqué à HxuB-6his. Ce protocole a très bien fonctionné sur les cultures de mise au point de 100 ml. Lors du passage à des volumes plus importants, l'extraction de la protéine HxuB-6his est apparue moins efficace. Par conséquent, la seconde extraction membranaire a été optimisée.

Un premier paramètre qui peut être ajusté est le pH du tampon de seconde extraction. Sur base d'un échantillon commun, les valeurs de pH 6,0 à 8,0 ont été testées en parallèle (Figure 42-A). L'efficacité d'extraction de HxuB-6his est nettement améliorée avec un pH à 8,0.

Deux autres paramètres ont été testés afin d'améliorer la seconde extraction. En augmentant la concentration en détergent, on est susceptible d'accroître la quantité de protéines extraites. De plus l'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) peut être utilisé pour déstabiliser la membrane externe par chélation des cations de magnésium Mg^{2+} qui stabilisent les molécules de LPS (Figure 42-

RESULTATS

B). L'efficacité d'extraction de HxuB-6his est accrue lorsque sont combinées une concentration en β -OG de 2% et la présence de 2mM d'EDTA à pH 8,0 dans le tampon de seconde extraction.

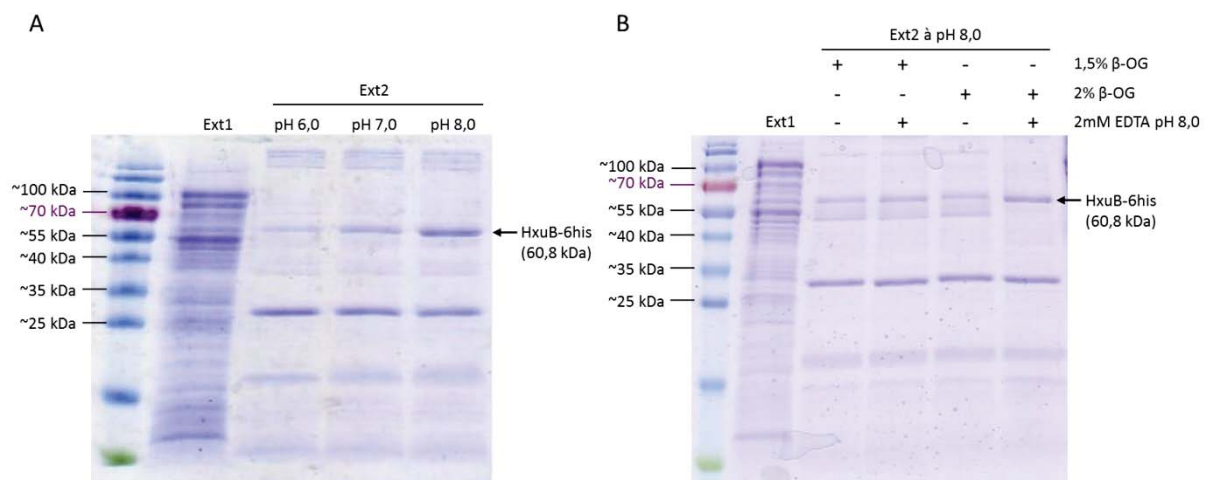


Figure 42. Gels d'électrophorèse (SDS-PAGE) des extractions membranaires d'optimisation de la protéine HxuB-6his (60,8 kDa). (A) Effet du pH. 1^{ier} puits : marqueur de poids moléculaire. 2^{ième} : fraction soluble de la 1^{ière} extraction (Ext1). 3^{ième} au 5^{ième} puits : fractions solubles de la 2^{de} extraction (Ext2) à pH 6,0, 7,0 et 8,0 respectivement. (B) Effet de la concentration en β -OG et de l'EDTA. 1^{ier} puits : marqueur de poids moléculaire. 2^{ième} : fraction soluble de la 1^{ière} extraction. 3^{ième} au 6^{ième} puits : fractions solubles de la 2^{de} extraction à pH 8,0 avec 1,5% ou 2% de détergent (β -OG) et en absence ou en présence de 2mM d'EDTA à pH 8,0. Dépôt de 10 μ l d'extrait/puits.

En conclusion, les conditions de première extraction membranaire de HxuB-6his sont identiques à celles de FhaC (Clantin *et al.*, 2007). Les conditions de seconde extraction ont été optimisées en modifiant le pH qui passe de 7,0 à 8,0, en augmentant la quantité de détergent à 2% de β -OG et en incluant à la solution d'extraction 2mM d'EDTA à pH 8,0.

2.3. Purification de la protéine HxuB

La protéine HxuB-6his est purifiée en deux étapes : une chromatographie échangeuse de cations, qui permettra d'éliminer la majeure partie des contaminants, suivie d'une chromatographie d'affinité. Les tampons utilisés pour les purifications contiennent tous 1% de β -OG afin de maintenir HxuB-6his sous sa forme soluble et repliée.

2.3.1. Etape de chromatographie échangeuse de cations

Préalablement à la purification sur colonne échangeuse de cations, le pH du 2^{ième} extrait membranaire est ajusté à pH 6,0, le point isoélectrique de HxuB-6his étant de 9,3. Après chargement de l'extrait sur la colonne et le lavage de cette dernière, la protéine HxuB-6his est éluée grâce à un gradient de concentration croissante en chlorure de sodium (NaCl). Les fractions contenant la protéine HxuB-6his sont rassemblées pour la seconde étape de purification.

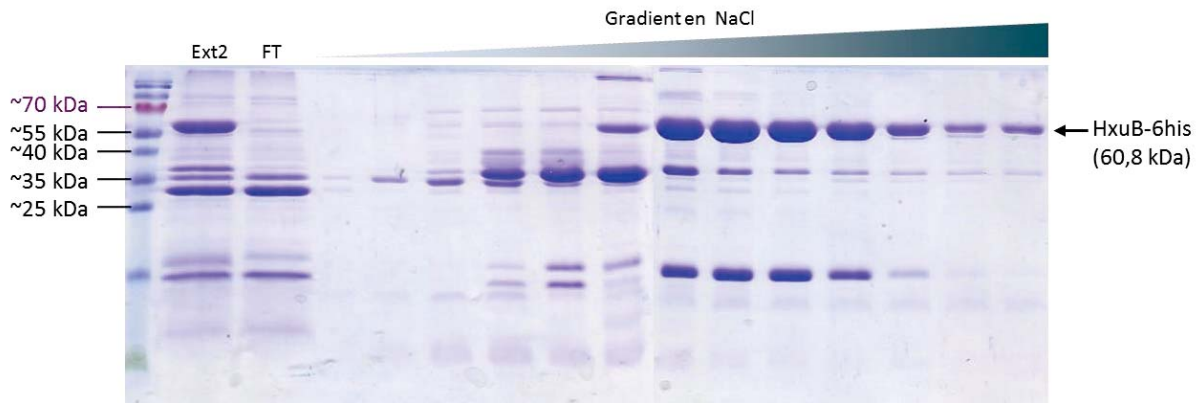


Figure 43. Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) de la première étape de purification de HxuB-6his (60,8 kDa) par chromatographie échangeuse de cations. 1^{er} puits : marqueur de poids moléculaire. 2^{ème} : fraction soluble de la 2^{ème} extraction membranaire mise à pH 6,0 (Ext2) (10 μ l). 3^{ème} puits : *flow through* (FT) (10 μ l). 4^{ème} au dernier puits : fractions obtenues lors de l'élué par un gradient de concentration croissante de 0 à 600 mM NaCl (5 μ l).

2.3.2. Etape de chromatographie d'affinité

La protéine HxuB portant un tag poly-histidine, la seconde étape de purification est une chromatographie d'affinité au nickel.

Lors du premier essai de cette étape de purification, l'élué a été réalisé par un gradient allant de 0 à 500mM d'imidazole à pH 6,5. L'analyse par électrophorèse révèle la présence de divers contaminants élués à plus faible concentration en imidazole comparativement à HxuB-6his (Figure 44).

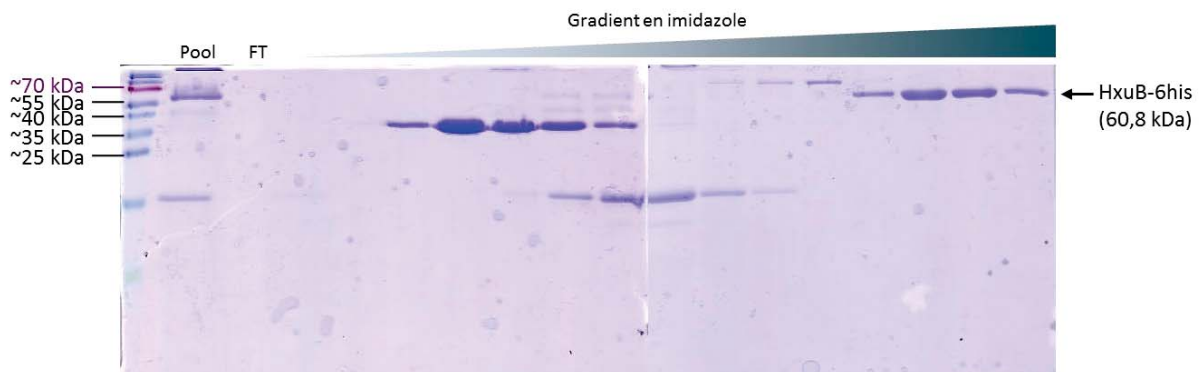


Figure 44. Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) de la seconde étape de purification de HxuB-6his (60,8 kDa) par chromatographie d'affinité (élué en gradient). 1^{er} puits : marqueur de poids moléculaire. 2^{ème} : fractions issues de la chromatographie échangeuse de cations contenant HxuB-6his (pool) (10 μ l). 3^{ème} puits : *flow through* (FT) (10 μ l). 4^{ème} au dernier puits : fractions obtenues lors de l'élué par un gradient de concentration croissante de 0 à 500mM imidazole (10 μ l).

Sur base de ce gradient, le protocole d'élué a été adapté. L'élué est réalisé en trois étapes avec des concentrations en imidazole à pH 6,5 croissantes de 200mM, 260mM et finalement 500mM. Ce protocole permet l'élué de HxuB-6his en dernière étape sous forme pure et plus concentrée que lors du gradient (Figure 45).

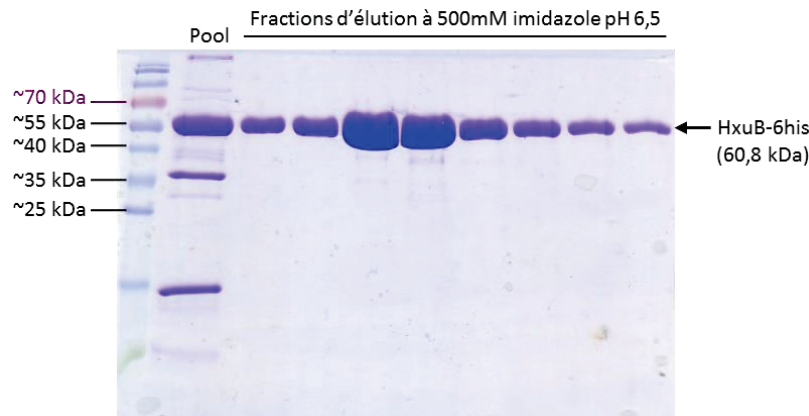


Figure 45. Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) de la seconde étape de purification de HxuB-6his (60,8 kDa) par chromatographie d'affinité (élution par étape). 1^{er} puits : marqueur de poids moléculaire. 2^{ième} : fractions issues de la chromatographie échangeuse de cations contenant HxuB-6his (pool) (5 μ l). 3^{ième} au dernier puits : fractions obtenues lors de la dernière étape de l'élution à 500mM imidazole à pH 6,5 (3 μ l).

A la fin de la purification, la protéine HxuB-6his est récupérée dans le tampon d'élution 1% de β -OG, 20 mM de tampon sodium phosphate pH 7,0 et 500 mM d'imidazole à pH 6,5. Avec 12 litres de culture, on obtient 3mg de protéine HxuB-6his pure.

2.4. Cristallisation de la protéine HxuB

Comme indiqué précédemment, un jeu de données de diffraction aux rayons X à 4 Å de résolution a pu être collecté pour la protéine HxuB sans tag préalablement à ma thèse (Figure 46). Cependant, le problème des phases n'a pu être résolu par remplacement moléculaire sur base de la structure de FhaC, seule protéine TpsB dont la structure cristallographique ait été publiée (code PDB : 2QDZ).

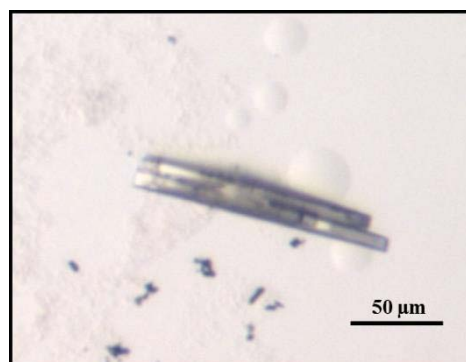


Figure 46. Cristal de la protéine HxuB sans tag diffractant à 4 Å. Les conditions de cristallisation sont les suivantes : 20mM tampon sodium phosphate à pH 7,0, 1% β -OG, 500 mM imidazole à pH 6,5 et 22 % PEG 1000.

D'autres techniques de résolution du problème des phases existent telles que le MAD (*Multi-wavelength Anomalous Diffraction*), le MIR (*Multiple Isomorphous Replacement*) ou le SAD (*Single-wavelength Anomalous Dispersion*). Chacune de ces méthodes requiert la présence de métaux au sein du cristal. La protéine HxuB ne comprend que trois méthionines. La production de HxuB où les

méthionines seraient remplacées par des séléno-méthionines n'a donc pas été entreprise. La présence de métaux au sein de cristaux de protéines peut également se faire par trempage d'un cristal de la protéine native dans une solution contenant un métal donné. Cette technique nécessite l'obtention préalable de cristaux de la protéine d'intérêt. Une dernière technique est la co-cristallisation qui consiste à cristalliser la protéine dans une solution contenant des ions de métaux. Ces deux dernières techniques ont été entreprises.

Pour la méthode de trempage, les conditions d'essais de cristallogenèse se basent sur celle du cristal obtenu pour HxuB sans tag soit : 20mM Na-phosphate à pH 7,0, 1% β -OG, 500 mM imidazole à pH 6,5 et 22 % PEG 1000. Cette condition a été explorée en faisant varier différents paramètres de cristallogenèse repris ci-dessous :

- Température : essais à 4°C et 20°C
- Concentration en imidazole à pH 6,5 allant de 0 à 800 mM
- Crible sur divers agents précipitants de type PEG (polyéthylène glycol) à différentes concentrations : PEG 350 mme (monométhyl éther), PEG 550 mme, PEG 750 mme, PEG 2000 mme, PEG 5000 mme, PEG 400, PEG 1000, PEG 1500, PEG 2000, PEG 4000, PEG 6000 et PEG 10000
- Modification de la dynamique de diffusion gazeuse en variant le volume du réservoir et le rapport volumique au sein de la goutte
- Essais de cristallogenèse avec le kit commercial MembFac (Hampton research) : 48 conditions testés
- Essais de cristallogenèse avec le kit commercial MemGold (Molecular Dimension) : 96 conditions testés
- Essais de cristallogenèse avec des additifs du kit commercial Additive Screen (Molecular Dimension)

Avec le kit MembFac (Hampton research) des cristaux sont apparus mais se sont avérés être des cristaux de sel de zinc lors des essais de diffraction aux rayons X.

Un premier cristal de la protéine HxuB-6his (2,21 mg/ml) a été obtenu dans les conditions suivantes : 20 mM tampon sodium phosphate à pH 7,0, 1% β -OG, 28% PEG 1000, 500 mM imidazole à pH 6,5. Ce cristal n'a pas diffracté sous l'effet des rayons X.

Dans la même boîte de cristallogenèse et après neuf mois d'incubation, quelques cristaux de HxuB-6his (2,21mg/ml) sont apparus dans les conditions suivantes : 20 mM tampon sodium phosphate à pH 7,0, 1% β -OG, 24% PEG 1000, 500 mM imidazole à pH 6,5. Ces cristaux ont été testés au synchrotron SOLEIL sur la ligne de lumière PROXIMA1 (Gif-sur-Yvette). La meilleure résolution mesurée fût de 8 Å soit une résolution plus faible que pour le jeu de données obtenu avec HxuB sans tag. Ces données sont difficilement exploitables.

En parallèle, des essais de co-cristallisation de la protéine HxuB-6his et de métaux lourds ont été réalisés. Les métaux lourds testés sont les suivants : K_2PtCl_4 , $K_2Pt(NO_2)_4$, $AgNO_3$, $Hg(OOCCH_3)_2$, $HgCl_2$, $Pb(NO_3)_2$, CdI_2 , $KAu(CN)_2$, $KAuCl_4$, $Sm(NO_3)_3$. Malheureusement, aucun cristal n'est apparu au cours de ces essais.

Ainsi malgré les nombreux essais de cristallogenèse entrepris pour la protéine HxuB-6his, un nombre faible de cristaux a été obtenu. Parmi ceux-ci, la meilleure résolution de diffraction aux rayons X obtenue est de 8 Å. Toutefois, HxuB-6his ayant été obtenue sous forme repliée et pure, une analyse préliminaire par microscopie a été engagée.

2.5. Analyse de HxuB par microscopie électronique

Un échantillon de la protéine HxuB-6his pure et en détergent a été confié à Daniel Lévy de l'Institut Curie de Paris (UMR CNRS 168). Une analyse par microscopie électronique a été réalisée sur cet échantillon et a permis de mettre en évidence une population hétérogène comprenant deux organisations quaternaires différentes : une organisation homodimérique majoritaire et une organisation homotétramérique minoritaire. Il ne semble pas y avoir de particule de type monomérique (Figure 47).

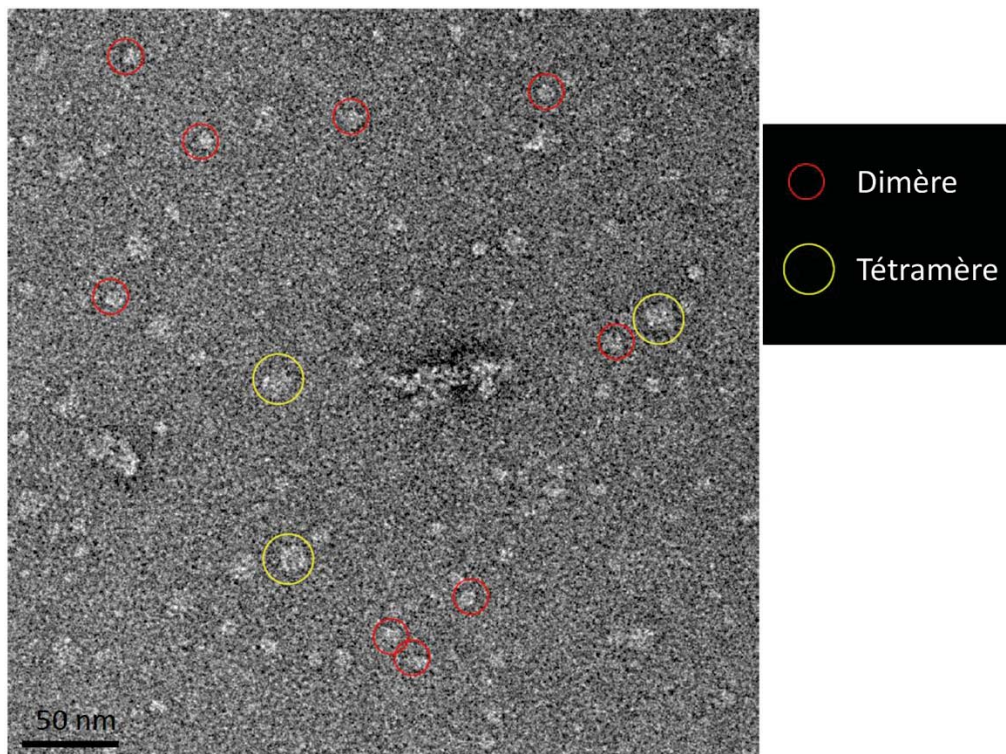


Figure 47. Microscopie électronique sur un échantillon de la protéine HxuB-6his purifiée en détergent. Les deux organisations quaternaires sont mises en évidence : les homodimères majoritaires de dimensions 8x8 nm (cercles rouges) et les homotétramères minoritaires de dimensions 12x12 nm (cercles jaunes). Image obtenue par Daniel Lévy en coloration négative sur un microscope Philips CM120 FEI (120 kV) avec la caméra Gatan SSC 1024x1024 pixels à un agrandissement de 45000X.

Différents facteurs peuvent expliquer l'échec du remplacement moléculaire tels que la déformation du tonneau- β due à sa malléabilité, la faible résolution du jeu de données (4 Å) ou la possibilité que les orientations des domaines POTRA entre eux et par rapport au tonneau- β diffèrent de celles de FhaC.

3. Etude fonctionnelle du système HxuA/HxuB

Plusieurs cas de systèmes comprenant plus d'un TpsA pour un même TpsB ont été décrits dans la littérature. Chez *Haemophilus ducreyi*, la sécrétion des deux TpsA, LspA1 et LspA2, est assurée uniquement par un TpsB commun, LspB (Ward *et al.*, 1998; Ward *et al.*, 2004). Chez *Bordetella bronchiseptica*, le TpsB FhaC sécrète également deux protéines distinctes : FhaB et FhaS partageant 95% d'identité de séquence (Julio and Cotter, 2005). Afin d'étudier la spécificité des systèmes TPS, des essais de complémentation entre trois systèmes de la sous-famille FHA/FhaC avaient été entrepris. Une seule des complémentations réalisées a fonctionné. Il s'agit de la protéine HpmA de *Proteus mirabilis* qui est activée et sécrétée par la protéine membranaire ShIB de *Serratia marcescens* (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1997). Les hémolysines ShIA et HpmA partagent 46,7% d'identité de séquences (Uphoff and Welch, 1990).

Dans le même ordre d'idée, il serait intéressant de connaître la spécificité des systèmes TPS de la sous-famille de HMW1A/HMW1B. Nous avons donc entrepris des essais de complémentation en croisant les systèmes HxuA/HxuB et HMW1A/HMW1B, ce dernier système étant le plus étudié au sein de cette sous-famille.

3.1. Test de sécrétion de HMW1A373 par HxuB

Une version tronquée de la protéine HMW1A avec un tag poly-histidine à son extrémité N-terminale a été utilisée : HMW1A373-6his. Cette dernière comprend les 373 premiers résidus de la protéine ce qui correspond à la taille de la protéine dont la structure cristallographique a été publiée (Yeo *et al.*, 2007).

Pour ce test de sécrétion, la protéine HMW1A373-6his est, soit exprimée seule, soit co-exprimée avec la protéine HxuB (Figure 48).

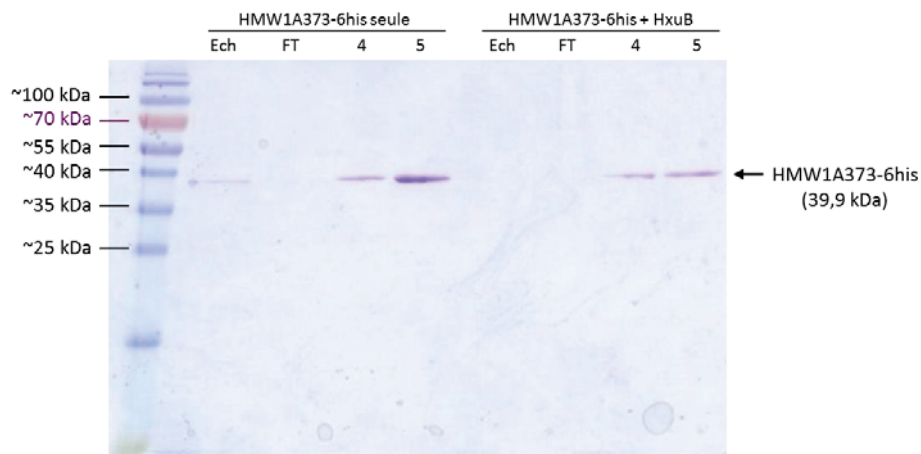


Figure 48. Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) des purifications par chromatographie d'affinité de HMW1A373-6his (39,9 kDa). 1^{er} puits : marqueur de poids moléculaire. Pour HMW1A373-6his produite seule (à gauche) et en présence de HxuB (à droite) ont été déposés sur le gel : le surnageant de culture (Ech) (15 μ l), le *flow through* (FT) (15 μ l) et les deux premières fractions d'éluat (5 μ l).

Contrairement à ce qui était attendu, la protéine HMW1A373-6his est présente dans le surnageant de culture en présence ainsi qu'en absence de la protéine HxuB.

Suite à ce résultat, la même expérimentation a été effectuée pour HxuA301-7his afin de savoir si le même effet serait observé en absence de la protéine HxuB.

3.2. Test d'expression de HxuA301-7his en absence de HxuB

Utilisant le même protocole qu'au point précédent, la protéine HxuA301-7his (pFHxuA_{301-N}) est exprimée en présence ou en absence de HxuB (pCHxuB) (Figure 49).

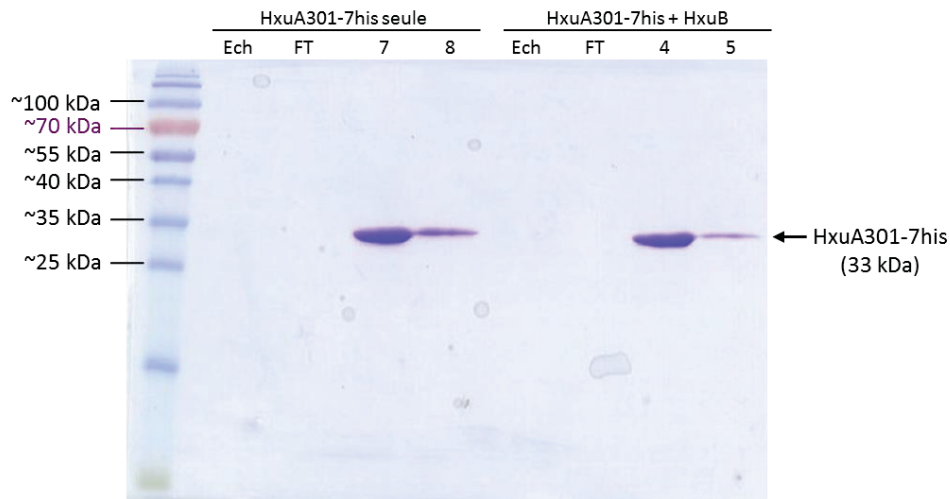


Figure 49. Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) des purifications par chromatographie d'affinité de HxuA301-7his (33 kDa). 1^{er} puits : marqueur de poids moléculaire. Pour HxuA301-7his produite seule (à gauche) et en présence de HxuB (à droite) ont été déposés sur le gel : le surnageant de culture (Ech) (15 μ l), le *flow through* (FT) (15 μ l) et les deux premières fractions d'élution (5 μ l).

Comme pour HMW1A373-6his, la protéine HxuA301-7his est présente dans le surnageant de culture en l'absence de HxuB. Ces protéines sont de plus présentes dans des quantités similaires que ce soit avec ou sans HxuB.

Ces résultats inattendus soulèvent plusieurs questions : sous quelle forme se trouve la protéine HxuA301-7his produite en l'absence de HxuB dans le surnageant de culture et comment s'y est-elle retrouvée ? Afin de répondre à la première question, nous avons voulu caractériser cette protéine. Et, puisque le protocole de cristallisation de HxuA301-7his est maîtrisé, cette méthode de caractérisation a été entreprise.

3.3. Caractérisation de HxuA301-7his produite sans HxuB (HxuA301-noB)

La structure tridimensionnelle de la protéine HxuA301-7his produite en l'absence de HxuB, soit HxuA301-noB, a été déterminée et comparée avec celle de HxuA301-7his (produite en présence de HxuB).

3.3.1. Production, purification et cristallisation de HxuA301-noB

Utilisant le même protocole que pour HxuA301-7his, HxuA301-noB a été produite et purifiée (Figure 50).

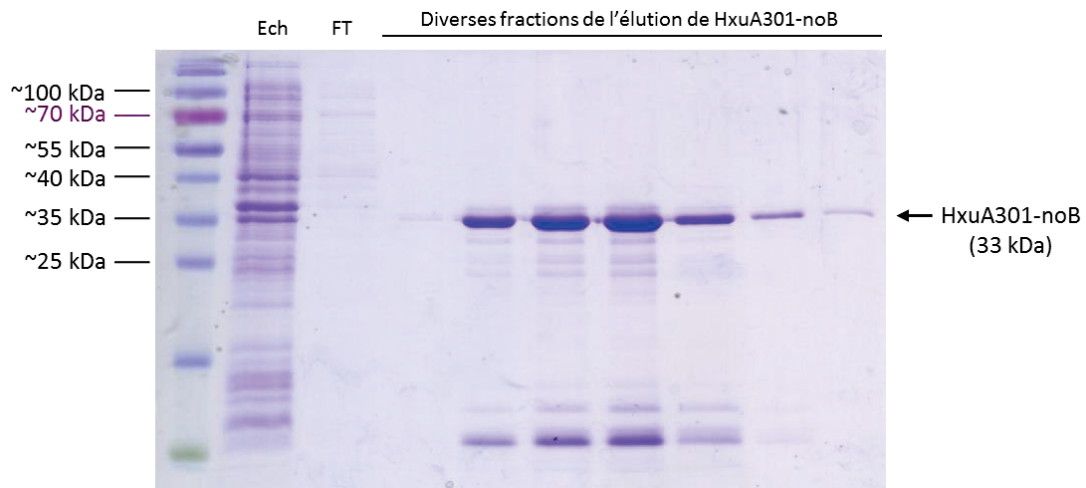


Figure 50. Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) de la purification de HxuA301-noB (33 kDa) par chromatographie d'affinité. 1^{er} puits : marqueur de poids moléculaire. 2^{ième} puits : surnageant de culture (Ech) (15 μ l). 3^{ième} puits : flow through (FT) (15 μ l). 4^{ième} au dernier puits : différentes fractions obtenues lors de l'élution avec 1M d'imidazole à pH 6,5 (2 μ l).

Des cristaux de HxuA301-noB ont été obtenus dans les mêmes conditions de cristallo-genèse que pour HxuA301-7his soit : 0,095M de tri sodium citrate pH5,6, 19% isopropanol, 5% glycérol et 11 à 13% PEG 4000 à une température de 20°C. La taille des cristaux varie entre 75 et 200 μ m

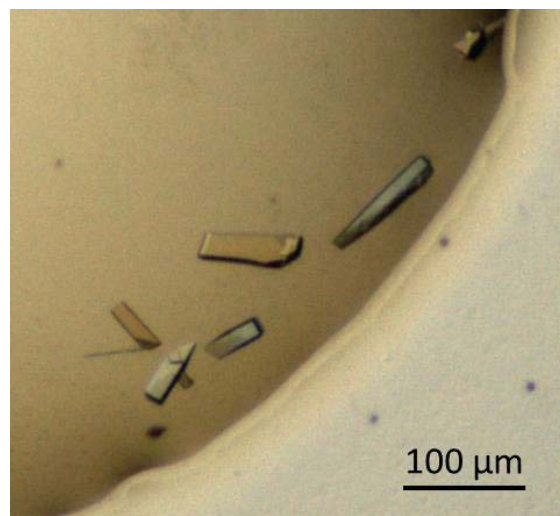


Figure 51. Cristaux de la protéine HxuA301-noB obtenus en goutte suspendue. Conditions de cristallisation avec une protéine à 3mg/ml : 0,095M tri sodium citrate pH 5,6, 19% (v/v) isopropanol, 5% (v/v) glycérol et 12 % (w/v) PEG 4000.

3.3.2. Collecte et traitement des données de diffraction de HxuA301-noB

Les cristaux sont trempés dans une solution cryo-protectrice identique à la solution de cristallo-genèse mais avec 19% de PEG 4000. Plusieurs cristaux ont été testés sur le diffractomètre du laboratoire et une collecte de données a été effectuée sur le meilleur d'entre eux. Un jeu complet de données a été mesuré à une résolution de 2,6 Å au laboratoire et à une résolution de 1,4 Å sur la ligne PROXIMA1 du synchrotron SOLEIL (Table 2).

RESULTATS

Ces données ont été traitées avec le logiciel XDS (Kabsch, 2010) : indexation, intégration et mise à l'échelle. Le problème des phases a été résolu en utilisant la structure de HxuA301-7his comme modèle (code PDB : 4I84).

Table 2. Statistiques de collecte de données et d'affinement de HxuA301-noB. Entre parenthèses se trouvent les valeurs correspondant à la dernière tranche de résolution (2,76-2,60 Å et 1,48-1,40). *Les valeurs statistiques du diagramme de Ramachandran ont été obtenues avec le logiciel Procheck de la suite CCP4 v.6.1.13 (Winn *et al.*, 2011).

Collecte de données	Diffractomètre du laboratoire	Synchrotron SOLEIL
Paramètres de maille (Å)	a=38,83 b=70,80 c=104,91 $\alpha=90,00 \beta=82,03 \gamma=90,00$	a=38,90 b=70,75 c=104,96 $\alpha=90,00 \beta=98,02 \gamma=90,00$
Groupe d'espace	P 2 ₁	P 2 ₁
Générateur de rayons X/Ligne de lumière	Anode tournante NONIUS FR591	PROXIMA1
Longueur d'onde (Å)	1,5418	0,98011
Température (K)	100	100
Détecteur	mar345	PILATUS 6M
Distance cristal-détecteur (mm)	252,041	243,415
Degré de rotation par image (°)	1	0,2
Temps d'exposition par image (s)	480	1,0
Images collectées	163	900
Résolution (Å)	2,60	1,40
No. réflexions		
Observées	57902 (7980)	369979 (56915)
Uniques	17130 (2528)	107873 (16669)
Mosaïcité du cristal (°)	0,115	0,079
Complétude (%)	98,4 (92,7)	97,1 (93,1)
Redondance	3,38 (3,16)	3,43 (3,42)
R _{merge} (I) (%)	18,1 (63,2)	4,1 (55,1)
R _{meas} (%)	21,5 (75,8)	4,9 (65,3)
I/ σ I	6,58 (2,18)	15,68 (2,33)
Affinement		
R _{work} (%)	20,65	20,81
R _{free} (%)	27,87	22,26
Mean B (Å ²)	16,25	24,07
No. d'atomes non-H		
Protéines	4340	4436
Eau	0	314
R.m.s.d.		
Longueurs des liaisons (Å)	0,015	0,009
Angles des liaisons (°)	1,606	1,19
Statistiques de Ramachandran*		
Préférés (%)	95,8	98,5
Autorisés (%)	3,7	1,5
Rejetés (%)	0,5	0,0

3.3.3. Structure de HxuA301-noB

Comme dans le cas de HxuA301-7his, deux molécules de HxuA301-noB sont présentes par unité asymétrique et interagissent par leurs extrémités C-terminales formant une longue hélice- β parallèle main droite. La superposition des structures de HxuA301-7his et de HxuA301-noB montre bien que les deux structures se confondent (RMSD=0,219 Å) et que les deux protéines se structurent à l'identique (Figure 52).

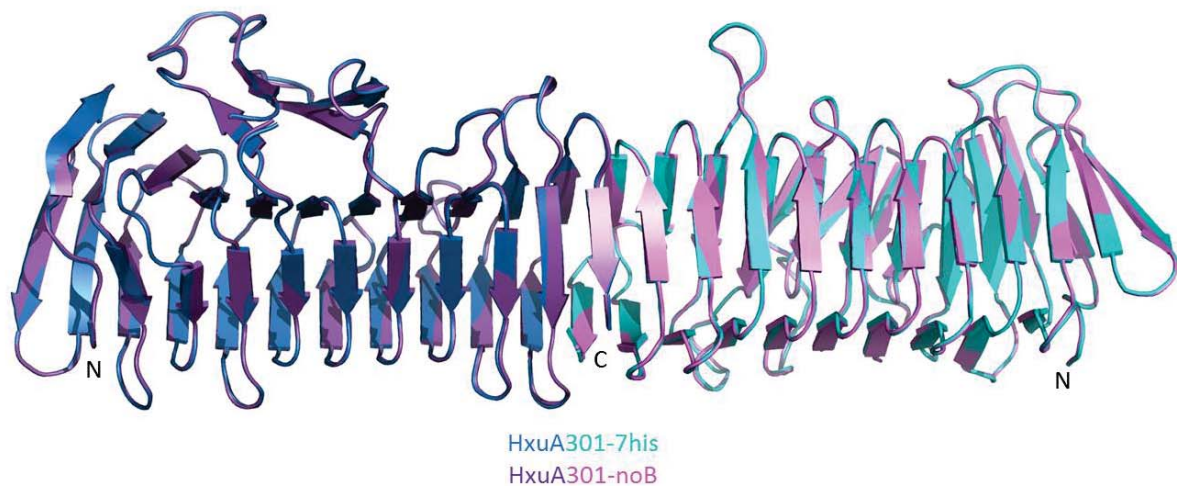


Figure 52. Superposition des structures de HxuA301-7his (bleu foncé et bleu ciel) et HxuA301-noB (violet et rose). Les structures des deux protéines se confondent. Toutes deux ont une structure homodimérique via l'interaction de leurs extrémités C-terminales respectives.

Ces résultats montrent que la protéine HxuA301 est capable de se replier correctement sans l'intervention de la protéine HxuB. Par conséquent, HxuB n'est pas nécessaire au repliement de HxuA301.

Mais comment la protéine HxuA301 se retrouve-t-elle dans le milieu extracellulaire (ou surnageant de culture dans notre cas) ? Deux hypothèses peuvent être explorées: soit HxuA301 est sécrétée par une autre protéine de la membrane externe d'*E. coli*, soit la présence de HxuA301 dans le surnageant de culture résulte d'une lyse bactérienne.

Afin d'être certain que la protéine HxuA301-7his a bien franchi la membrane interne de la bactérie, la présence ou non du peptide signal a été vérifiée par spectrométrie de masse. La bande correspondante à HxuA301-7his découpée d'un gel SDS-PAGE est traitée à la trypsine et les peptides obtenus sont analysés par spectrométrie de masse. Pour la protéine HxuA301-7his comprenant encore un peptide signal, les peptides de masse de 1902 Da et de 1263 Da doivent être détectés. Pour la protéine HxuA301-7his sans peptide signal, seul le peptide de masse de 1263 Da doit être

RESULTATS

déecté. L'analyse a été effectuée pour HxuA301-7his produite avec et sans HxuB. Dans les deux cas seul le peptide de masse de 1263 Da est détecté indiquant le peptide signal a bien été clivé. Ce résultat a été confirmé par une analyse MALDI-TOF Ultraflex (Bruker) pour laquelle la masse totale obtenue correspond à celle de HxuA301-7his sans peptide signal. Par conséquent, la protéine a bien traversé la membrane interne.

Avant d'approfondir les deux hypothèses pouvant expliquer la présence de HxuA301-noB dans le surnageant de culture, nous avons voulu savoir si ce phénomène n'était pas souche-dépendant.

3.4. Test d'expression dans d'autres souches d'*E. coli*

Ainsi, le même test d'expression a été effectué dans les souches BL21(DE3) pour HxuA301-7his et HMW1A373-6his (Figure 53) ainsi que dans la souche UT5600 pour HxuA301-7his (Figure 54). La souche UT5600 est celle utilisée pour l'étude fonctionnelle du système FHA/FhaC.

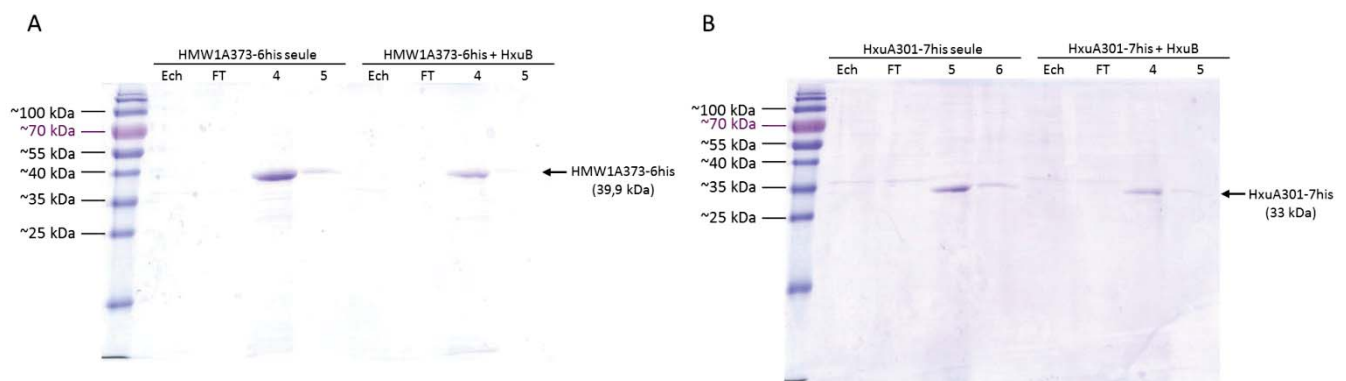


Figure 53. Gels d'électrophorèse (SDS-PAGE) des purifications par chromatographie d'affinité de (A) HMW1A373-6his (39,9 kDa) et (B) HxuA301-7his (33 kDa) produites en souche BL21(DE3). Pour chacun des deux gels : 1^{er} puits : marqueur de poids moléculaire. Pour les protéines produites seules (à gauche) et en présence de HxuB (à droite) ont été déposés sur le gel : le surnageant de culture (Ech) (15 μ l), le *flow through* (FT) (15 μ l) et les deux premières fractions d'élution (5 μ l).

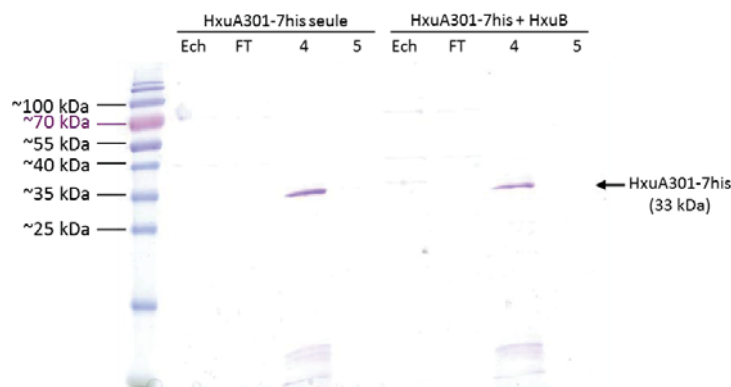


Figure 54. Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) des purifications par chromatographie d'affinité de HxuA301-7his (33 kDa) produite en souche UT5600. 1^{er} puits : marqueur de poids moléculaire. Pour HxuA301-7his produite seule (à gauche) et en présence de HxuB (à droite) ont été déposés sur le gel : le surnageant de culture (Ech) (15 μ l), le *flow through* (FT) (15 μ l) et les deux premières fractions d'élution (5 μ l).

Quelle que soit la souche d'*E. coli* utilisée, on observe la présence de HxuA301-7his ou de HMW1A373-6his dans le surnageant de culture en l'absence de HxuB indiquant que ce phénomène n'est pas souche-dépendant.

Avant d'entreprendre la recherche et l'identification d'une autre OMP, l'hypothèse de la lyse bactérienne a été testée. Cette hypothèse est en effet plus facile à mettre à l'épreuve.

3.5. Etude de l'hypothèse de lyse bactérienne lors de la production de HxuA301-noB

Afin d'observer une éventuelle lyse cellulaire, un suivi morphologique des bactéries par microscopie a été réalisé avant induction et à différents temps après induction. La technique de microscopie utilisée est une technique de microscopie de contraste différentiel interférentiel ou DIC (*Differential Interference Contrast*) qui a l'avantage de donner du contraste à des spécimens vivants et transparents et ce même sans coloration (voir partie Matériels et Méthodes point 5.2). La densité optique de la culture bactérienne est mesurée en parallèle.

L'expérience a été réalisée à partir d'une culture de production de la protéine HxuA301-noB (pFHxuA_{301-N}) (Figure 55).

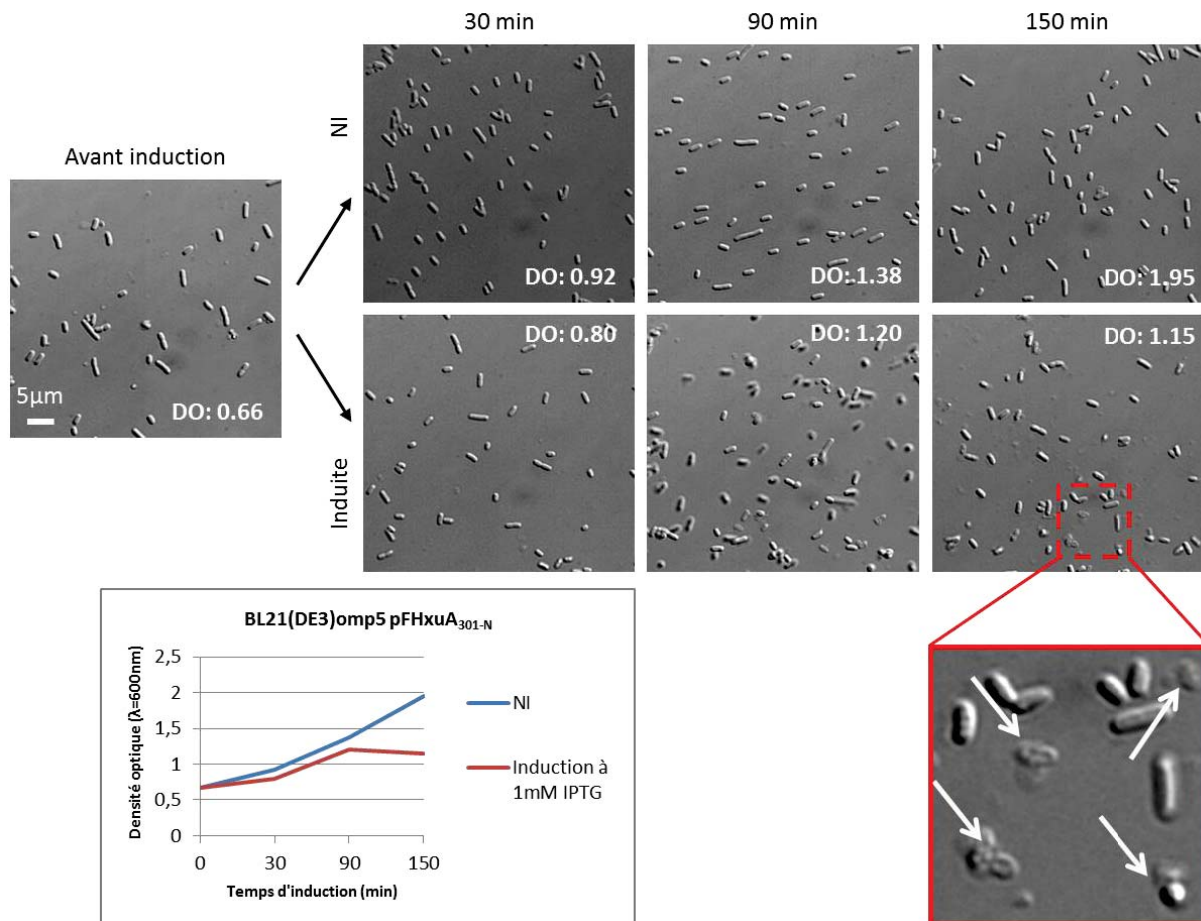


Figure 55. Suivi morphologique par microscopie de contraste DIC sur une culture de production de HxuA301-noB et courbes de densité optique de la culture et de son contrôle non induit en fonction du temps (BL21(DE3)omp5 pFHxuA_{301-N}). Une première image est prise avant induction (à gauche). Lorsque la densité optique atteint 0,66 ($\lambda=600\text{nm}$), la culture est divisée en deux : une moitié est non induite (NI) et l'autre induite avec 1mM d'IPTG. Des images sont prises à différents temps pour les deux cultures : 30, 90 et 150 minutes. La densité optique (DO) est mesurée pour chaque prélèvement, indiquée sur l'image correspondante et reprise dans le graphique. L'image encadrée en rouge est un agrandissement de l'image obtenue après 150 minutes d'induction. Les bactéries en cours de lyse sont indiquées par des flèches blanches.

Le suivi morphologique montre que d'une part, les bactéries de la culture non induite ne subissent aucune modification et que d'autre part, la culture induite présente un grand nombre de bactéries en cours de lyse (encadré rouge) après 150 minutes d'induction. De plus, la densité optique de la culture induite est plus faible que celle de la culture contrôle non induite et diminue lors de la dernière mesure (Figure 55). Lors de la production de HxuA301-noB, un évènement de lyse a donc lieu.

Cette fuite bactérienne constitue un problème majeur pour l'étude fonctionnelle du système HxuA/HxuB justifiant l'importance portée à la résolution de celui-ci.

3.6. Mise au point de la production de HxuA301 exempte de lyse

Afin d'obtenir un système fonctionnel, des ajustements sur plusieurs paramètres ont été envisagés. On sait déjà que la fuite bactérienne de HxuA301-7his n'est pas souche-dépendante mais d'autres facteurs tels que le vecteur d'expression, la position du tag poly-histidine ou les conditions de culture peuvent avoir un impact.

3.6.1. Effet du vecteur d'expression

En produisant la protéine HxuB avec le vecteur pCOLADuet-1 à la place du vecteur pFLAG-CTS, la formation de corps d'inclusion diminuait et la quantité de protéines HxuB en membrane externe augmentait. L'utilisation du vecteur pCOLADuet-1 permettrait donc une production protéique moins rapide ou moins intense. Dans le cas de HxuA301, on peut se demander si la lyse bactérienne est provoquée par le vecteur d'expression trop puissant qu'est le pFLAG-CTS ou par la protéine HxuA301. Par conséquent, l'expérimentation de suivi morphologique par microscopie et du suivi de la densité optique est réitérée avec le vecteur pCHxuA_{301-N}-HxuB_{His tag} (Figure 56).

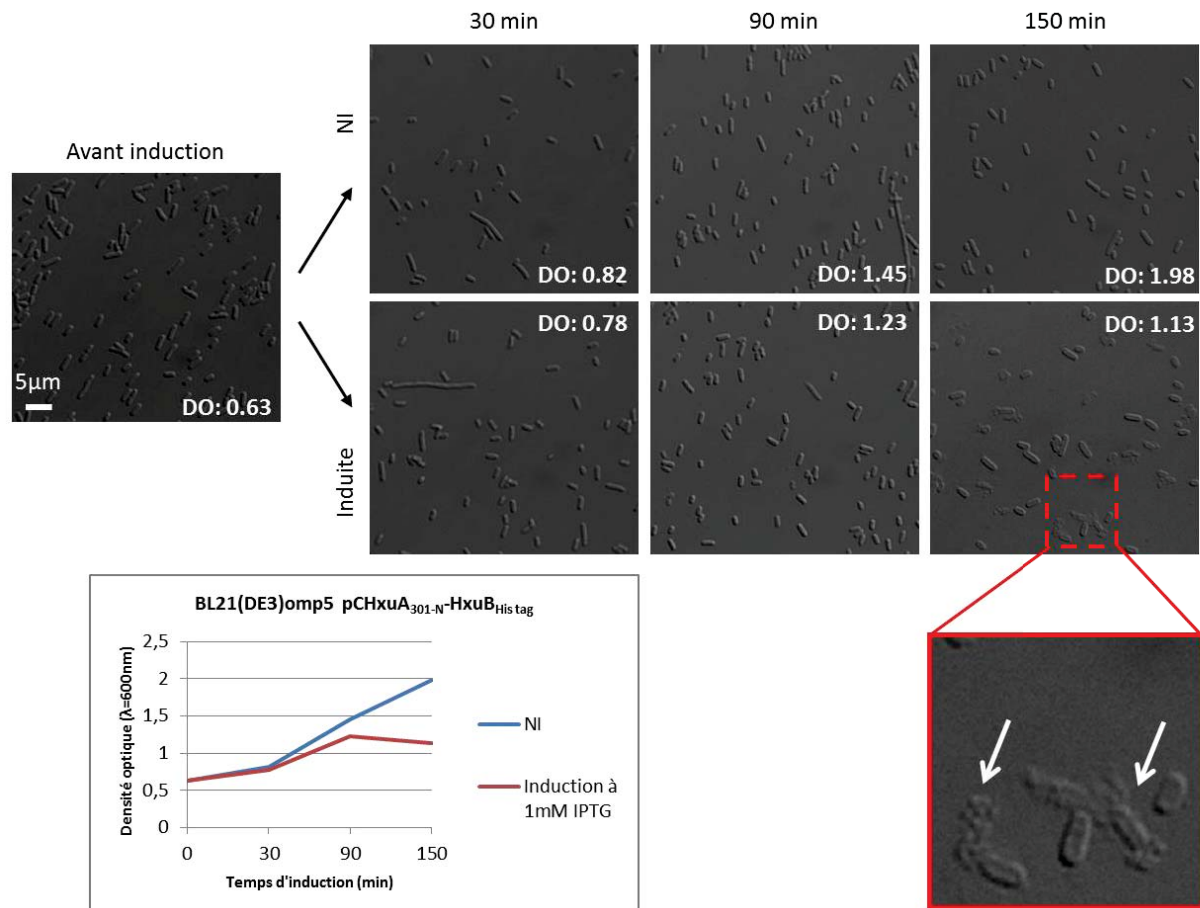


Figure 56. Suivi morphologique par microscopie de contraste DIC sur une culture de production de HxuA301-7his en présence de HxuB-6his et courbes de densité optique de la culture et de son contrôle non induit en fonction du temps (BL21(DE3)omp5 pCHxuA_{301-N}-HxuB_{His tag}). Une première image est prise avant induction (à gauche). Lorsque la densité optique atteint 0,63 ($\lambda=600\text{nm}$), la culture est divisée en deux : une moitié est non induite (NI) et l'autre induite avec 1mM d'IPTG. Des images sont prises à différents temps pour les deux cultures : 30, 90 et 150 minutes. La densité optique (DO) est mesurée pour chaque prélèvement, indiquée sur l'image correspondante et reprise dans le graphique. L'image encadrée en rouge est un agrandissement de l'image obtenue après 150 minutes d'induction. Les bactéries en cours de lyse sont indiquées par des flèches blanches.

L'utilisation du vecteur pCOLADuet-1 donne des résultats similaires à ceux obtenus avec pFLAG-CTS. En effet, la lyse bactérienne est observable après 150 minutes pour la culture induite. De plus, la densité optique de la culture induite est plus faible que pour la culture de contrôle et diminue lors de la dernière mesure (Figure 56). Il semblerait donc que le changement de vecteur n'apporte pas d'effet bénéfique.

3.6.2. Effet de la position du tag poly-histidine

Lors des productions précédentes, la protéine HxuA301 portait un tag poly-histidine à son extrémité N-terminale. Afin de vérifier si la position du tag pouvait avoir un effet sur la fuite bactérienne, une construction avec un tag poly-histidine à l'extrémité C-terminale de HxuA301 a été réalisée (pFHxuA_{301-C}). Un essai de production est effectué en absence et en présence de HxuB (pCHxuB) (Figure 57).

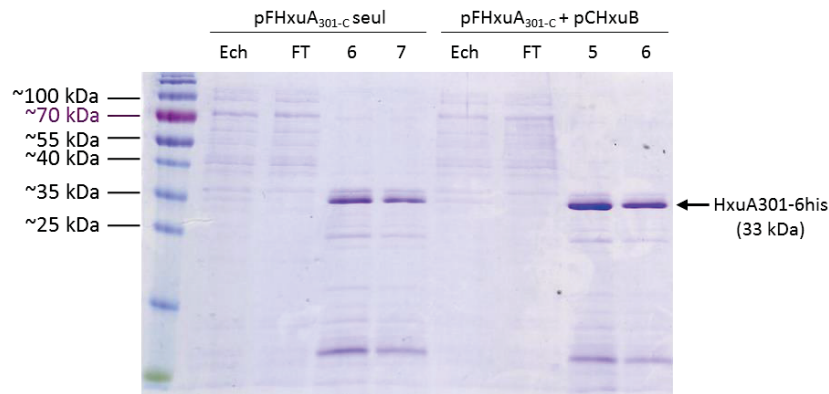


Figure 57. Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) des purifications par chromatographie d'affinité de HxuA301-6his (33 kDa) produit avec le vecteur pFHxA_{301-C} et, sans ou avec, le vecteur pCHxUB (induction avec 1mM IPTG). 1^{ier} puits : marqueur de poids moléculaire. Pour HxuA301-6his produite seule (à gauche) et en présence de HxuB (à droite) ont été déposés sur le gel : le surnageant de culture (Ech) (15µl), le *flow through* (FT) (15µl) et les deux premières fractions d'élution (5µl).

En produisant HxuA301-6his avec le vecteur pFHxA_{301-C} en l'absence de HxuB, HxuA301-6his est présente dans le surnageant de culture. Toutefois, la quantité de HxuA301-6his semble être inférieure à celle détectée en présence du partenaire HxuB.

3.6.3. Effet de la concentration en IPTG

Afin de réduire la quantité de protéine HxuA301-6his présente dans le surnageant de culture en absence de HxuB, des essais d'induction à différentes concentrations en IPTG allant de 0,001mM à 1mM ont été réalisés.

Que ce soit avec ou sans HxuB, seule l'induction à 0,001mM en IPTG permet d'obtenir des courbes de densités optiques proches de celles des cultures non induites. Pour les autres cultures, les densités optiques tendent à stagner voire à décroître signe d'une lyse bactérienne.

Les surnageants des cultures induites à 0,001mM ont été purifiés par chromatographie d'affinité et les résultats analysés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE (Figure 58).

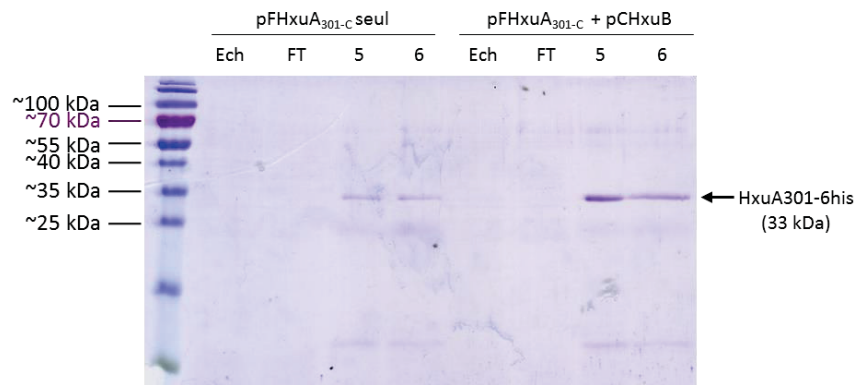


Figure 58. Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) des purifications par chromatographie d'affinité de HxuA301-6his (33 kDa) produit avec le vecteur pFHxuA_{301-C} et, sans ou avec, le vecteur pCHxuB (induction avec 0,001mM IPTG). 1^{er} puits : marqueur de poids moléculaire. Pour HxuA301-6his produite seule (à gauche) et en présence de HxuB (à droite) ont été déposés sur le gel : le surnageant de culture (Ech) (15µl), le *flow through* (FT) (15µl) et les deux premières fractions d'éluion (5µl).

La quantité de HxuA301-6his présente dans le surnageant de culture en absence de HxuB diminue comparativement à l'essai à 1mM (Figure 57). Afin d'améliorer ce résultat, deux autres essais ont été réalisés. Un premier où la concentration en IPTG a été réduite à 0,0001mM et un second où le temps d'induction a été réduit à deux heures. Dans les deux cas, les résultats obtenus sont similaires à celui obtenu pour une induction de trois heures avec 0,001mM d'IPTG (Figure 58).

3.6.4. Effet du vecteur d'expression associé aux nouvelles conditions

Comme indiqué précédemment, le vecteur d'expression pCOLADuet-1 semble permettre une production en protéine moins rapide ou moins intense dans le cas de la production de la protéine HxuB. Nous avons voulu déterminer si, avec les nouvelles conditions de production de la protéine HxuA301-6his, le vecteur pCOLADuet-1 pouvait être bénéfique. Par conséquent, deux constructions ont été réalisées, l'une avec et l'autre sans le partenaire HxuB : pCHxuA_{301-C} et pCHxuA_{301-C}-HxuB.

Les cultures réalisées avec ces constructions ont été induites trois heures avec 0,001mM d'IPTG. Les densités optiques sont mesurées pour les cultures induites et les cultures contrôles non induites (Figure 59). Les résultats de purification sont analysés sur gel d'électrophorèse (Figure 60).

RESULTATS

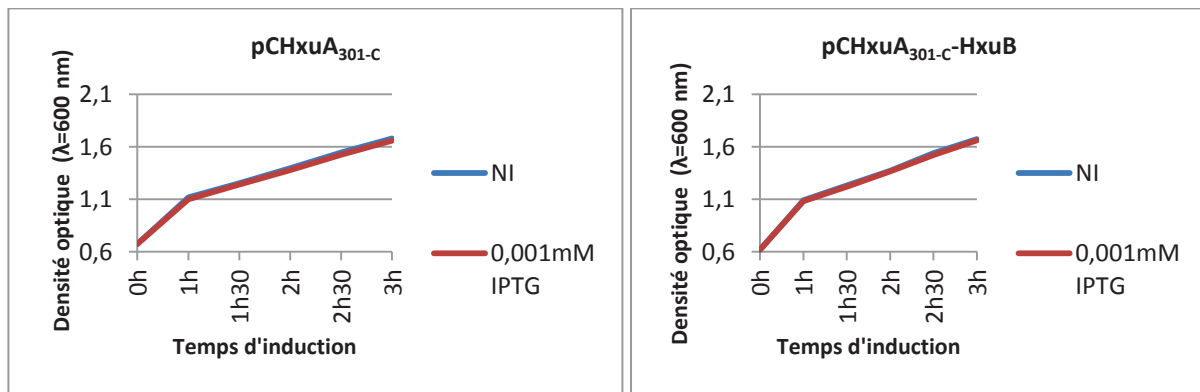


Figure 59. Courbes de densité optique ($\lambda=600\text{nm}$) des cultures de production de HxuA301-6his en absence (à gauche, pCHxuA_{301-c}) ou présence de HxuB (à droite, pCHxuA_{301-c}-HxuB). Les densités optiques ont été mesurées pour les cultures non induites (NI) et induites avec 0,001mM d'IPTG à différents temps.

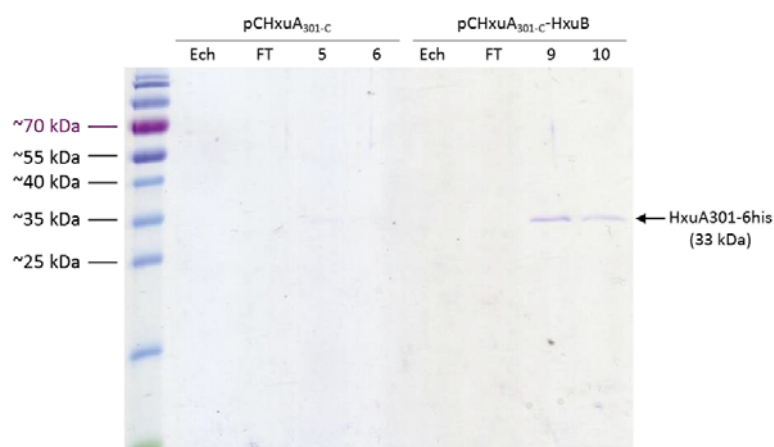


Figure 60. Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) des purifications par chromatographie d'affinité de HxuA301-6his (33 kDa) produit sans ou avec HxuB (induction avec 0,001mM IPTG). 1^{er} puits : marqueur de poids moléculaire. Pour HxuA301-6his produite seule (à gauche) et en présence de HxuB (à droite) ont été déposés sur le gel : le surnageant de culture (Ech) (15 μ l), le flow through (FT) (15 μ l) et les deux premières fractions d'éluion (5 μ l).

Que ce soit avec ou sans le partenaire HxuB, les courbes de croissance des cultures induites sont très proches de celles des cultures contrôles non induites. De plus, au regard du gel d'électrophorèse, on constate que sans le partenaire HxuB une infime quantité de HxuA301-6his est présente dans le surnageant de culture comparativement à la quantité retrouvée dans le surnageant de culture obtenu en présence de HxuB.

Nous sommes donc parvenus à mettre au point un protocole de production de la protéine HxuA301-6his avec lequel une étude fonctionnelle peut être engagée.

3.7. Croisements entre systèmes TPS

Pour rappel, c'est sur base d'un essai de sécrétion de la protéine HWM1A373 par HxuB, que le problème de fuite des protéines TpsA HxuA301 et HMW1A373 en absence de TpsB a été décelé (Figure 48 et Figure 49). Suite à la mise au point d'un système fonctionnel pour HxuA301-6his et

RESULTATS

HxuB décrite ci-dessus, la construction pCHmw1A_{373-C} a été réalisée et testée en production (Figure 61).

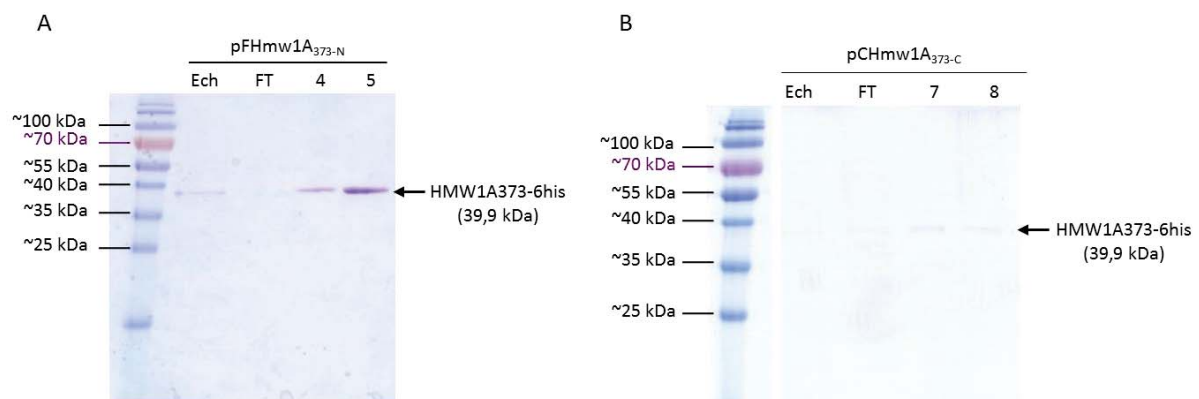


Figure 61. Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) des purifications par chromatographie d'affinité de HMW1A373-6his (39,9 kDa). (A) Production avec le vecteur pFHmw1A_{373-N} et induite avec 1mM IPTG (B) Production avec le vecteur pCHmw1A_{373-C} et induite avec 0,001mM IPTG. (A-B) 1^{ier} puits : marqueur de poids moléculaire ; 2^{ème} puits : surnageant de culture (Ech) (15µl) ; 3^{ème} puits : flow through (FT) (15µl) ; deux derniers puits : les deux premières fractions d'élution (5µl).

Une nette diminution de la présence de HMW1A373-6his dans le surnageant de culture est constatée avec ce nouveau vecteur et une concentration en IPTG ajustée à 0,001mM. Une construction en pCOLADuet-1 comprenant un partenaire TpsB en plus de HMW1A373-6his permettra de réaliser des essais fonctionnels.

Discussion et perspectives

1. La protéine HxuA

La structure de la protéine HxuA301 produite en présence de son partenaire HxuB a été résolue. Il s'agit d'une hélice- β parallèle main droite. Il s'est avéré que la protéine HxuA301 pouvait également être produite dans le surnageant de culture en l'absence de son partenaire HxuB (HxuA301-noB). La caractérisation structurale de HxuA-noB révèle une structure tridimensionnelle identique à celle de HxuA301 produite en présence de son partenaire. La présence de HxuA301-noB dans le surnageant de culture est due à une lyse bactérienne. Par conséquent, le repliement de HxuA301-noB n'a pas été assisté. Cette observation est une première au sein des systèmes TPS qui démontre que le partenaire HxuB n'est pas nécessaire au repliement du domaine TPS de HxuA et que les événements de sécrétion et de repliement de la protéine TpsA se réalisent de manière indépendante.

De plus, ce repliement autonome de HxuA301 appuie l'hypothèse selon laquelle le repliement du domaine TPS initie le repliement du reste de la protéine, aussi appelée hypothèse du *scaffold*. Cette hypothèse est en accord avec les observations réalisées sur HpmA. En effet, une forme inactivée par ultrasonication de la protéine HpmA entière est rendue active, et par conséquent repliée, lorsqu'elle est mise en présence de la version tronquée et repliée de HpmA (HpmA265) (Weaver *et al.*, 2009)

Historiquement, le premier modèle qui tient compte de l'hypothèse du *scaffold* fût proposé en 2004 dans la publication de la structure cristallographique du domaine TPS de FHA, Fha30 (Clantin *et al.*, 2004). Ce modèle a été construit sachant que la protéine TpsA traverse la membrane externe en conformation étendue et se replie à la surface bactérienne (Guédin *et al.*, 1998; Hodak *et al.*, 2006). Ce modèle linéaire est représenté à la figure 62. Notons qu'en 2004, la topologie de FhaC n'était pas établie expliquant l'absence de la modélisation des domaines POTRA.

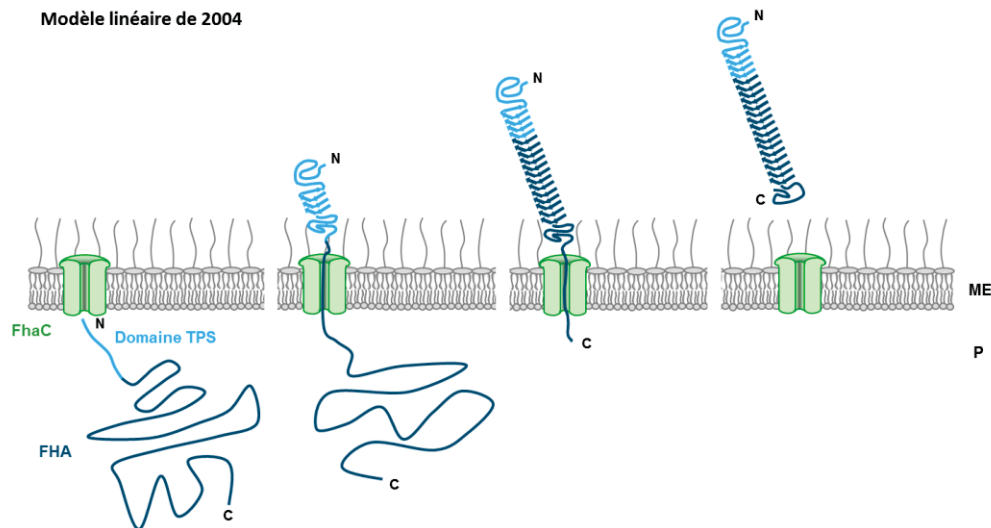


Figure 62. Modèle linéaire de la sécrétion de FHA par FhaC (2004). De gauche à droite, le domaine TPS de FHA initie la translocation. Le domaine TPS émerge le premier à la surface bactérienne et initie le repliement progressif de FHA à la surface bactérienne (*scaffold*). La protéine est ensuite relâchée dans le milieu extracellulaire. ME, membrane externe ; P, périplasme ; N, extrémité N-terminale ; C, extrémité C-terminale.

En 2006, J. Mazar et P.A. Cotter proposent un autre modèle de sécrétion, le modèle en *hairpin* (Mazar and Cotter, 2006). En effet, leurs résultats montrent que l'extrémité N-terminale de FHA n'est détectable dans le milieu extracellulaire que lorsque la protéine FHA est relâchée de la surface bactérienne tandis que l'extrémité C-terminale est détectée au cours de la sécrétion. Selon ce modèle, l'extrémité N-terminale de FHA interagit avec le domaine POTRA de FhaC (la présence du second domaine POTRA de FhaC n'était pas encore établie). Cette interaction initie la sécrétion par la formation d'une *hairpin* dans le canal de FhaC permettant le repliement progressif de FHA à la surface bactérienne. Une fois l'extrémité C-terminale repliée, l'extrémité N-terminale est relâchée et à son tour repliée (Figure 63-A).

En 2007, la structure de HMW1A-PP est résolue (Yeo *et al.*, 2007). En plus de la structure de cette protéine, l'article présente un alignement de séquences basé sur les structures de Fha30 et HMW1A-PP qui met en évidence la subdivision en deux sous-familles des systèmes TPS. Des modèles de mécanisme de sécrétion distincts ont été proposés pour chacune des deux sous-familles (Figure 63) (Mazar and Cotter, 2007). En effet, dans le cas de la protéine HMW1A, le domaine N-terminal du TpsA, HMW1A-PP, est naturellement clivé du reste de la protéine en cours de sécrétion et relâché dans le milieu extracellulaire. La protéine mature est maintenue dans le pore de HMW1B par son extrémité C-terminale comprenant un pont disulfure (Figure 25) (Buscher *et al.*, 2006; St Geme and Yeo, 2009). Dans la même sous-famille, la protéine HxuA est maintenue de la même manière dans le pore de HxuB (Wong *et al.*, 1995; Fournier *et al.*, 2011). Le modèle linéaire est donc plus probable pour cette sous-famille.

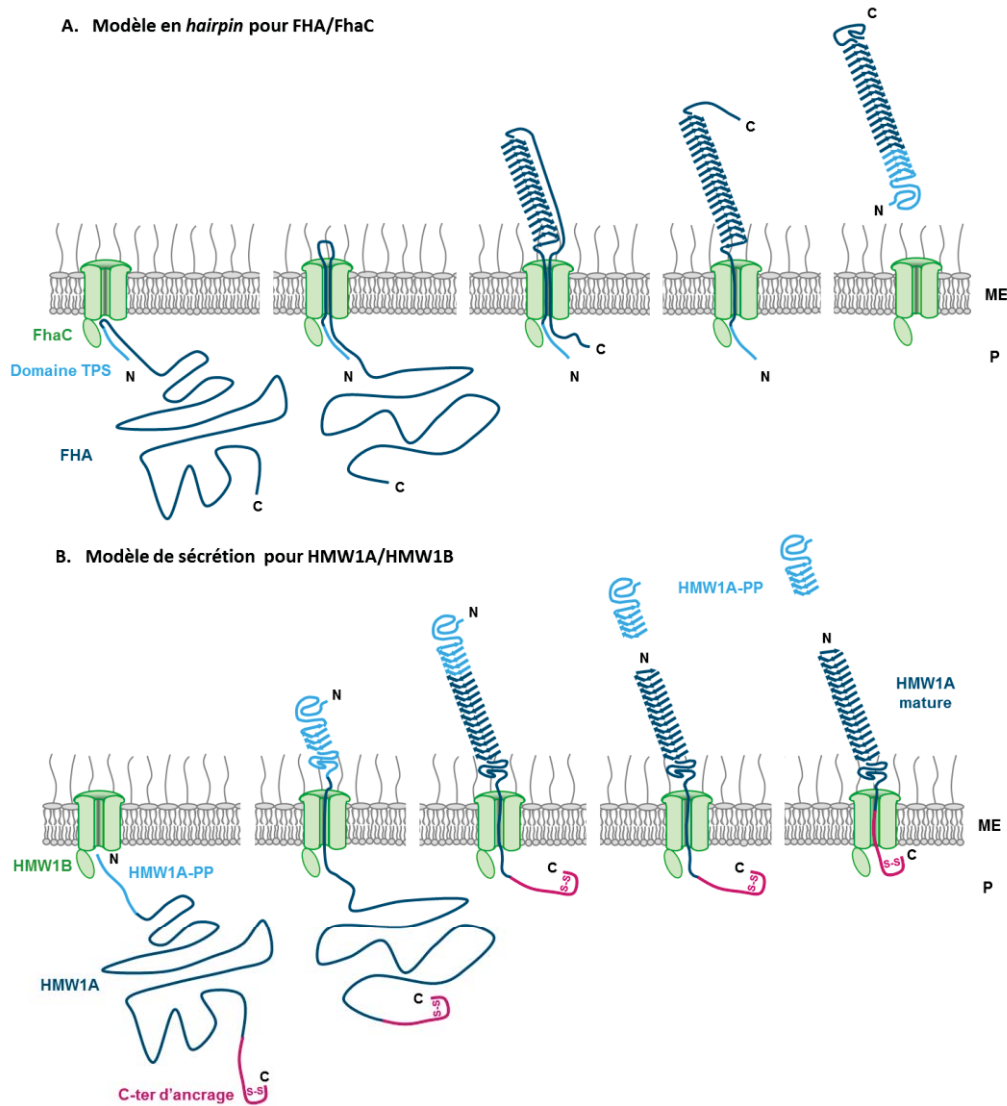


Figure 63. (A) Modèle en *hairpin* de la sécrétion de FHA par FhaC. De gauche à droite, le domaine TPS de FHA interagit avec le domaine POTRA de FhaC. Le domaine TPS est maintenu de la sorte jusqu'à la fin de la translocation. FHA traverse le canal en *hairpin* et son repliement s'initie à la surface bactérienne. Une fois l'extrémité C-terminale repliée, la partie N-terminale de FHA traverse à son tour le pore et se replie relâchant la protéine FHA mature dans le milieu extracellulaire. **(B) Modèle de sécrétion de HMW1A par HMW1B.** De gauche à droite, le domaine TPS compris dans la *propiece* de HMW1A (HMW1A-PP) interagit avec le domaine POTRA de HMW1B. L'extrémité N-terminale de HMW1A (HMW1A-PP) émerge la première à la surface bactérienne et initie le repliement progressif du TpsA. En cours de sécrétion, HMW1A-PP est clivée du reste de la protéine et relâchée dans le milieu extracellulaire. La protéine HMW1A mature reste ancrée dans le pore de HMW1B par son extrémité C-terminale comportant un pont disulfure. ME, membrane externe ; P, périplasm ; N, extrémité N-terminale ; C, extrémité C-terminale ; S-S, pont disulfure. (Mazar and Cotter, 2007)

J. Mazar et P.A. Cotter préconisaient le modèle linéaire pour la sous-famille HMW1A/HMW1B et le modèle en *hairpin* pour la sous-famille FHA/FhaC. Toutefois ce modèle en *hairpin* n'est pas en accord avec les mesures en temps réel de RPS (résonance plasmonique de surface) qui montrent que le taux d'association et de dissociation entre le domaine TPS de FHA et la partie N-terminale de FhaC semble être très rapide (Delattre *et al.*, 2011). L'interaction entre le domaine TPS et les domaines POTRA est donc très dynamique et transitoire rendant peu probable que cette interaction soit maintenue tout au long de la sécrétion. De plus, avec ce modèle la partie du TpsA située entre la sortie du pore et la

zone de repliement le long de l'hélice β en formation est sous forme étirée dans le milieu extracellulaire ce qui la rendrait vulnérable face aux protéases. Enfin, la question reste entière en ce qui concerne la manière dont l'extrémité N-terminale est relâchée une fois l'extrémité C-terminale repliée.

Le motif extra-hélice $\beta 7^*/\beta 8^*$, pourtant conservé et essentiel à la sécrétion au sein de la sous-famille FHA (Hodak *et al.*, 2006), est absent au sein de la sous-famille de HMW1A constituant une différence majeure entre ces sous-familles. La fonction de ce motif n'est pas connue mais pourrait aider au maintien de l'interaction entre l'extrémité N-terminale de FHA et FhaC au cours de la sécrétion. Cette hypothèse pourrait expliquer que l'extrémité N-terminale de FHA ne soit pas détectée en cours de sécrétion (Mazar and Cotter, 2006).

Malgré une faible identité de séquence, les quatre domaines TPS de structure connue présentent une hélice- β conservée d'un point de vue structural. Le motif extra-hélice à quatre brins- β antiparallèles (sauf pour HMW1A-PP où le premier brin- β est remplacé par une hélice- α) apparaît également dans chacune des structures. Lorsque ce motif est muté chez FHA, cela affecte les propriétés de sécrétion du système FHA/FhaC (Hodak *et al.*, 2006). Ces données ajoutées à la présence systématique de ce motif dans les structures de domaines TPS suggèrent un rôle dans le mécanisme de sécrétion des systèmes TPS.

Enfin, nous proposons un nouveau mécanisme de sécrétion pour la sous-famille FHA/FhaC qui a l'avantage d'être en accord avec l'hypothèse du *scaffold* (repliement progressif), avec les observations de J. Mazar et P.A. Cotter et avec les données de F. Jacob-Dubuisson concernant l'aspect transitoire de l'interaction entre le domaine TPS et les domaines POTRA. Ce modèle tient également compte du motif $\beta 7^*/\beta 8^*$ essentiel qui pourrait interagir avec les boucles extracellulaires du tonneau- β au cours de la sécrétion. Une fois l'extrémité C-terminale de la protéine TpsA repliée, la protéine TpsA pourrait être relarguée suite à un changement de conformation de la boucle L6. Ce modèle ne résout par contre pas la problématique du risque de protéolyse de la protéine TpsA dont une portion est dépliée dans le milieu externe (Figure 64-A). Le modèle pour la sous-famille HMW1A/HMW1B reste celui du modèle linéaire avec ou sans un ancrage dans le pore par l'extrémité C-terminale (Figure 64-B).

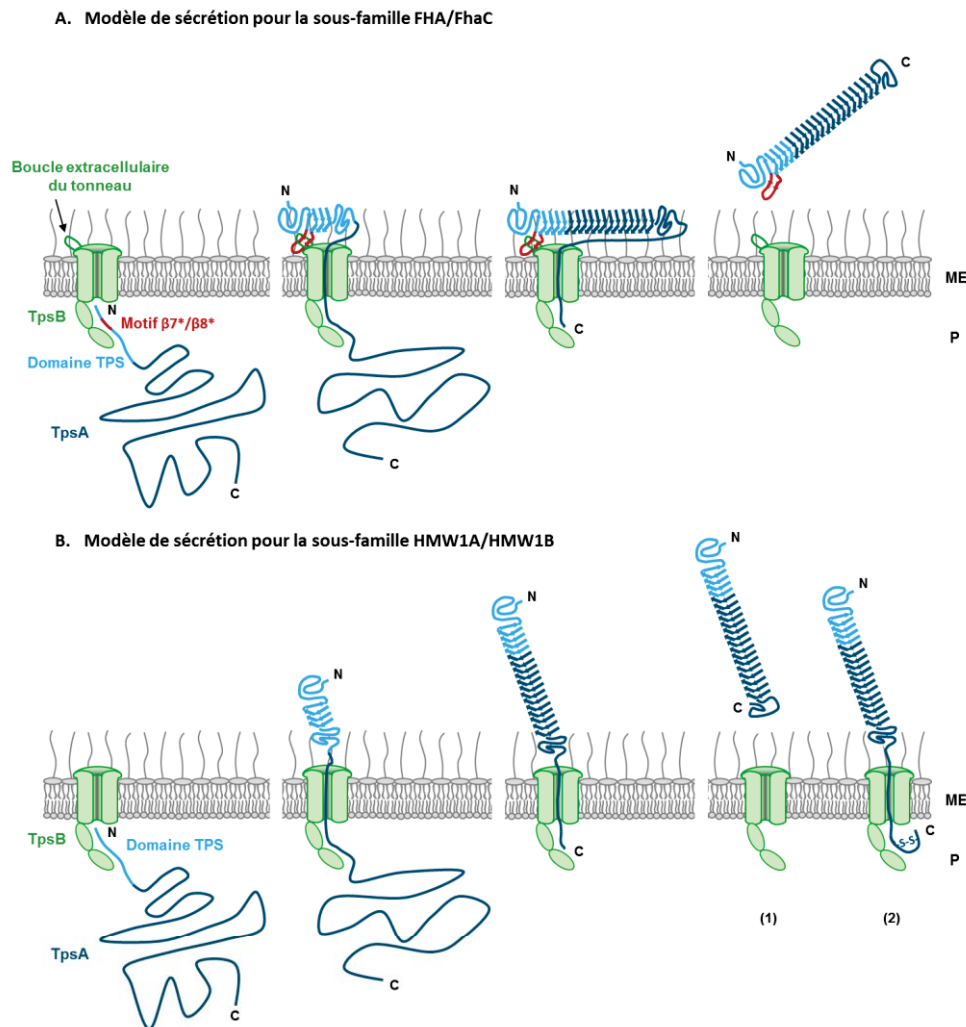


Figure 64. Modèles de mécanismes sécrétion pour les deux sous-familles de système TPS. (A) De gauche à droite, le domaine TPS du TpsA initie la translocation. Le domaine TPS émerge le premier à la surface bactérienne et initie le repliement progressif du TpsA (*scaffold*). Le TpsA est maintenue à proximité du pore par l'interaction entre le motif $\beta 7^*/\beta 8^*$ et des boucles extracellulaires du TpsB. La protéine est relâchée dans le milieu extracellulaire suite à la sortie de l'extrémité C-terminale et au changement de conformation de la boucle L6. **(B)** De gauche à droite, le domaine TPS du TpsA initie la translocation. Le domaine TPS émerge le premier à la surface bactérienne et initie le repliement progressif du TpsA à la surface bactérienne (*scaffold*). La protéine est ensuite relâchée dans le milieu extracellulaire (1) ou maintenue ancrée dans le pore par l'extrémité C-terminale (2). ME, membrane externe ; P, périplasme ; N, extrémité N-terminale ; C, extrémité C-terminale ; S-S, pont disulfure.

2. La protéine HxuB

La protéine HxuB a pu être produite en membrane externe, extraite en détergent et purifiée. Les cristaux de HxuB sont difficiles à obtenir. En effet, les temps d'incubation avant l'apparition de cristaux sont longs et la reproductibilité est faible ce qui nécessite de réaliser de nombreux essais de cristallogénèse. Toutefois, préalablement à ma thèse, un jeu de données à 4 Å a pu être collecté pour la protéine HxuB sauvage. Afin de résoudre le problème des phases, la technique du remplacement moléculaire a été appliquée en utilisant pour modèle la structure de l'unique TpsB connu, FhaC, mais cela n'a pas fonctionné.

Comme le suggèrent les résultats de microscopie électronique, la protéine HxuB se présente majoritairement sous une forme dimérique et de manière minoritaire sous une forme tétramérique. Cette oligomérisation d'une protéine TpsB n'est toutefois pas un cas unique. Des expériences de microscopie électronique sur la protéine HMW1B suggèrent que sa structure quaternaire pourrait également être dimérique (Li *et al.*, 2007) voire tétramérique (Surana *et al.*, 2004).

Différents facteurs peuvent expliquer l'échec du remplacement moléculaire tels que la déformation du tonneau- β due à sa malléabilité, la faible résolution du jeu de données (4 Å) ou la possibilité que les orientations des domaines POTRA entre eux et par rapport au tonneau- β diffèrent de celles de FhaC.

Au début de ma thèse, la structure de FhaC était la seule structure connue au sein de la superfamille BamA/TpsB. Par conséquent, afin de résoudre le problème des phases de HxuB, l'utilisation de métaux lourds intégrés dans des cristaux de HxuB soit par co-cristallisation soit par trempage a été entreprise. Les essais de cristallogenèse n'ont pas permis d'obtenir des cristaux diffractant à une résolution supérieure à 8 Å.

3. Les structures de BamA et de TamA

A la fin de ma thèse les structures cristallographiques de BamA et TamA ont été publiées coup sur coup (Noinaj *et al.*, 2013; Gruss *et al.*, 2013).

Les structures de BamA de deux organismes ont été résolues : BamA entière de *Neisseria gonorrhoeae* (NgBamA) à 3,2 Å de résolution (Figure 65-A) et BamA délétée de ses trois premiers domaines POTRA de *Haemophilus ducreyi* (HdBamA Δ 3) à 2,9 Å de résolution (Noinaj *et al.*, 2013). La structure de TamA entière d'*Escherichia coli* a été résolue à 2,25 Å de résolution et la structure des trois domaines POTRA de cette protéine a également été résolue séparément à 1,9 Å de résolution (Figure 66-A). Dans les deux structures, les domaines POTRA de TamA adoptent la même organisation spatiale (Gruss *et al.*, 2013).

La conformation de la boucle L6 au sein des structures de BamA et TamA apparaît bien définie alors qu'elle n'a pu être tracée précisément à l'heure actuelle dans le cas de FhaC. Cette boucle contient dans les trois protéines la tétrade conservée VRGY/F. Chez BamA et TamA, l'arginine de la tétrade est en interaction avec l'aspartate du motif conservé récemment mis en évidence G/FxDxG du brin β 13 de BamA (où x est un résidu hydrophobe).

Une autre grande différence conformationnelle se situe à l'interaction entre les brins β 1 et β 16 qui ferment le tonneau- β . Dans le cas de FhaC et de HdBamA Δ 3, ces deux brins sont liés par six et huit

ponts hydrogène respectivement. Alors que seuls deux et trois ponts hydrogène relient ces brins dans les structures de NgBamA et de TamA respectivement. Cela induit une modification du *shear number* du tonneau impliquant l'élargissement du canal et la diminution de l'épaisseur du tonneau qui entraînent une perturbation de la membrane externe la rendant localement plus perméable.

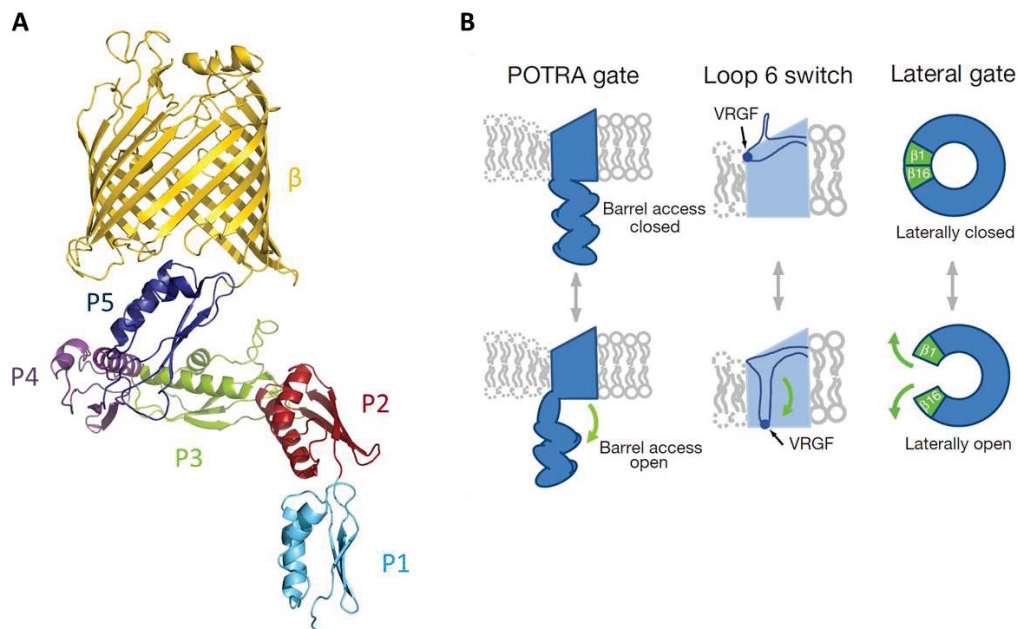


Figure 65. (A) Structure de la protéine BamA du complexe BAM. Représentation en ruban de la structure cristallographique de NgBamA montrant le tonneau- β (en jaune) et les domaines POTRA 1 à 5 (en bleu ciel, rouge, vert, violet et bleu foncé respectivement). **(B) Résumé des changements conformationnels supposés de BamA basé sur les analyses structurales et *in silico*.** A gauche (*POTRA gate*), le changement de conformation des domaines POTRA ouvrant l'accès au tonneau- β . Au centre (*Loop 6 switch*), le changement de conformation de la boucle L6 depuis son état de repos (observé dans les structures de BamA) vers son état activé supposé (observé dans la structure de FhaC). A droite (*lateral gate*), l'ouverture latérale du tonneau- β . (Noinaj *et al.*, 2013)

Le mécanisme proposé pour la protéine BamA tient compte du changement conformationnel supposé de la boucle L6, le changement de conformation des domaines POTRA et l'ouverture du tonneau de BamA au niveau des brins $\beta 1$ et $\beta 16$ (Figure 65-B). L'ensemble de ces mouvements permettrait le passage des nouvelles OMP vers la zone perturbée de la membrane externe soit directement, soit via le tonneau de BamA. Les OMP interagiraient avec les brins $\beta 1$ et $\beta 16$ par β -augmentation pour initier leur repliement en tonneau- β (Noinaj *et al.*, 2013).

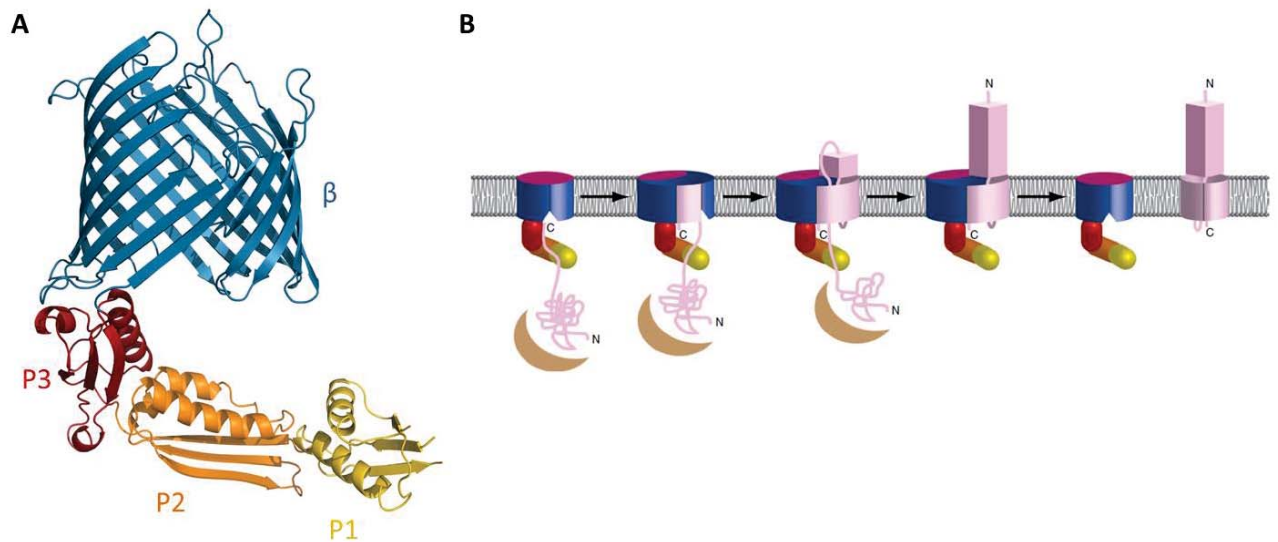


Figure 66. (A) Représentation en ruban de la structure cristallographique de TamA d'*Escherichia coli*. Le tonneau- β (en bleu) et les domaines POTRA 1 à 3 (en jaune, orange et rouge respectivement) sont représentés. **(B) Mécanisme proposé pour l'assemblage du substrat de TamA via la formation d'un tonneau hybride.** Une protéine chaperonne (en marron) amène un autotransporteur déplié (en rose clair) à TamA (en bleu) qui est en conformation fermée grâce à L6 (en magenta). L'autotransporteur interagit avec les domaines POTRA (en jaune, orange et rouge). Un tonneau hybride est formé par β -complémentation suite à l'insertion de brins- β du substrat dans l'ouverture β 1- β 16 du tonneau de TamA. L'augmentation du diamètre du canal permet alors au domaine passager de le traverser. Une fois le domaine passager à la surface bactérienne, les tonneaux- β de TamA et de l'autotransporteur se séparent. (Gruss *et al.*, 2013)

Le mécanisme proposé pour TamA et l'insertion des autotransporteurs en membrane externe implique également une ouverture du tonneau après interaction avec le substrat. Ce dernier va s'insérer progressivement dans la membrane par β -complémentation avec le tonneau- β de TamA. Cela induit la formation d'un tonneau hybride par l'intermédiaire duquel a lieu la translocation du domaine passager de l'autotransporteur. Une fois le domaine passager à la surface bactérienne, le tonneau hybride se scinde (Figure 66-B) (Gruss *et al.*, 2013).

L'étude des systèmes TPS et plus particulièrement des protéines TpsB est également d'un intérêt pour l'étude des protéines de la superfamille BamA/TpsB. Outre la présence de domaines POTRA et d'un tonneau- β à 16 brins avec des motifs conservés, ces protéines montrent de plus en plus de points communs d'un point de vue fonctionnel. Par exemple, les mutations appliquées à l'arginine ou à l'aspartate au sein des motifs conservés VRGY/F de la boucle L6 et G/FxDxG du brin β 13, entraînent d'une part la perte des propriétés de sécrétion du système FHA/FhaC et d'autre part la perte des propriétés d'insertion en membrane externe des OMP par le complexe BAM (Delattre *et al.*, 2010; Leonard-Rivera and Misra, 2012; Dwyer *et al.*, 2013, données non publiées). Par conséquent, la poursuite de la recherche sur les systèmes TPS est fondamentale pour la compréhension de systèmes plus complexes comprenant les protéines BamA, TamA, Sam50 et Toc75 de la superfamille BamA/TpsB.

Notons que les structures de BamA et TamA ont également été utilisées comme modèles pour le remplacement moléculaire de HxuB sans plus de succès.

4. Perspectives

Un des objectifs de ma thèse était de réaliser l'étude fonctionnelle du système HxuA/HxuB. Le phénomène de lyse bactérienne lors de la production de HxuA en présence de HxuB en a retardé l'étude. Mais l'ajustement de divers paramètres du protocole nous a permis de réduire fortement l'effet de lyse bactérienne et nous permet maintenant de nous consacrer à l'étude fonctionnelle du système HxuA/HxuB.

Afin de mettre à l'épreuve ce système, nous allons tester les effets de mutations sur des résidus conservés au sein de la superfamille BamA/TpsB. Nous avons choisi ces mutants car ils ont un effet drastique sur la sécrétion de FHA par FhaC et sur le repliement et la fonction de BamA. Les motifs visés sont la tétrade conservée VRGY/F au sein de la boucle L6 où le résidu R433 de HxuB sera muté et le motif conservé G/FxDxG du brin β 13 de FhaC où le résidu D471 de HxuB sera muté. Si ces mutations affectent fortement la sécrétion de HxuA par HxuB, cela validera notre protocole. Une étude fonctionnelle plus fine du système HxuA/HxuB pourra alors être entreprise.

La cristallogénèse des protéines BamA et TamA a été réalisée avec des bicelles. Les bicelles sont formées par un mélange de détergents et de lipides formant des disques de bicouches lipidiques. Ces disques lipidiques ont pour avantage par rapport au détergent seul de mieux mimer la bicouche membranaire. C'est en passant par cette technique que les structures de BamA et TamA ont pu être résolues. Nous allons donc appliquer cette technique à HxuB et tirer profit de l'optimisation de la production, de l'extraction et de la purification de la protéine HxuB effectuée au cours de ma thèse.

Une autre perspective intéressante serait de persévérer dans l'étude structurale du complexe bloqué de FHA/FhaC et d'initier cette étude pour le complexe bloqué de HxuA/HxuB. Le principe du complexe bloqué est de fusionner une protéine périplasmique, BugE, à l'extrémité C-terminale du TpsA. BugE est une protéine périplasmique globulaire de *Bordetella pertussis* dont la structure a été résolue par notre équipe. Avec ce système, le TpsA initie sa translocation et son repliement à la surface bactérienne mais reste bloqué dans le pore dû à la présence de la protéine BugE (Figure 67). L'intérêt majeur de cette étude serait de nous permettre de valider ou d'invalider les différents modèles de sécrétion pour les deux sous-familles TpsA/TpsB. Cette étude permettrait également de savoir quelle partie de la protéine TpsA interagit avec les domaines POTRA en cours de sécrétion, de

connaître la conformation de L6 et la localisation de l'hélice H1 ainsi que de savoir s'il y a des interactions avec les boucles extracellulaires du TpsB.

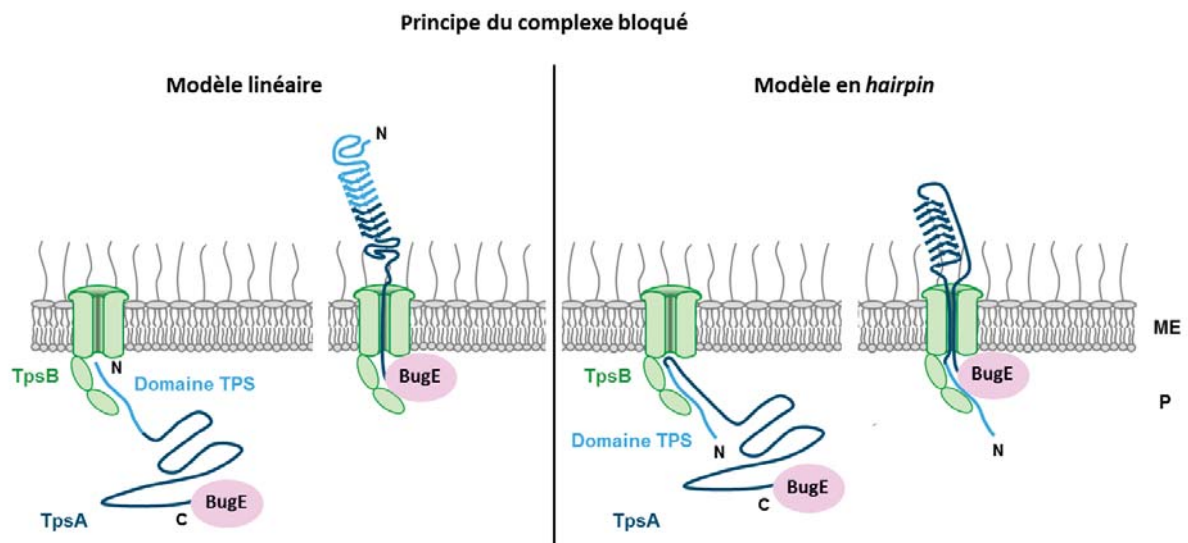


Figure 67. Principe du complexe bloqué et effet attendu en fonction du modèle de sécrétion. Dans les deux cas, le domaine TPS de la protéine TpsA initie la translocation. Dans le cas du **modèle linéaire**, le domaine TPS émerge le premier à la surface bactérienne et initie le repliement progressif du TpsA à la surface bactérienne. La progression du repliement est arrêtée par la présence de la protéine périplasmique BugE créant le complexe bloqué. Dans le cas du **modèle en hairpin**, l'interaction entre le domaine TPS et les domaines POTRA est maintenue. La protéine TpsA traverse le canal en formant une *hairpin* et son repliement s'initie à la surface bactérienne jusqu'à ce que la protéine périplasmique BugE bloque le système. ME, membrane externe ; P, périplasm ; N, extrémité N-terminale ; C, extrémité C-terminale.

Matériels et méthodes

1. Clonages

Le gène *hxuA* a été obtenu par PCR sur l'ADN génomique de la souche *Haemophilus influenzae* KW20 utilisant la polymérase HiFi (Expand High Fidelity PCR System, Roche). Le fragment a été amplifié avec l'amorce 5' HxuA 7his XhoI et l'amorce 3' HxuA301 BglIII (Table 3). Le produit PCR est purifié par la technique d'extraction sur gel d'agarose (MinElute Gel Extraction Kit, Qiagen). Les fragments purifiés sont digérés avec les enzymes de restriction XhoI et BglIII (Fermentas). La même réaction de restriction est réalisée sur le vecteur d'expression pFLAG-CTS (Sigma-Aldrich) utilisé pour l'expression périplasmique de protéine chez *Escherichia coli* (Figure 68).

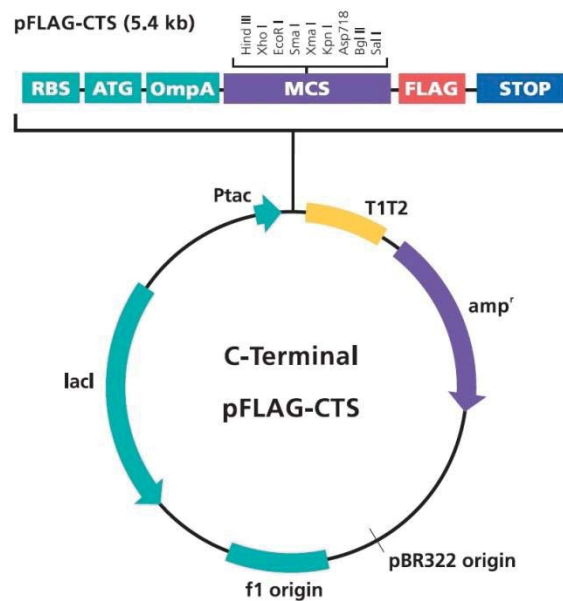


Figure 68. Carte du plasmide pFLAG-CTS (Sigma-Aldrich). Le promoteur fort Tac (pTac) est un hybride entre les promoteurs *trp* et *lac* d'*Escherichia coli* (de Boer *et al.*, 1983). Le contrôle de la transcription est régulé par le système répresseur *lac* (*lacI*, protéine de répression). RBS, Ribosome Binding Site ; ATG, codon start ; OmpA, peptide signal pour la sécrétion de protéine vers le périplasm ; MCS, Multiple Cloning Site pour l'insertion de séquences codantes dans le vecteur ; FLAG, octapeptide pour la liaison d'anticorps anti-FLAG (non utilisé dans nos constructions par ajout d'un codon stop en amont) ; STOP, codon stop ; T1T2, terminateur transcriptionnel ; amp^R, gène de résistance à l'ampicilline ; pBR322 origin, origine de réplication double-brin ; f1 origin, origine de réplication simple-brin du brin positif.

La séquence codante de HxuA est mise en phase avec la séquence codante du peptide signal de la protéine OmpA comprise dans le vecteur. La réaction de ligation est effectuée grâce au kit de ligation Fast Link DNA (Epicentre). La construction encodée dans le vecteur d'expression comprend le peptide signal de la protéine OmpA (OmpA_{ps}), un tag poly-histidine (His_{tag}) à l'extrémité N-terminale des 301 premiers résidus de HxuA (HxuA₁₋₃₀₁ ou HxuA₃₀₁). La construction renommée **pFHxuA_{301-N}** (Table 4) a été vérifiée par séquençage.

La construction du vecteur **pFHxuA_{373-N}** est réalisée de la même manière que pour le vecteur pFHxuA_{301-N} mais en utilisant les amorces 5' HxuA 7his XhoI et 3' HxuA373 BglIII.

La construction **pFHxA_{301-C}** est identique à celle de pFHxA_{301-N} si ce n'est que le tag poly-histidine est placé à l'extrémité C-terminale de HxA₃₀₁. Le protocole est le même que pour pFHxA_{301-N} mais les amorces utilisées sont : 5' HxA XhoI et 3' HxA301-6his BglII.

Le gène *hxuB* a été obtenu par PCR sur l'ADN génomique de la souche *Haemophilus influenzae* KW20. Le protocole est le même qu'exposé précédemment. Le fragment a été amplifié avec les amorces 5' HxB XhoI et 3' HxB BglII. La construction **pFHxB** comprend le peptide signal de la protéine OmpA (OmpA_{ps}) et HxB.

Le protocole de clonage de **pFHxB_{His tag}** est le même que pour pFHxB mais en utilisant l'amorce amont 5' HxB-6his XhoI. La construction encodée dans le vecteur d'expression comprend le peptide signal d'OmpA (OmpA_{ps}), un tag poly-histidine (His_{tag}) à l'extrémité N-terminale de HxB.

Les constructions **pCHxB** et **pCHxB_{His tag}** ont été réalisées de la façon suivante. Respectivement, les séquences codantes pour OmpA_{ps}-HxB et OmpA_{ps}-HxB-His_{tag} sont sorties des vecteurs pFHxB et pFHxB_{His tag} par restriction enzymatique avec *NdeI* et *BglII*. En parallèle, le vecteur d'expression pCOLADuet-1 (Novagen) est restreint de la même manière. Après ligation, les constructions en pCOLADuet-1 (pC) comprennent le peptide signal de la protéine OmpA (OmpA_{ps}), dans le second cas un tag poly-histidine (His_{tag}) suivi de la séquence codante de HxB, soit les vecteurs pCHxB et pCHxB_{His tag}.

Le vecteur d'expression pCOLADuet-1 (Novagen) est conçu pour la coexpression de deux gènes cibles. Le vecteur comprend deux sites de clonage précédé chacun d'un promoteur T7 (Figure 69).

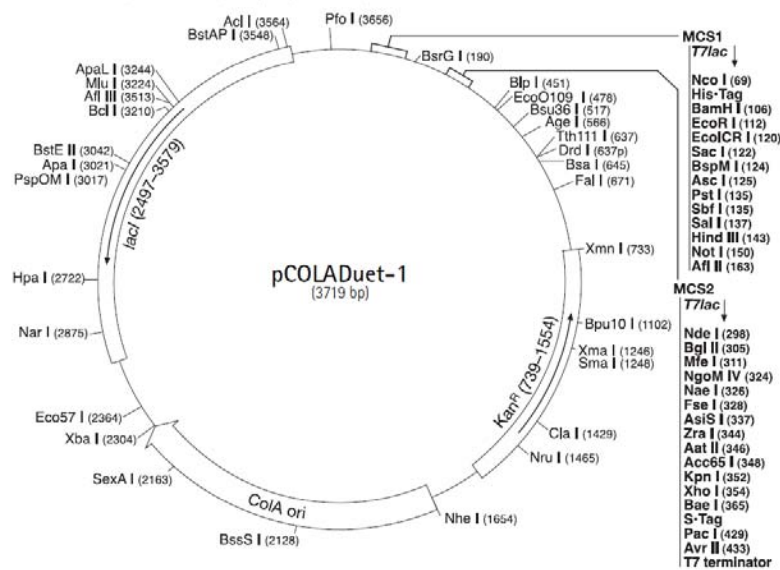


Figure 69. Carte du plasmide pCOLADuet-1 (Novagen). Ce plasmide permet la coexpression de deux gènes cibles. Les sites de clonage (MCS1 et MCS2) sont précédés chacun d'un promoteur T7, d'un opérateur *lac* et d'un site RBS (*Ribosome Binding Site*) (T7lac). Le contrôle de la transcription est régulé par le système répresseur *lac* (*lacI*, protéine de répression). MCS, *Multiple Cloning Site* pour l'insertion de séquences codantes dans le vecteur ; Kan^R, gène de résistance à la kanamycine ; ColA ori, origine de réplication ColA (Zverev and Khmel, 1985).

Dans nos constructions, HxuB a été inséré dans le deuxième site de clonage. Le premier site de clonage sera utilisé pour exprimer les protéines TpsA telles que HxuA ou HMW1A dans le cas de croisement de systèmes.

Le vecteur pCHxuA_{301-N}-HxuB_{His tag} a été obtenu comme suit. Une PCR a été effectuée sur le vecteur pFHxuA_{301-N} avec les amorces amont 5' HxuA NcoI et aval 3' HxuA301 NotI. Le produit PCR est inséré dans le plasmide pCHxuB_{His tag} par restriction enzymatique (NcoI et NotI) et ligation.

Les vecteurs d'expression pCHxuA_{301-C}-HxuB et pCHxuA_{301-C}-HxuB_{His tag} ont été construits comme suit. La séquence codante OmpA_{ps}-HxuA₁₋₃₀₁-His_{tag} est amplifiée par PCR avec les amorces amont 5' HxuA NcoI et aval 3' HxuA301-6his NotI. Elle est insérée par restriction et ligation dans les vecteurs d'expression pCHxuB et pCHxuB_{His tag}. On obtient dans le premier site de clonage OmpA_{ps}-HxuA₁₋₃₀₁-His_{tag} et dans le second site de clonage OmpA_{ps}-HxuB ou OmpA_{ps}-HxuB-His_{tag}.

Le vecteur pCHxuA_{301-C} a été obtenu à partir du vecteur pCHxuA_{301-C}-HxuB. La séquence codante pour OmpA_{ps}-HxuB est extraite du vecteur pCHxuA_{301-C}-HxuB par restriction enzymatique utilisant les enzymes NdeI et BglIII. Le vecteur ainsi linéarisé est purifié par la technique d'extraction sur gel d'agarose. Les extrémités restreintes du vecteur sont rendues franches par addition de dNTP de la T4 DNA polymerase (New England BioLabs). Après purification du vecteur, une réaction de ligation permet l'obtention de pCHxuA_{301-C}.

Pour construire le plasmide **pFHmw1A_{373-N}**, un gène synthétique a été utilisé. Ce gène est bordé par les sites de restriction *XhoI* en amont et *BglII* en aval et comprend un tag poly-histidine suivi des 373 premiers résidus de la protéine HMW1A de *Haemophilus influenzae* (His_{tag}-Hmw1A₁₋₃₇₃). Le gène synthétique est injecté dans le vecteur pFLAG-CTS. La construction obtenue comprend le peptide signal de la protéine OmpA suivi d'un tag poly-histidine et de Hmw1A₁₋₃₇₃.

Le vecteur **pFHmw1A_{373-C}** a été obtenu à partir du vecteur pFHmw1A_{373-N}. La séquence codante de Hmw1A₁₋₃₇₃ est amplifiée par PCR avec les amorces amont 5' Hmw1A *XhoI* et aval 3' Hmw1A373-6his *BglII*. Elle est insérée par restriction et ligation dans les vecteurs d'expression pFLAG-CTS.

Le vecteur **pCHmw1A_{373-C}** a été obtenu à partir du vecteur pFHmw1A_{373-C}. La séquence codante OmpA_{ps}-Hmw1A₁₋₃₇₃-His_{tag} est extraite du vecteur pFHmw1A_{373-C} par restriction enzymatique utilisant les enzymes *NdeI* et *BglII* et est insérée dans le vecteur pCOLADuet-1 préalablement linéarisé avec les mêmes enzymes de restriction.

Table 3. Liste des amorces. Les sites de restriction sont en gras et les tags poly-histidine sont soulignés.

Nom de l'amorce	
5' HxuA 7his <i>XhoI</i>	5' GCG CAA GCT TCT CGA GAA <u>CAC CAC CAC CAC CAC CAC</u> CGG GAT TTG CCA CAA GGT AGC AGT GTA GTT 3'
3' HxuA301 <i>BglII</i>	5' GAC AGA TCT TTA ACC ATT GAT ATT AAC GCT TTT GCC TGT AAA 3'
3' HxuA373 <i>BglII</i>	5' GAC AGA TCT TTA AAC GTC CTT TCC TTT AAG ATT CAC TTT TCC 3'
5' HxuA <i>XhoI</i>	5' GCG CAA GCT TCT CGA GAA CGG GAT TTG CCA CAA GGT AGC AGT GTA GTT 3'
3' HxuA301-6his <i>BglII</i>	5' GAC AGA TCT TTA <u>ATG GTG ATG GTG ATG GTG</u> ACC ATT GAT ATT AAC GCT TTT GCC 3'
5' HxuB <i>XhoI</i>	5' CCG CTC GAG AAT TAG ATC GGC CAG ATA CTG GA 3'
3' HxuB <i>BglII</i>	5'GGA AGA TCT TTA GAA AGT TTT AAT CAT AGA 3'
5' HxuB-6his <i>XhoI</i>	5' GCG CAA GCT TCT CGA GAA <u>CAC CAC CAC CAC CAC</u> TTA GAT CGG CCA GAT ACT GGA 3'
5' HxuA <i>NcoI</i>	5' TAT ACC ATG GGC ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA GTG 3'
3' HxuA301-6his <i>NotI</i>	5' TTA TGC GGC CGC TTA <u>ATG GTG ATG GTG ATG GTG</u> ACC ATT GAT ATT AAC GCT TTT 3'
3' HxuA301 <i>NotI</i>	5' TTA TGC GGC CGC TTA TTG TTC AGT TTC TAA CTC TCC AAC ACT CAC 3'
5' Hmw1A <i>XhoI</i>	5' GAT CTC TCG AGA AAG CGG TCT GCA GGG TAT GGA T 3'
3' Hmw1A373-6his <i>BglII</i>	5' GGA AGA TCT TCA <u>GTG ATG GTG ATG GTG GTG</u> ATC CAG CAG CCA TTC TTT CGC 3'

Table 4. Liste des vecteurs d'expression

Nom du vecteur	
pFHxA _{301-N}	pFlag-CTS-His _{tag} -HxA ₁₋₃₀₁
pFHxA _{373-N}	pFlag-CTS-His _{tag} -HxA ₁₋₃₇₃
pFHxA _{301-C}	pFlag-CTS-HxA ₁₋₃₀₁ -His _{tag}
pFHxB	pFlag-CTS-HxB
pFHxB _{His tag}	pFlag-CTS-His _{tag} -HxB
pCHxB	pCOLADuet-1-OmpA _{ps} -HxB
pCHxB _{His tag}	pCOLADuet-1-OmpA _{ps} -HxB-His _{tag}
pCHxA _{301-N} -HxB _{His tag}	pCOLADuet-1-OmpA _{ps} -His _{tag} -HxA ₁₋₃₀₁ -OmpA _{ps} -HxB-His _{tag}
pCHxA _{301-C} -HxB	pCOLADuet-1-OmpA _{ps} -HxA ₁₋₃₀₁ -His _{tag} -OmpA _{ps} -HxB
pCHxA _{301-C} -HxB _{His tag}	pCOLADuet-1-OmpA _{ps} -HxA ₁₋₃₀₁ -His _{tag} -OmpA _{ps} -HxB-His _{tag}
pCHxA _{301-C}	pCOLADuet-1-OmpA _{ps} -HxA ₁₋₃₀₁ -His _{tag}
pFHmw1A _{373-N}	pFlag-CTS-His _{tag} -Hmw1A ₁₋₃₇₃
pFHmw1A _{373-C}	pFlag-CTS-Hmw1A ₁₋₃₇₃ -His _{tag}
pCHmw1A _{373-C}	pCOLADuet-1-OmpA _{ps} -Hmw1A ₁₋₃₇₃ -His _{tag}

2. Production de protéines

Les vecteurs d'expression sont transformés dans la souche électrocompétente d'*Escherichia coli* BL21(DE3)omp5 : F⁻, *ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm* (DE3) Δ *lamB ompR* (Prilipov *et al.*, 1998). Les souches BL21 sont notamment déficientes en protéase de membrane externe OmpT protéolysant les protéines extracellulaires. Le gène de l'ARN polymérase T7 de la souche BL21(DE3) est sous le contrôle d'un promoteur *lac* mutant (*lacUV5*) plus fort que le promoteur *lac* sauvage. La souche BL21(DE3)omp5 est en plus déficiente pour la porine LamB et pour le régulateur de transcription des porines OmpC et OmpF, OmpR (Taylor *et al.*, 1981). La souche BL21(DE3)omp5 est la souche utilisée par défaut sauf indication contraire mentionnant les souches BL21(DE3)¹ ou UT5600². La surexpression du ou des gènes cibles est réalisée dans du milieu Luria Bertani (LB) à 37°C avec, selon les cas, 100µg/ml d'ampicilline et/ou 25µg/ml de kanamycine. Pour la surproduction de HxB, 0,5% de D-(+)-glucose est ajouté au milieu de culture. La culture est induite lorsque la densité optique à 600nm (DO_{600nm}), atteint une valeur comprise entre 0,6 et 0,8. L'induction est obtenue par l'ajout d'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside). La concentration d'IPTG utilisée est, sauf mention contraire, de 1mM pour la production de TpsA et de 1µM pour la production de HxB (en vecteur d'expression pFLAG-CTS). Après 3 heures d'induction pour les TpsA et 4 heures pour HxB, les cultures sont centrifugées à 4700g pendant 1 heure à 4°C.

¹ **BL21(DE3)**, souche d'*E. coli* de génotype : *fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdSλ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int:::(lac::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5*

² **UT5600**, souche d'*E. coli* de type K12 de génotype : F⁻ *ara-14 leuB6 secA6 lacY1 proC14 tsx-67 Δ(ompT-fepC)266 entA403 trpE38 rfbD1 rpsL109 xyl-5 mtl-1 thi-1*

Dans le cas de HxuB, les culots bactériens sont lavés une fois avec du tampon sodium phosphate à 20mM et pH 7,0 et conservés à -20°C.

Dans le cas de protéines TpsA, les culots sont conservés à -20°C. Les surnageants sont additionnés de 20 mM d'imidazole à pH 6,5 ainsi que d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases sans EDTA (Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche). Les surnageants sont conservés à 4°C jusqu'au lendemain, jour de la purification.

3. Extraction membranaire de HxuB

L'extraction en détergent de HxuB produit en membrane externe à partir de culots bactériens comprend trois étapes : une lyse et deux extractions. Le protocole est décrit pour des culots de quatre litres de culture.

Les culots bactériens sont solubilisés dans 60 ml du tampon de lyse (20mM de tampon sodium phosphate à pH 7,0 ; 1 pastille d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases sans EDTA, Roche ; DNase I, Euromedex). La lyse est réalisée avec les systèmes Emulsiflex-B30 et Emulsiflex-C3 (Avestin).

La phase soluble est récupérée suite à deux centrifugations successives à 9000 rpm pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est ultracentrifugé à 25000 rpm pendant une heure à 12°C. Le culot obtenu contient les débris membranaires.

Une première étape d'extraction membranaire est appliquée sur le culot de l'ultracentrifugation. Le culot est solubilisé dans 60 ml du tampon d'extraction 1 (0,8% de détergent octyl- β -D-glucopyranoside ou β -OG ; 20mM de tampon sodium phosphate à pH 7,0 ; 100mg d'inhibiteur spécifique de sérine protéases, Pefabloc SC AEBSF, Roche). L'efficacité de la solubilisation est augmentée par le passage au travers d'aiguilles. Après une incubation d'une heure à 37°C sous agitation, la solution d'extraction est ultracentrifugée à 25000 rpm pendant une heure à 12°C. Le culot est récupéré pour la seconde extraction membranaire.

La seconde extraction membranaire suit le même protocole que la précédente mais avec 60 ml de tampon d'extraction 2 (2% de détergent β -OG ; 20mM de tampon sodium phosphate à pH 8,0 ; 2mM d'EDTA à pH 8,0 ; 100mg d'inhibiteur spécifique de sérine protéases Pefabloc SC AEBSF). Le surnageant récupéré après l'ultracentrifugation est l'extrait 2 contenant la protéine HxuB soluble en détergent β -OG.

4. Purification des protéines

4.1. Purification des protéines TpsA

Les protéines TpsA sont produites avec un tag poly-histidine et purifiées en une seule étape par chromatographie d'affinité. Le surnageant de culture, 100 ml pour les essais fonctionnels et 1L pour la cristallogénèse, est chargé sur une colonne de 1ml HisTrap FF Crude (GE Healthcare). Les tampons utilisés pour cette purification sont un tampon A (20mM imidazole à pH 6,5) et un tampon B (1M imidazole à pH 6,5).

Après le chargement de l'échantillon sur la colonne et un lavage avec le tampon A, l'élution se fait directement avec 100% de tampon B.

4.2. Purification de la protéine HxuB

La protéine HxuB en solution de détergent dans l'extrait 2 est purifiée en deux étapes ; une chromatographie échangeuse de cations suivie d'une chromatographie d'affinité Ni⁺²-histidine.

Pour l'étape de chromatographie échangeuse de cations, l'extrait 2 est mis à pH 6,0 par l'ajout d'une solution de NaH₂PO₄ à 0,5M additionnée de 1% de β-OG. Le point isoélectrique (pI) de HxuB est de 9,29 (calcul réalisé avec l'outil ProtParam sur le serveur ExPASy). Les tampons utilisés pour cette purification sont un tampon A (1% β-OG et 20mM de tampon sodium phosphate à pH 6,0) et un tampon B (1% β-OG, 20mM de tampon sodium phosphate à pH 6,0 et 2M NaCl).

Après la mise en tampon, le chargement de l'extrait 2 de la colonne HS20 de 1,7ml (Poros) et le lavage de la colonne avec le tampon A, l'élution est réalisée par gradient. Avec un flux de 1ml/minute, un gradient de 0 à 35% de tampon B est réalisé sur 35 minutes suivi par un gradient de 35 à 100% de tampon B en 10 minutes. Les fractions contenant HxuB sont révélées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (gel SDS-PAGE ou *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) et sont rassemblées en vue de la seconde étape de purification.

La purification par chromatographie d'affinité de HxuB est réalisée avec une colonne Hitrap IMAC HP de 1ml chargée avec du Ni⁺². Les tampons utilisés sont préparés avec de l'eau PPI (eau purifiée pour préparation injectable) : tampon A soit 2% de β-OG, 20mM de tampon sodium phosphate à pH 7,0 et tampon B soit 2% de β-OG, 20mM de tampon sodium phosphate à pH 7,0 et 500mM imidazole à pH 6,5. Après chargement de l'échantillon et lavage de la colonne, l'élution est réalisée en trois étapes avec des proportions croissantes en tampon B et donc de concentrations croissantes en imidazole de

200mM puis 260mM et enfin 500mM d'imidazole. Les deux premières étapes permettent l'élution de contaminants.

5. Cristallographie

La structure d'une protéine à l'échelle quasi-atomique ne peut être obtenue par des méthodologies de microscopie. En effet, la résolution limite d'une image obtenue par microscopie est donnée par la longueur d'onde du rayon lumineux utilisé. Or, les longueurs d'onde du spectre visible se mesurent en centaines de nanomètres tandis que les distances interatomiques sont de l'ordre de l'angström (Å). Une longueur d'onde de cet ordre appartient aux rayons X. La construction d'un microscope aux rayons X qui permettrait de visualiser les molécules est impossible car il n'existe pas de lentille pour ce type de rayon.

Par contre, on peut détecter les rayons diffractés des molécules soumises aux rayons X. La diffusion de rayons X à partir d'une simple molécule est extrêmement faible et par conséquent difficile à distinguer du bruit de fond. Un cristal consiste en un arrangement ordonné et périodique dans l'espace d'un grand nombre de molécules dans la même orientation. Parmi les ondes diffractées, celles qui sont en phase vont interférer de manière constructive tandis que d'autres vont interférer de manière destructive. Ceci explique que ce qui sera mesurée est un ensemble de tâches de diffraction (Figure 72).

Le cristal a donc un effet d'amplificateur du signal d'où l'intérêt d'obtenir des cristaux de protéine.

Notons que les expérimentations de cristallographie ne permettront pas réellement d'obtenir l'image des atomes mais une carte de la distribution des électrons de la molécule étudiée, soit sa carte de densité électronique. C'est à partir de cette dernière que le modèle structural de la molécule sera construit.

Les différentes étapes de la cristallographie de protéine sont reprises dans le schéma suivant avant d'être détaillées dans le texte (Figure 70).

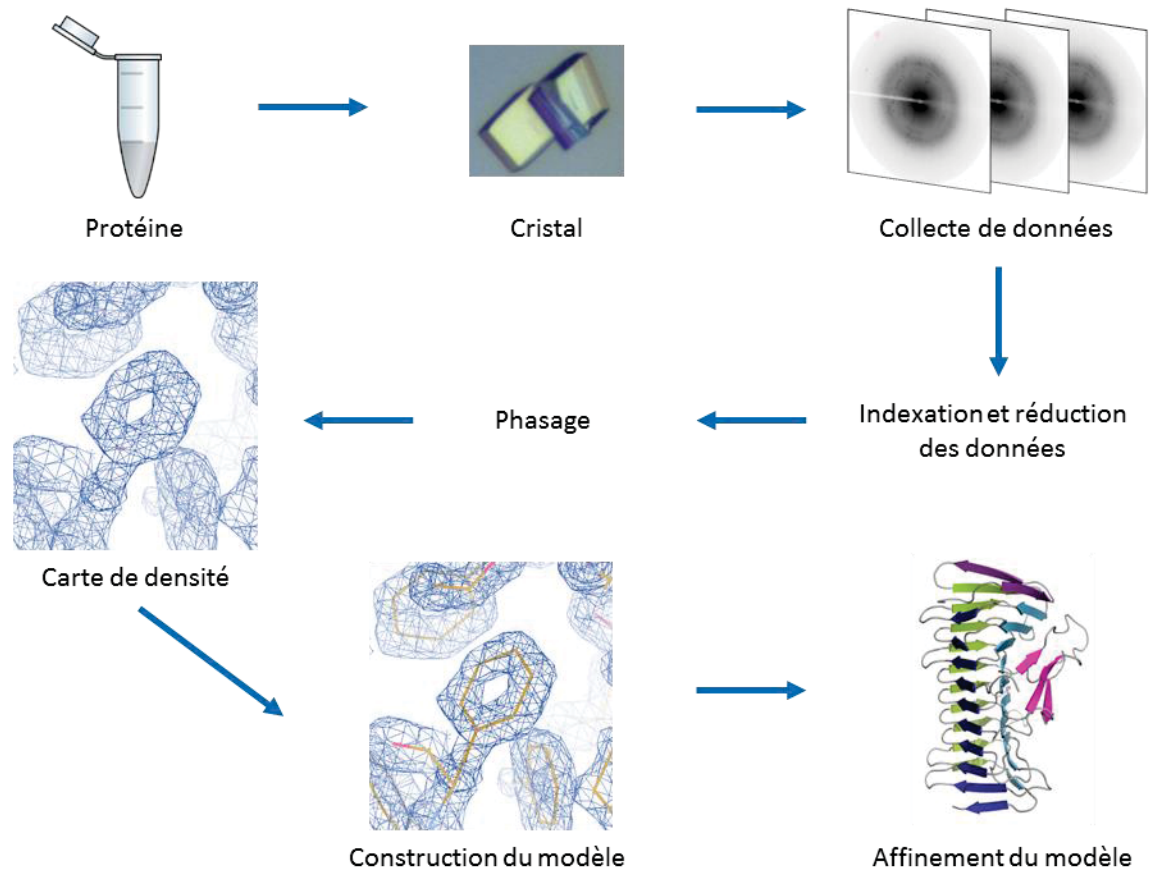


Figure 70. Schéma reprenant les différentes étapes de la cristallographie de protéine.

5.1. Cristallogénèse des protéines

La cristallogénèse de protéines est principalement un processus empirique où l'on induit une transition de phase de la protéine (Figure 71-B). La dynamique lente de ce processus est essentielle pour permettre aux macromolécules protéiques de s'agencer de manière ordonnée caractérisant un cristal.

En général, plus la protéine est pure, plus grandes sont les chances de voir apparaître des cristaux de cette protéine, protéine qui doit être correctement repliée et présente en grande quantité. Toutefois, la réussite dépend de nombreux autres facteurs propres à chaque protéine et peu prédictibles tels que : la présence ou l'absence de ligand, la concentration en protéine, la température, le pH, la présence d'un type de sel à une concentration donnée, la présence d'un d'agent précipitant d'une telle nature à une concentration donnée ou encore la présence de métaux.

Plusieurs techniques de cristallogenèse existent et celles qui ont été utilisées au cours des travaux de thèse sont la technique de la goutte suspendue réalisée manuellement et la technique de la goutte assise réalisée à l'aide du robot CyBi-CrystalCreator (CyBio). Ces deux techniques se basent sur le principe de diffusion en phase vapeur où en présence de deux solutions de concentrations différentes, l'évaporation et la diffusion de l'eau d'une solution à l'autre va rééquilibrer les concentrations. Sur ce principe, la protéine en solution que l'on souhaite cristalliser est mélangée en ratio 1:1 avec une solution contenant un agent de précipitation de concentration donnée. Dans le cas de la goutte suspendue, une goutte de ce mélange est déposée sur une lamelle qui sera retournée au-dessus d'un puits où se trouve la solution contenant l'agent précipitant. La lamelle est scellée au puits de sorte à créer un système fermé (Figure 71-A). A ce moment, la concentration en agent précipitant est deux fois moindre dans la goutte que dans le puits. Par conséquent, une partie de l'eau de la goutte va s'évaporer et diffuser vers le puits jusqu'à atteindre un équilibre de la concentration en agent précipitant. Ce phénomène aura pour effet de réduire le volume de la goutte et par conséquent d'augmenter progressivement la concentration en protéine vers une supersaturation dans la goutte (Figure 71-B). Si les conditions sont favorables, les macromolécules protéiques s'agenceront de sorte à former un cristal. La formation du cristal va mobiliser une partie des protéines ce qui va induire une diminution de la concentration en protéine en solution jusqu'à atteindre un équilibre.

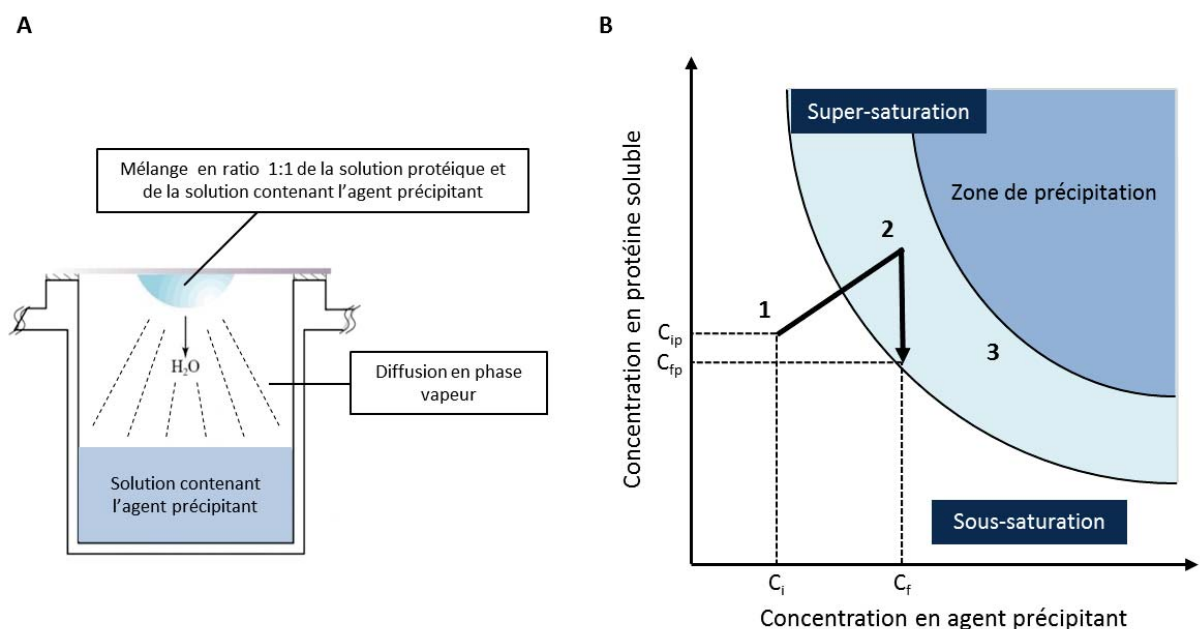


Figure 71. (A) Schéma de la technique de la goutte suspendue. (B) Diagramme des phases en système de diffusion de vapeur. (1) Etat initial lors du mélange de la solution protéique et de la solution en agent précipitant. (2) Etat après équilibration de la concentration en agent précipitant. (3) Etat final après cristallisation de la protéine. C_{ip} , concentration initiale en protéine en solution ; C_{fp} , concentration finale en protéine en solution ; C_i , concentration initiale agent précipitant ; C_f , concentration finale agent précipitant.

5.2. Collecte de données de diffraction aux rayons X

Lors d'une collecte de données, un cristal est soumis aux rayons X. Les rayons diffractés sont mesurés à l'aide d'un détecteur. L'image obtenue est communément appelée « cliché de diffraction » où chaque point ou *spot* de diffraction est appelé « réflexion » (Figure 72). Chaque réflexion est caractérisée par des coordonnées h,k,l , par une intensité (I) et par une erreur d'intensité (σ).

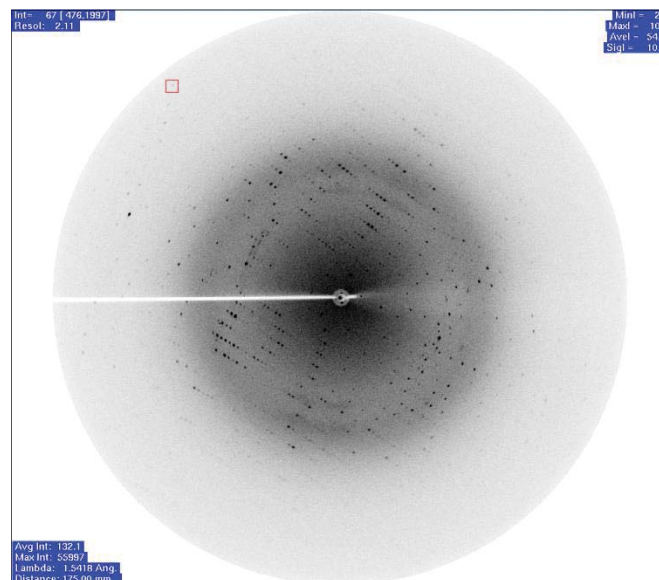


Figure 72. Cliché de diffraction obtenu sur le diffractomètre du laboratoire pour la protéine HxuA301-7his.

La distance entre le cristal et le détecteur peut être réduite ou augmentée selon que le cristal diffracte à plus ou moins grande résolution. Plusieurs clichés de diffraction sont mesurés en faisant pivoter le cristal d'un degré ou moins entre chaque mesure (degré de rotation par image). Sur base de ces premiers clichés de diffraction, les paramètres de la maille ainsi que le groupe d'espace du cristal sont déterminés à l'aide du logiciel XDS (Kabsch, 2010). Ces informations permettent de déterminer le nombre de clichés nécessaire à l'obtention d'un jeu complet de données de diffraction.

5.3. Traitement des données de diffraction

Les réflexions sont indexées, intégrées (consistant en un calcul des intensités) et mises à l'échelle avec le logiciel XDS (Kabsch, 2010). XDS va également réduire la quantité de données en moyennant les données redondantes et fournir les statistiques liées à la collecte de données telles que la complétude, la redondance ou encore la valeur de I/σ .

La complétude correspond au nombre de réflexions observées sur le nombre de réflexions possibles. Le but est d'obtenir un jeu de données le plus complet possible étant donné que cela va influencer sur la qualité de la carte de densité électronique. La redondance correspond au nombre de réflexions

observées sur le nombre de réflexions uniques. La valeur du R_{merge} est un indicateur de qualité des données utilisées. Au plus la valeur du R_{merge} est élevée, moins la qualité des données sera bonne. Le R_{meas} est un équivalent du R_{merge} mais qui reflète la qualité des données indépendamment de leur multiplicité. Enfin la valeur I/σ est le rapport entre les intensités du signal (des réflexions) sur l'intensité du bruit de fond.

5.4. Le phasage

En cristallographie il y a deux étapes limitantes, d'une part l'obtention de cristaux de protéine qui diffractent et d'autre part la résolution du problème des phases. En effet, pour obtenir une carte de densité électronique, il faut réaliser l'opération mathématique de transformation de Fourier inverse qui nécessite de connaître l'amplitude et la phase de chaque onde diffractée. L'amplitude peut être directement calculée à partir des intensités mesurées pour chaque réflexion. Par contre, la phase ne peut être mesurée directement et doit donc être déduite de manière indirecte.

Dans le cadre de ma thèse, la technique de phasage utilisée est le remplacement moléculaire. Cette technique utilise une autre protéine de structure proche comme modèle. Pour réaliser le remplacement moléculaire, le logiciel Molrep v.9.2 de la suite CCP4 v.6.1.13 a été utilisé (Winn *et al.*, 2011). Molrep va tenter de positionner correctement par des opérations de rotation et de translation la structure du modèle dans l'unité asymétrique. Molrep va également tenir compte du nombre de molécules prédites par unité asymétrique. A partir de la solution trouvée, une carte de densité électronique va être calculée.

5.5. Construction et affinement du modèle

Le logiciel ARP/wARP v.7.1 (Langer *et al.*, 2008) permet de construire automatiquement dans la carte de densité électronique un modèle structurale sur base de la séquence primaire de la protéine étudiée. Au plus la résolution des données de diffraction est grande, au meilleur et plus complet sera le modèle fourni par le logiciel. Ce modèle sera ensuite complété par des constructions manuelles des zones manquantes en utilisant le logiciel de visualisation Coot (Emsley *et al.*, 2010). Ces étapes de construction sont alternées avec des étapes d'affinement du modèle réalisées avec le logiciel REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 2011).

Au cours de et après l'affinement, plusieurs éléments de contrôle permettent de trouver et corriger les erreurs présentes dans le modèle. Bien que l'élément principal de contrôle reste l'œil du chercheur, plusieurs statistiques peuvent l'aider.

Parmi ces statistiques, on retrouve le facteur de température qui indique dans quelle mesure un atome oscille et vibre depuis sa position spécifiée dans le modèle. Le facteur de température moyen (Mean B) se rapporte à l'ensemble des atomes du modèle.

Les valeurs de R_{work} et R_{free} (facteurs R) permettent de vérifier si le modèle n'a pas été suraffiné. Ces deux valeurs mesurent l'accord entre les facteurs de structures (l'amplitude et la phase) observés et calculés. La valeur du R_{work} est calculée à partir des données utilisées pour l'affinement, 95% d'entre elles dans notre cas, tandis que celle du R_{free} est calculée à partir des données restantes, les 5% restantes. Lors de l'affinement du modèle, si la valeur du R_{free} diminue en parallèle à celle du R_{work} , alors le modèle a effectivement été amélioré. En effet, le suraffinement n'a que peu d'effet sur la valeur de R_{free} . Typiquement en fin d'affinement, les valeurs de facteurs R tournent autour de 20.

Les valeurs de RMSD des angles et des longueurs de liaison du modèle indiquent si ces angles et longueurs de liaison sont conformes aux valeurs attendues.

Enfin, les statistiques de Ramachandran indiquent le pourcentage de résidus pour lesquels les angles de torsions de la chaîne principale sont énergétiquement favorables.

6. Microscopie de contraste interférentiel différentiel

La microscopie de contraste interférentiel différentiel ou DIC (*Differential Interference Contrast*) est très utile pour l'observation de spécimen non coloré et/ou vivant. En effet, cette technique, mise au point au milieu des années 1950s par Georges Nomarski, permet d'améliorer le contraste de l'image obtenue. Cet effet est obtenu en séparant une lumière polarisée en deux rayons lumineux. Bien que proche, ces deux rayons lumineux vont être réfractés et dispersés différemment par le spécimen provoquant un changement de phase. Les deux rayons lumineux sont ensuite rassemblés et vont par conséquent interférer. Le rayon lumineux passe ensuite au travers d'un second filtre polarisant rendant visible les changements de phase. Les contours des objets sont rendus plus visibles d'où l'intérêt de cette technique pour l'étude morphologique de bactéries (Figure 73).

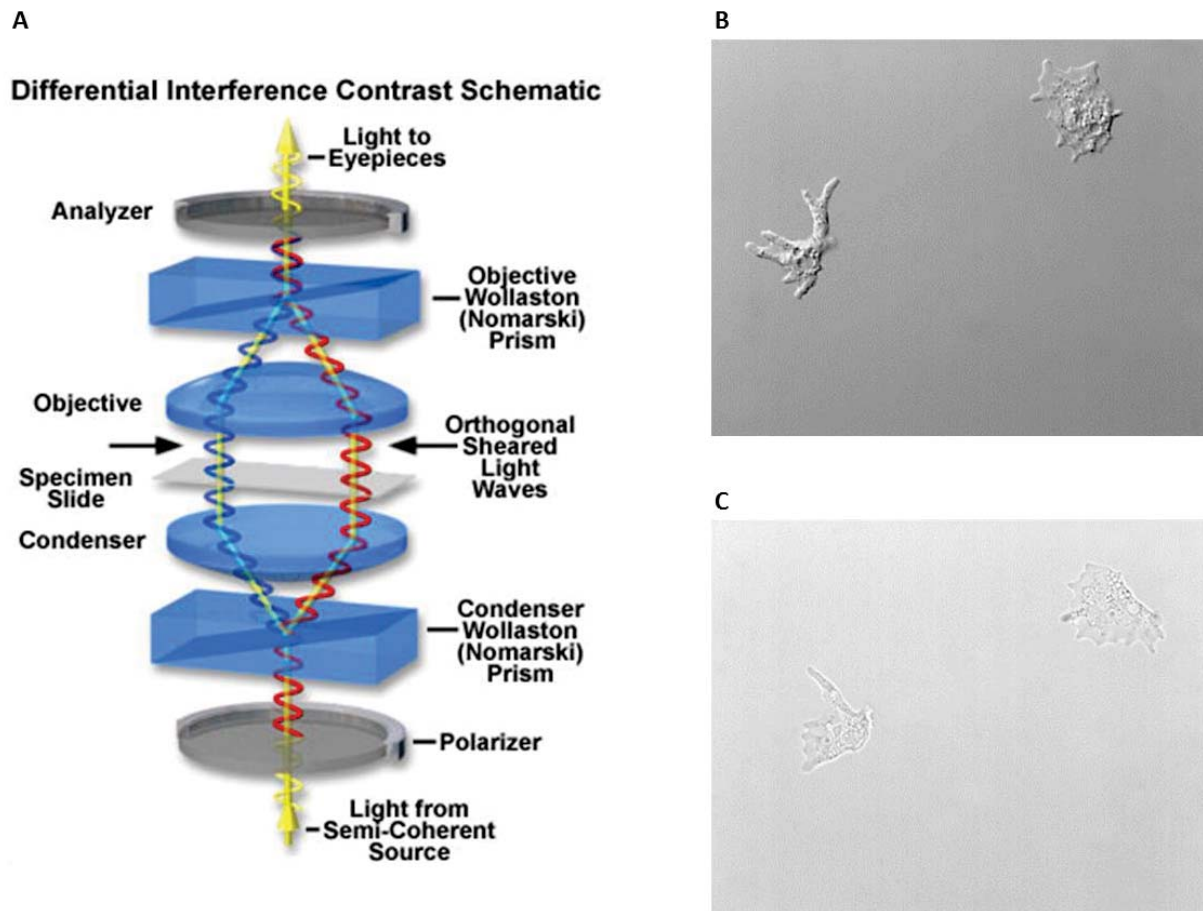


Figure 73. Microscopie de contraste interférentiel différentiel ou DIC. (A) Schématisation de la technique DIC (Source de l'image : <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/dic/dicoverview.html>). **(B)** *Amoeba proteus* observé par microscopie DIC. **(C)** *Amoeba proteus* observé par microscopie optique à champ clair. (Source des images B et C : <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/differential-interference-contrast-dic/>).

Dans le cadre du suivi morphologique des bactéries, les échantillons de culture bactérienne sont normalisés sur base de la densité optique. Les échantillons sont ensuite déposés sur des lames porte-objets enduites de poly-L-lysine.

Annexes

→	FHA	72	QGLV-PQGQ---TQVLQGGNKV---PVVNIADPNSGGVSHNKFFQGFNVANPGVVFNNGLTDCV-SRIGGALTKPNPLT-RQASALAEVTDTSFSRLAG
	HecA	48	GVTV-ASGN---TALEAAGNGV---PVVNIATPDASGLSHNRYHDFNVDRGLFLNNGTARLTPSQLGGLIQNPNLNGRAAAAALNEVVS-PNRSRLAG
	EthA	36	GGAL-GPG-----VATAPSGA---QVVNIPTDRGLSHNQYQDFNVNRRPGAVFNNACTGCE-SQLAGALANPNLHGQSASVLLNEVISRNPSSLIG
	HpmA	36	AGHQ-GPD-----VSAVNGGT---QVINIVTPNNEGISHNQYQDFNVGKPGAVFNNALEACQ-SQLAGHLNANSNLNGQAASLILNEVVSRLNPSFLLG
	ShlA	37	NGAN-GPG-----VSTAATGA---QVVDI VAPNGNGLSHNQYQDFNVNQPQAVLNNSREACL-SQLAGOLGANPNLGGREASVILNEVIGRNPSSLHGG
	HhdA	30	DSSN-TNV-----YKKDKNNI---EIIINIAAPASAGLSYNQYSKYNVDVSGVVLNNAQTDIH-TQLAGNISANPHLTQASANILNEVVSFKDPSKLLG
	PaTpsA	53	ALPSGATVVSADAGFQSTG-GRHMVTDQOS-----HKLITNWNESVSRADERVSFHQPGQ-----DAVALNRVIGRNGSDIQG
	EtpA	67	NLPTGGQIVAGSGSIQTPS--GNQMNTHQNS-----QNMVANWNSFDIGKNGTVQFDQPS-----SAVALNRVVGGSQIMG
	RscA	71	SLPVNGNIVVGGQ--KMDVN-NTTLTIQOS-----DKLAINWGSFDIAQGNVVIYNQPGQ-----QSIALNQVLGRDASQIYG
	HxuA	34	GLPQEDKVVVGGQATFDKTIADK--MTINQTS-----DKVQINWHSFDIGQNKVEFKQPS-----NSVAYNRVTTGGNASQIQG
→	HMW1A	69	SGLQGMVYVHGTATMQVDGN-K---TIRNS-----VDAIINWQFNIDQNEVQFLQENN-----NSAVFNRTVSNQISQLKG
	FHA		TLEVYKGGADLIANPNGISVNI--GLSTLNASNLTLTTRPSV---NGGR-IGLDVQ---QGTVTIERGGVNA-TGLGYFDVVARIVKLQ--GAVSS
	HecA		YLEVAGQAAANVVVANPNYGITCS--CGCFILNTPRLTLITGTPQFDAA--GGL-SGLDVR---GGDILIDGAGLDA-SRSDYFGLIARTASLQ--AGLNA
	EthA		QQEVFGMAADYVLANPNGITCD--CGCFINTTRSAIVVGNPLVE--GGA-LSAYST---LNNDNRLQIGTGGLSTNSVLDLVAPRIESV--GAVSA
	HpmA		QQEVFGIAAEYVLSNPNGITCD--CGCFINTSRSSLVVGNPLFE--NQGL-KGYSTL---NNTNLS-LGKNGLNTTGLLDLIAPRIDSR--GKITA
	ShlA		QQEIFFMAADYVLANPNGISQ--SCGFINTSHSSLVVGNPLVE--NGVL-QGYSTF---GNNRNL-LNGT-LNAGGVLDLIAPKIDSR--GEVIV
	HhdA		KQEIAGKIADYILVNPNGMSCD--CGCFINISNASLVVGNENIT--DQVL-KGYRID---GSHN-IS-TTKDISAETKLNLIAPVYVNIK--GNIKG
	PaTpsA		RIDANG---KVELVNPNGVVFEGKSAQVNVG--GLVASTLDLADRDFLA-GNYQF---SGDSG-ATVSNA--GSLQASEGGSIALGARVSN--GLIQA
	EtpA		NLKANG---QVFLVNPNGVLFEGASVSTS--GFVASTRDIKNDDFMNR-RYTF--SGGQKAG-AAIVNQGELTTNAGGYVLAADRVSNI--SGTIRT
	RscA		NLKANG---QVFLVNPNGVLFEGKSAQVNVG--GLVASTLDLADRDFLA-GNYQF---SGDSG-ATVSNA--GSLQASEGGSIALGARVSN--GLIQA
	HxuA		KLTAANG---KVELVNPNGVVIITKGAENVA--GLLATTKDLEQISENS-NSYQF---TRKTKDRQVVKEGQVINEGEIKAKDFVVLNGDEVINKGNIN
	HMW1A		ILDSNG---QVFLVNPNGITIGKDAINTN--GFTASTLDISNENIKA-RNFTFE-OTKDKALAEIVNH--GLITVKGKGSVNLIGGKVKNE--GVISV
	FHA		-KQKPLADIADVAGASRYDHA---TRRATPIAAGARGAAGAYAIIDGTAAGAMYGK--HITLVSSDSG---LQVRLQSLSSP-----SAITV
	HecA		-RDAQVVLGANRVGADGRV-----TAQAGSG--PAPV--LALDTGALGGMYA--NRIRLVSTEQVGV-----VNTAGLSAREGDRL--SANGR
	EthA		-R-----EINAVSNNRL-----TRDLRQIDAGVNG---TALD SYLLGSMQA--GRIRIINTAAGSG---VKLAGTLHADQDI--SVAAK
	HpmA		-A-----EISAFTGQNTFS-----QHFDILSSQKPV---SALD SYFFGSMQS--GRIRIINTAEGSG---VKLAGKFTADNDL--SVKA-
	ShlA		-QDFKQSNQKVI SAAINAISGLNVRVARDGTVQASQQ-----MPTALD SYLLGSMQA--GRINIINTAAGSG---VKLAGSLNAGDEL--KVKA-
	HhdA		-KDY-----VNIITGHMEINVNDQLSISV-----LPNKGVLDGKIAGSIOA--NRIRIHSTDNRAT---LDIETGOLKGTN-----SVYIG
	PaTpsA		-----QLGDVALGAGGIINLNFDDGGLNLQVDKG-----SVDALAHNG--GLIRADGGQVILMARSADSLKTVVNNQ--GTLEARTLRSAE--GRIVL
	EtpA		-----PGKRTVLAASERITLQLDNGGLMSVQVTGD-----VVNALVNR--GLVSARDGQVYLTALGRGMLMNTVNLVS--GVVEASGMHRQ--GNIVL
	RscA		-----PQKVALASGSRVILNLDNRNLLGVQVQGD-----QVNTLLQNG--GLIRADGQVYLTALGRGMLMNTVNLVS--GVVEASGMHRQ--GNIVL
	HxuA		EKNSTINGKVVYSSGYNFTFLSDSGISVALEDNT-----VRGIVQNE--GSIKAGEITLSAKGR--KEALDSLVMNN--GVLEATKVSNNR--GRVVL
	HMW1A		-----NGGSISLAGQKITISDIINPTIYSIAAP-----ENEAVNL--GDIFAKGGNINVRA-----ATIRNQG--KLSADSVSKDKSGNIVL

Figure 74. Alignement de séquences des domaines TPS de diverses protéines TpsA représentatives. La numérotation indiquée en début de séquence pour chaque TpsA correspond au numéro du premier acide aminé suivant le peptide signal. Les résidus partageant une identité supérieure à 90% parmi l'ensemble des TpsA sont surlignés en vert. Dans le cas de la sous-famille de FHA (indiqué par une flèche), ces résidus sont surlignés en bleu. Et dans le cas de la sous-famille de HMW1A (également indiqué par une flèche), ces résidus sont surlignés en rouge. FHA, *Bordetella pertussis*; HecA, *Erwinia chrysanthemi*; EthA, *Edwardsiella tarda*; HpmA, *Proteus mirabilis*; ShlA, *Serratia marcescens*; HhdA, *Haemophilus ducreyi*; PaTpsA, *Pseudomonas aeruginosa*; EtpA, *Escherichia coli*; RscA, *Yersinia enterocolitica*; HxuA et HMW1A, *Haemophilus influenzae*. Adapté de (Yeo et al., 2007).

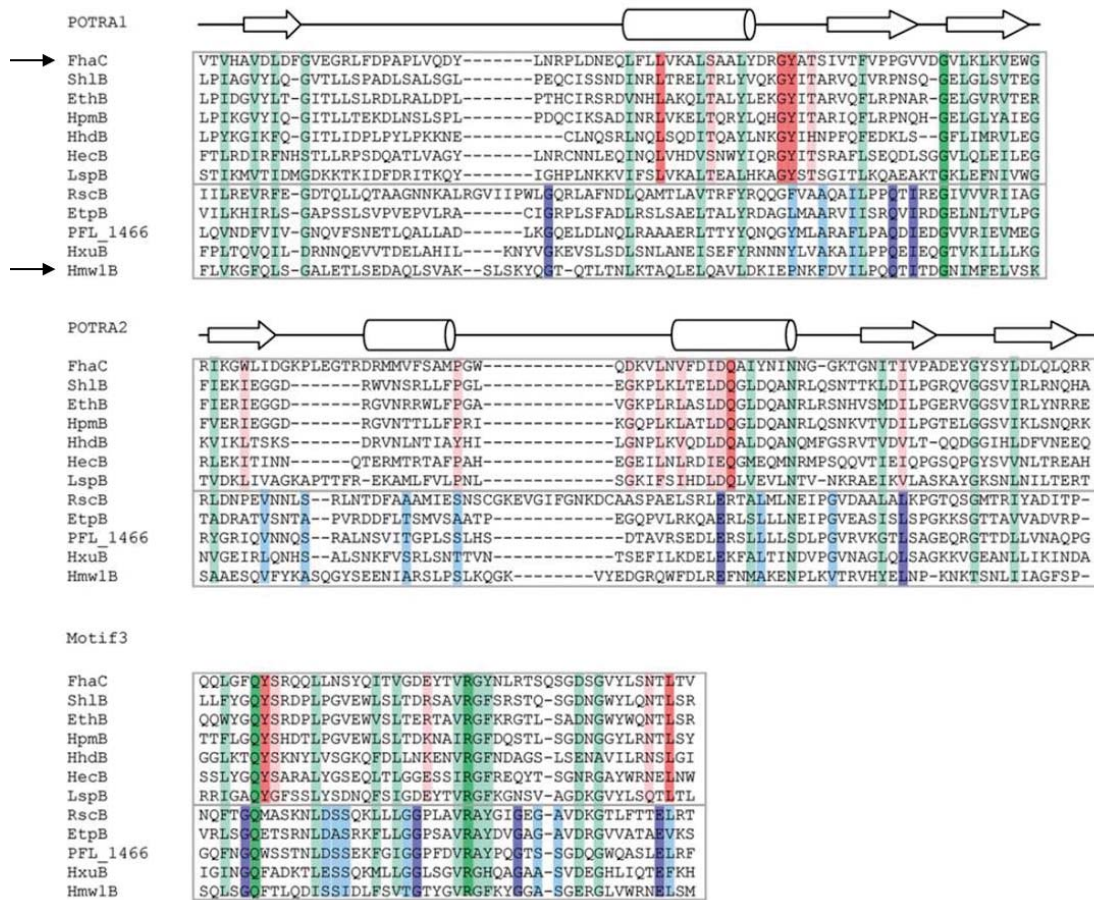


Figure 75. Alignement de séquences des domaines POTRA et du motif 3 de diverses protéines TpsB représentatives. Les résidus conservés parmi l'ensemble des TpsB sont surlignés en vert. Dans le cas de la sous-famille de FhaC (indiqué par une flèche), ces résidus sont surlignés en rouge. Et dans le cas de la sous-famille de HMW1B (également indiqué par une flèche), ces résidus sont surlignés en bleu. FhaC, *Bordetella pertussis*; ShlB, *Serratia marcescens*; EthB, *Edwardsiella tarda*; HpmB, *Proteus mirabilis*; HhdB, *Haemophilus ducreyi*; HecB, *Erwinia chrysanthemi*; LspB, *Haemophilus ducreyi*; RscB, *Yersinia enterocolitica*; EtpB, *Escherichia coli*; PFL_1466, *Pseudomonas protegens*; HxuB et HMW1B, *Haemophilus influenzae* (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2009).

Publications

1. Article: “Structure of the secretion domain of HxuA from *Haemophilus influenzae*” (épreuve de l'article)

structural communications

Acta Crystallographica Section F
Structural Biology
and Crystallization
Communications

ISSN 1744-3091

Stéphanie Baelen, Frédérique Dewitte, Bernard Clantin and Vincent Villeret*

Institut de Recherche Interdisciplinaire, IRI USR
3078 CNRS–Université Lille Nord de France,
Parc CNRS de la Haute Borne, 50 Avenue de
Halley, 59658 Villeneuve d'Ascq, France

Correspondence e-mail:
vincent.villeret@iri.univ-lille1.fr

Received 17 September 2013
Accepted 28 October 2013

PDB reference: secretion domain of HxuA, 4i84

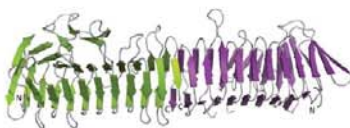
Structure of the secretion domain of HxuA from *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae HxuA is a cell-surface protein with haem–haemopexin binding activity which is key to haem acquisition from haemopexin and thus is one of the potential sources of haem for this microorganism. HxuA is secreted by its specific transporter HxuB. HxuA/HxuB belongs to the so-called two-partner secretion systems (TPSs) that are characterized by a conserved N-terminal domain in the secreted protein which is essential for secretion. Here, the 1.5 Å resolution structure of the secretion domain of HxuA, HxuA301, is reported. The structure reveals that HxuA301 folds into a β -helix domain with two extra-helical motifs, a four-stranded β -sheet and an N-terminal capping. Comparisons with other structures of TpsA secretion domains are reported. They reveal that despite limited sequence identity, strong structural similarities are found between the β -helix motifs, consistent with the idea that the TPS domain plays a role not only in the interaction with their specific TpsB partners but also as the scaffold initiating progressive folding of the TpsA proteins at the bacterial surface.

1. Introduction

Haemophilus influenzae has an absolute requirement for haem for aerobic growth. Haem–haemopexin complexes are one of the potential sources of haem for this microorganism. HxuA, a 96.3 kDa cell-surface protein, has haem–haemopexin binding activity and is the key to haem acquisition from haemopexin. HxuA belongs to the HxuCBA system, which consists of an operon encoding three proteins: HxuA, HxuB and the TonB-dependent haem receptor HxuC (Cope *et al.*, 2001). HxuA, which is conserved among *H. influenzae* strains, is released at the cell surface by its transporter HxuB (Cope *et al.*, 1995), rendering the protein accessible for interaction with haem–haemopexin. Following the interaction between HxuA and haem–haemopexin, haem is released and becomes accessible to the haem receptor HxuC for transport within the bacteria (Fournier *et al.*, 2011).

A key element for efficient HxuA function is thus its transport to the cell surface by its associated transporter HxuB. HxuA/HxuB belongs to the so called two-partner secretion (TPS) pathway found in Gram-negative bacteria (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2009). Currently, hundreds of TPS systems have been identified, mainly from large-scale sequencing initiatives, and an increasing number of them are being characterized. As implied by the name, TPS systems involve couples of proteins: the secreted proteins are collectively called TpsA proteins (the ‘cargos’) and their outer membrane partners are collectively called TpsB proteins (the ‘transporters’). The defining feature of the TpsA proteins is the presence of a conserved, approximately 250-residue ‘TPS’ domain located at the N-terminus of the mature protein. Most TpsA proteins are large and are predicted to form extended β -helix structures (Kajava *et al.*, 2001; Kajava & Steven, 2006). TpsB partners are 60 kDa proteins that are embedded in the outer membrane and are composed of two large moieties. The periplasmic moiety is formed by two successive POTRA (polypeptide transport-associated) domains (Sánchez-Pulido *et al.*, 2003) involved in the recognition of the TpsA cargo (Hodak *et al.*, 2006; Delattre *et al.*



© 2013 International Union of Crystallography
All rights reserved

structural communications

et al., 2011). The C-terminal moiety is embedded in the outer membrane and forms a 16-stranded antiparallel β -barrel that delimits a channel thought to be the translocation pore for the TpsA partner (Méli *et al.*, 2006). Schematically, the mechanistic model for two-partner secretion is as follows. Like other signal-peptide-dependent secretion pathways, the first step is the export of the TpsA preprotein across the cytoplasmic membrane by the Sec machinery, coupled with signal-peptide cleavage (Braun *et al.*, 1992; Grass & St Geme, 2000; Chevalier *et al.*, 2004). The TpsA protein transits through the periplasm in an extended conformation assisted by chaperones (Baud *et al.*, 2009) and recognizes the periplasmic domain of its cognate TpsB partner, which initiates TpsA translocation through the TpsB pore. The TpsA polypeptide progressively crosses the outer membrane and folds. Additional steps found in a subset of systems include proteolytic maturation of the TpsA protein and/or its release from the cell surface into the milieu (Domenighini *et al.*, 1990; Barenkamp & Leininger, 1992; Ward *et al.*, 1998; Aoki *et al.*, 2005).

Structure-based multiple sequence alignments of the TPS domains of TpsA proteins have revealed two distinct subsets, with FHA, Sh1A, LspA, HpmA, HhdA and HecA clustered in one group (Clantin *et al.*, 2004) while HMW1A, HxuA, RscA and EtpA appear to form another more distantly related cluster (Yeo *et al.*, 2007). A similar

clustering is revealed for their associated TpsB partners (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2009).

Structural studies of FHA/FhaC from *Bordetella pertussis* led to crystallographic determination of the secretion domain of FHA, Fha30 (Clantin *et al.*, 2004), and its membrane partner FhaC, the only TpsB structure reported to date (Clantin *et al.*, 2007). Further structural data is available on another TpsA: the crystal structure of the secretion domain of *Proteus mirabilis* HpmA (HpmA265; Weaver *et al.*, 2009) belongs to this subfamily. Only one TpsA structure has been reported for the HMW1A/HMW1B subfamily, the secretion domain of HMW1A (HMW1A-PP; Yeo *et al.*, 2007). The HxuA/HxuB system from *H. influenzae* belongs to this latter subfamily (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2009). To date, all structures reported for TpsA secretion domains originate from proteins which function as adhesins or haemolysins in pathogenic processes, while HxuA has a unique function among TpsA proteins as an interaction protein promoting haem release from haemopexin. Despite these functional differences, HxuA is also predicted to contain an N-terminal domain required for the secretion process, while the functional domains involved in haemopexin recognition are found in the rest of the protein (Cope *et al.*, 1994, 1998; Fournier *et al.*, 2011). As a first attempt to further characterize HxuA at the structural level and gain insights into its secretion process, we produced, purified, crystallized and determined the structure of its secretion domain (HxuA301).

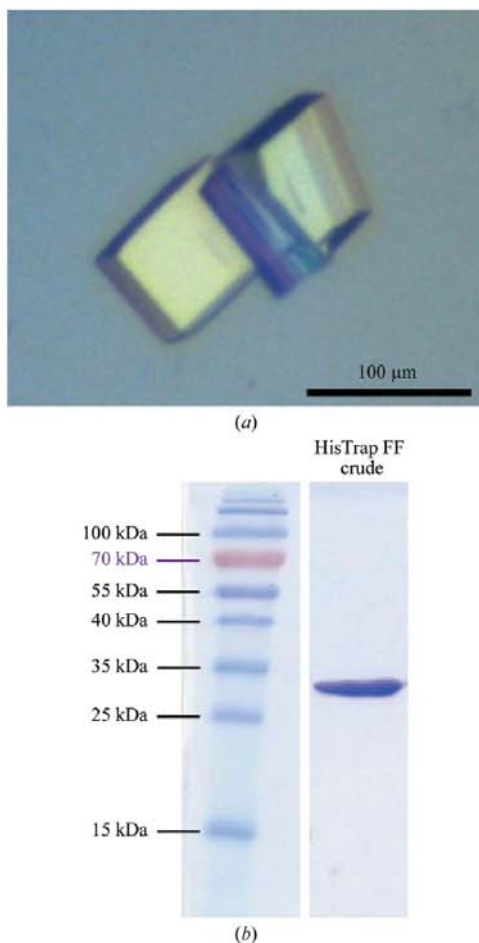


Figure 1
(a) His₇-HxuA301 crystal. (b) SDS-PAGE gel of purified His₇-HxuA301 (33.3 kDa).

2. Methods

2.1. Construction of strains, protein expression and purification

The pFHxuA₃₀₁ vector was obtained as follows. A 5' segment of the *hxuA* gene encoding amino acids 1–301 without the signal peptide was amplified by PCR from *H. influenzae* KW20 genomic DNA using the forward primer 5'-GCGCAAGCTTCTCGAGAACACCACCACCACCACCACCACCGGGATTTGCCACAAGGTAGCAGTGTA-GTT-3' and the reverse primer 5'-GACAGATCTTTAACCATTG-ATATTAACGCTTTTGCCTGTAAA-3'. The sequence encoding the histidine tag is shown in bold. The amplicon was purified, digested with *Xho*I and *Bgl*II restriction enzymes (Fermentas) and cloned into the pFLAG-CTS Expression Vector (Sigma-Aldrich), which contains the *ompA* signal peptide sequence upstream of the multiple cloning site.

The *hxuB* gene was amplified by PCR from *H. influenzae* KW20 genomic DNA using the forward primer 5'-CCGCTCGAGAATTAGATCGGCCAGATACTGGA-3' and the reverse primer 5'-GGA-AGATCTTTAGAAAGTTTAAATCATAGA-3'. The amplicon was purified, digested with *Xho*I and *Bgl*II restriction enzymes (Fermentas) and cloned into the pFLAG-CTS Expression Vector, thus creating pFHxuB. The pCHxuB vector was obtained as follows. The *Nde*I-*Bgl*II fragment encoding the *OmpA* signal peptide and the *HxuB* gene was excised from pFHxuB and inserted into the pCOLADuet-1 vector. The integrity of all vectors was verified by DNA sequencing.

The expression vectors pFHxuA₃₀₁ and pCHxuB were co-transformed into *Escherichia coli* strain BL21(DE3)omp5 by electroporation (Prilipov *et al.*, 1998). The bacteria were grown at 310 K in 11 LB medium supplemented with 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ampicillin and 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ kanamycin. Overexpression of His₇-HxuA₃₀₁ and HxuB was induced at an OD₆₀₀ of 0.6 by the addition of 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and cell growth was continued for 3 h at 310 K.

After 1 h of centrifugation at 4700g, one tablet of EDTA-free protease-inhibitor cocktail (cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor

structural communications

Cocktail, Roche) and 50 mM imidazole pH 6.5 were added to the culture supernatant. The His₇-HxuA₃₀₁ protein contained in the supernatant was purified using a HisTrap FF Crude 1 ml column (GE Healthcare) equilibrated with 50 mM imidazole pH 6.5 and was eluted with 1 M imidazole pH 6.5. After elution, pure His₇-HxuA₃₀₁ was directly recovered at a concentration of 2.8 mg ml⁻¹ (Fig. 1).

2.2. Crystallization

Crystallization trials were carried out by the hanging-drop vapour-diffusion method. The conditions from The Cryos Suite screening kit (Qiagen) were investigated by mixing 1 µl protein solution and 1 µl well solution at 293 K. Initial crystallization hits were optimized to obtain suitable crystals for data collection. The best crystallization condition was 1 M imidazole pH 6.5 (from the protein solution), 0.095 M trisodium citrate pH 5.6, 19% (v/v) 2-propanol, 5% (v/v) glycerol, 12% (w/v) PEG 4000 (Fig. 1), yielding crystals that belonged to space group *P*₂₁ with unit-cell parameters *a* = 38.99, *b* = 70.84, *c* = 104.98 Å, β = 98.1°.

2.3. Data collection and processing

Prior to data collection, the crystals were briefly soaked in 0.095 M trisodium citrate pH 5.6, 19% (v/v) 2-propanol, 5% (v/v) glycerol, 19% (w/v) PEG 4000. X-ray data were collected at 100 K on the PROXIMA1 beamline at the SOLEIL synchrotron (Gif-sur-Yvette, France). The diffraction data were indexed, integrated, scaled and merged with the *XDS* package (Kabsch, 2010). The statistics of data

collection are summarized in Table 1. The volume of the unit cell suggests the presence of two molecules in the asymmetric unit.

2.4. Structure solution and refinement

The structure of the secretion domain HxuA₃₀₁ was solved by molecular replacement using *MOLREP* v.9.2 from the *CCP4* suite v.6.1.13 (Winn *et al.*, 2011). A search model based on the HMW1A-PP structure (PDB entry 2odl; Yeo *et al.*, 2007), which shares 26.9% sequence identity with HxuA₃₀₁, was prepared in which side chains were truncated to alanine using *PDBSET* from the *CCP4* suite v.6.1.13 (Winn *et al.*, 2011). Model building was performed using *ARP/wARP* v.7.1 (Langer *et al.*, 2008) coupled to the *CCP4* package, specifically using *REFMAC5* (Murshudov *et al.*, 2011). The two molecules in the asymmetric unit were treated independently during refinement. Rounds of model manipulation using *Coot* (Emsley *et al.*, 2010) interspersed with refinement using *REFMAC5* were used to complete the protein model with the addition of water molecules. The final refinement statistics are presented in Table 1.

The loops between strands β 15 and β 16 in monomers *A* and *B* (see Fig. 4b for β -strand numbering) are not well defined, with residues Leu126–Gln130 and Lys127–Glu134 missing in the electron-density map, respectively. Monomer *B* presents four additional poorly defined regions (residues Glu113–Asn118, Thr181–Ser185, Glu192–Ala195 and Gly217–Gln220). The overall *B* factors are 19.2 Å² for monomer *A* and 22.6 Å² for monomer *B*.

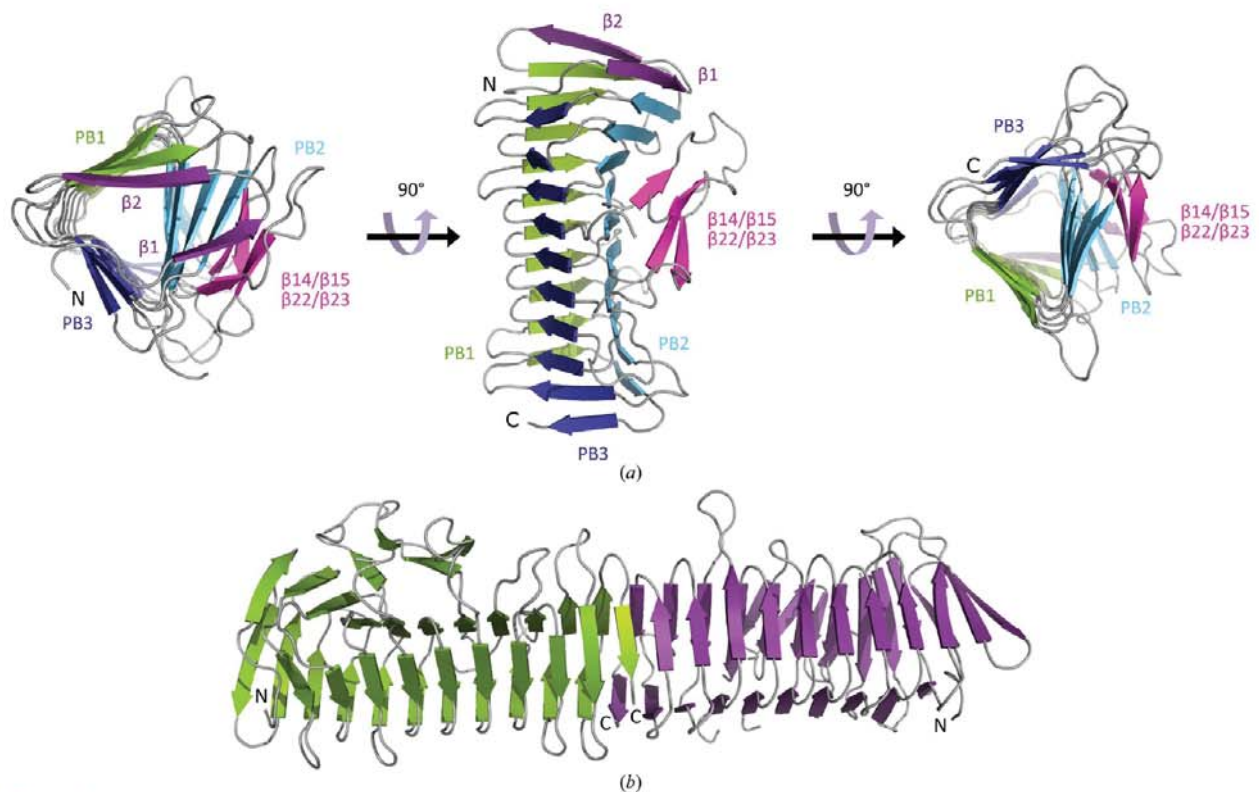


Figure 2
(a) Ribbon representations of the β -helix structure of HxuA₃₀₁. β 1 and β 2 are coloured purple, PB1 green, PB2 sky blue, PB3 dark blue and the extra-helical motif β 14/ β 15– β 22/ β 23 pink. (b) Ribbon representation of the HxuA₃₀₁ dimer corresponding to the asymmetric unit of the crystal. N- and C-terminal extremities are indicated.

structural communications

3. Results and discussion

3.1. General comments and overall structure

The HxuA301 protein folds as a right-handed parallel β -helix consisting of ten coils (Fig. 2a). Each coil contributes to a complete turn of the parallel β -helix (Jenkins & Pickersgill, 2001). Like the TPS domains of FHA from *B. pertussis* and HpmA from *P. mirabilis*, HxuA301 crystallizes as a homodimeric β -helix (Fig. 2b). This dimeric organization appears to be functionally irrelevant because it results from the antiparallel β -complementation of the C-terminal last β -strands of the truncated protein. The dimensions of a monomer of HxuA301 are $50 \times 38 \times 30 \text{ \AA}$.

The structural motif of the right-handed parallel β -helix is made up of three parallel β -sheets named PB1, PB2 and PB3 (Fig. 2a). The coils of the β -helix become more regular from the N-terminal to the C-terminal part to finally display a triangular-shaped section. In most right-handed β -helices the hydrophobic core is shielded from the solvent by an amphipathic α -helix at the N-terminus (Jenkins & Pickersgill, 2001). However, the N-terminal capping of the HxuA301 β -helix is carried out not by an α -helix but by strands $\beta 1$ and $\beta 2$. $\beta 1$ and $\beta 2$ initiate PB2 and PB1, respectively, and represent the only antiparallel strands found in the three parallel β -sheets PB1–3.

Residues whose side chains are oriented towards the interior of the β -helix are mostly hydrophobic. In its β -helix motif, HxuA301 includes 'stacked' residues, defined as similar residues found at equivalent position in adjacent coils (Yoder *et al.*, 1993; Petersen *et al.*, 1997; Jenkins & Pickersgill, 2001). The PB1 β -sheet of HxuA301 includes two aliphatic stacks composed of six and ten residues, with the longer stack running along the entire parallel β -sheet. These stacks are composed of alanine, valine, leucine, isoleucine and methionine residues. The PB2 β -sheet of HxuA301 also includes two aliphatic stacks of six and nine residues composed of alanine, valine, leucine and isoleucine residues. Finally, PB3 includes two aliphatic stacks composed of three and eight residues comprising only valine and isoleucine. The shortest aliphatic stack is directly followed by an asparagine ladder involving residues Asn139, Asn158, Asn202 and Asn228 from $\beta 16$, $\beta 19$, $\beta 24$ and $\beta 27$, respectively. This asparagine ladder is also found in the structure of HMW1A-PP (Yeo *et al.*, 2007).

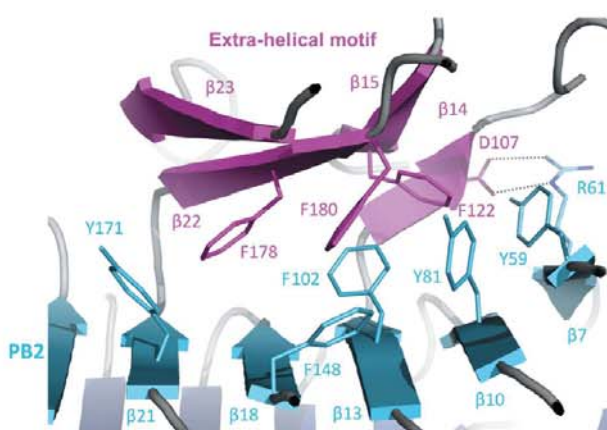


Figure 3

Close-up view of the interaction between the extra-helical motif and PB2. This motif, composed of strands $\beta 14$, $\beta 15$, $\beta 22$ and $\beta 23$, interacts with PB2 via one salt bridge (between Arg61 from $\beta 7$ and Asp107 from $\beta 14$) and via a network of aromatic-aromatic interactions involving eight residues: three tyrosines (Tyr59, Tyr81 and Tyr171) and five phenylalanines (Phe102, Phe122, Phe148, Phe178 and Phe180).

Table 1

Data-collection and refinement statistics for HxuA301 (PDB entry 4i84).

Values in parentheses are for the outermost resolution shell.

Data collection	
Unit-cell parameters (\AA , $^\circ$)	$a = 38.99$, $b = 70.84$, $c = 104.98$, $\beta = 98.1$
Space group	$P2_1$
Beamline	PROXIMA1, SOLEIL
Wavelength (\AA)	0.98011
Temperature (K)	100
Detector	PILATUS 6M
Crystal-to-detector distance (mm)	269.63
Rotation range per image ($^\circ$)	0.2
Exposure time per image (s)	0.2
Images collected	1200
Resolution (\AA)	1.50 (1.59–1.50)
No. of reflections	
Observed	397746 (62011)
Unique	89861 (14222)
Crystal mosaicity ($^\circ$)	0.2
Completeness (%)	99.2 (97.8)
Multiplicity	4.4 (4.4)
$R_{\text{merge}}(I)^\dagger$ (%)	3.6 (27.8)
R_{meas}^\ddagger (%)	4.0 (31.7)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	21.7 (4.6)
Refinement	
R_{work}^\S (%)	15.9 (23.2)
R_{free}^\P (%)	21.0 (29.4)
Mean B (\AA^2)	20.9
No. of non-H atoms	
Protein	4708
Water	171
R.m.s.d.	
Bond lengths (\AA)	0.027
Bond angles ($^\circ$)	2.236
Ramachandran statistics ‡‡ (%)	
Preferred	97.5
Allowed	2.5
Disallowed	0.0

$^\dagger R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $I_i(hkl)$ is the observed intensity and $\langle I(hkl) \rangle$ is the average intensity for multiple measurements. $^\ddagger R_{\text{meas}} = \sum_{hkl} [N(hkl)/N(hkl) - 1]^{1/2} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $N(hkl)$ is the number of times a given reflection has been observed. $^\S R_{\text{work}} = \sum_{hkl} |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \sum_{hkl} F_{\text{obs}}$, where F_{obs} is the observed structure factor and F_{calc} is the calculated structure factor. $^\P R_{\text{free}}$ is the same as R_{work} , except calculated using 5% of the data that were not included in any refinement calculations. ‡‡ Ramachandran values are given by the PROCHECK software from the CCP4 suite v.6.1.13 (Winn *et al.*, 2011).

Sequence analyses reveal that this asparagine motif is present in all functionally characterized TpsA proteins of this subfamily, such as the adhesin EtpA from *E. coli* and RscA from *Yersinia enterocolitica*, suggesting that this motif might be a signature of the HMW1A subfamily.

HxuA301 presents one extra β -helix motif corresponding to an antiparallel β -sheet composed of strands $\beta 14$, $\beta 15$, $\beta 22$ and $\beta 23$ and flanked against PB2 (Fig. 2a). This extra-helical motif interacts with PB2 via one salt bridge (between Arg61 from $\beta 7$ and Asp107 from $\beta 14$) and via a network of aromatic-aromatic interactions involving eight residues: three tyrosines (Tyr59, Tyr81 and Tyr171) and five phenylalanines (Phe102, Phe122, Phe148, Phe178 and Phe180) (Fig. 3). Within the HMW1A subfamily, such an extended aromatic-aromatic network is only found in HxuA. The structure of HMW1A-PP reveals a smaller aromatic network involving four residues at the interface between the extra-helical motif and PB2.

3.2. Structure comparison

HxuA301 from *H. influenzae* is the fourth TpsA secretion-domain structure to be reported to date, in addition to those of Fha30 from *B. pertussis* (PDB entry 1rwr; Clantin *et al.*, 2004), HMW1A-PP from *H. influenzae* (PDB entry 2odl; Yeo *et al.*, 2007) and HpmA265 from *P. mirabilis* (PDB entry 3fy3; Weaver *et al.*, 2009). All secretion

structural communications

domains form a right-handed β -helix structure composed of three parallel β -sheets and capped by two or three β -strands (Fig. 4). This capping is specific to TpsA proteins; in other proteins adopting a right-handed β -helical fold, the hydrophobic core is shielded from the solvent by an amphipathic α -helix at the N-terminus. This specificity may result from the specialization of TPS systems for the secretion of proteins essentially composed of amphipathic β -strands.

Despite the low sequence conservation, the extra-helical motif $\beta 14/\beta 15$ - $\beta 22/\beta 23$ forming an antiparallel β -sheet is systematically

observed, with a slight difference in HMW1A-PP, in which strand $\beta 14$ is replaced by an α -helix (represented in yellow in Fig. 4). The functional role of this α -helix is still unknown. The conserved extra-helical motif may presumably be required at some stage in the mechanism of secretion. Indeed, functional studies of the FHA/FhaC system revealed that the deletion of hairpins in this region drastically reduced secretion (Hodak *et al.*, 2006).

The TpsA proteins are divided into two subfamilies: the FHA and the HMW1A subfamilies (Yeo *et al.*, 2007; Jacob-Dubuisson *et al.*,

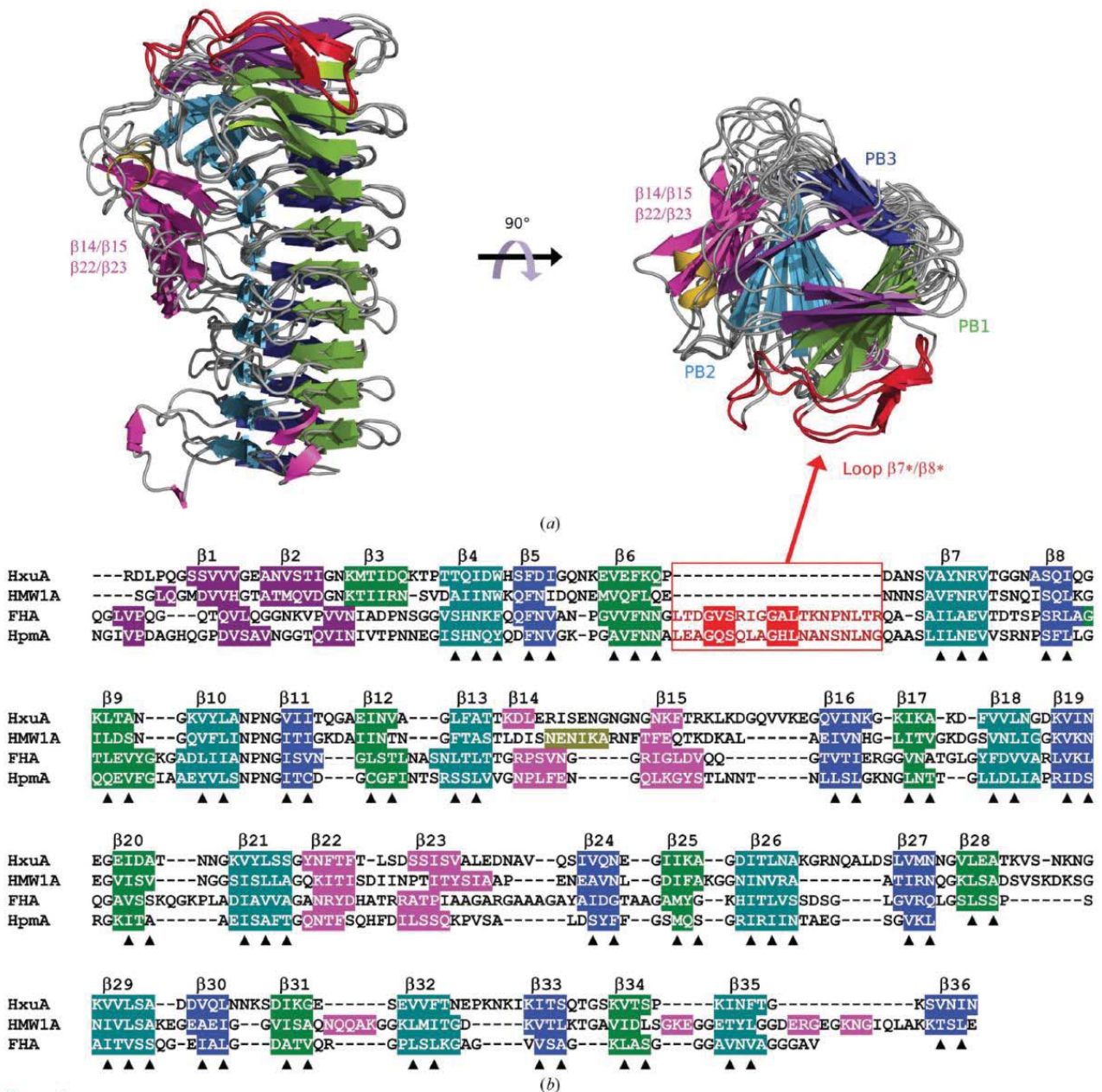


Figure 4

Structural alignment of TPS domains from TpsAs of known structure. $\beta 1$ and $\beta 2$ are coloured purple, PB1 green, PB2 sky blue, PB3 dark blue and the extra-helical motifs pink (and yellow in the case of the α -helix present in the HMW1A structure). The loop $\beta 7^*/\beta 8^*$ specific to the FHA/FhaC subfamily is coloured red. (a) Ribbon representation of the structural alignment of TPS domains from HxuA301, HMW1A (PDB entry 2od1), HpmA (PDB entry 3fy3) and FHA (PDB entry 1rwr). (b) Sequence alignment based on structural alignment of TPS domains of known structure. The residues whose side chains are oriented towards the interior of the β -helix are marked by a black triangle.

structural communications

2009). In addition to the $\beta 14/\beta 15-\beta 22/\beta 23$ motif, TpsA proteins from the FHA subfamily show a second extra-helical motif made up by a long extension containing two antiparallel β -strands, designated loop $\beta 7^*/\beta 8^*$. This extension includes the NPNL motif which is conserved throughout this subfamily. Although of unknown function, this motif may play a specific role in the secretion mechanism of these TpsA proteins, for which a stable interaction between the N-terminal extremity of FHA and FhaC has been hypothesized during the secretion process (Mazar & Cotter, 2006).

HMW1A-PP, Fha30 and HpmA265 share 30.3, 14 and 14% identity, respectively, with HxuA over the 301 residues of the HxuA construct. The r.m.s. deviation calculated from residues whose side chains are oriented towards the interior of the helix (marked by a black triangle in Fig. 4b) is 0.55 Å between HxuA301 and HMW1A-PP, 1.41 Å between HxuA301 and HpmA265 and 1.29 Å between HxuA301 and FHA30. Thus, despite limited sequence identity, strong structural similarities are found between the β -helix motifs of TpsA proteins.

We thank the PROXIMA1 beamline staff for support during data collection. SB is supported by a PhD fellowship from the CNRS. FD, BC and VV are researchers from the CNRS. This work has been supported by the CNRS, ANR grant DYN FHAC (2010–2014), the Region Nord-Pas-de-Calais (France) and the CPER-CIA.

References

- Aoki, S. K., Pamma, R., Hernday, A. D., Bickham, J. E., Braaten, B. A. & Low, D. A. (2005). *Science*, **309**, 1245–1248.
- Barenkamp, S. J. & Leininger, E. (1992). *Infect. Immun.* **60**, 1302–1313.
- Baud, C., Hodak, H., Willery, E., Drobecq, H., Locht, C., Jamin, M. & Jacob-Dubuisson, F. (2009). *Mol. Microbiol.* **74**, 315–329.
- Braun, V., Hobbie, S. & Ondracek, R. (1992). *FEMS Microbiol. Lett.* **79**, 299–305.
- Chevalier, N., Moser, M., Koch, H.-G., Schimz, K.-L., Willery, E., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F. & Müller, M. (2004). *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 7–18.
- Clantin, B., Delattre, A.-S., Rucktooa, P., Saint, N., Méli, A. C., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F. & Villeret, V. (2007). *Science*, **317**, 957–961.
- Clantin, B., Hodak, H., Willery, E., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F. & Villeret, V. (2004). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 6194–6199.
- Cope, L. D., Love, R. P., Guinn, S. E., Gilep, A., Usanov, S., Estabrook, R. W., Hrkal, Z. & Hansen, E. J. (2001). *Infect. Immun.* **69**, 2353–2363.
- Cope, L. D., Thomas, S. E., Hrkal, Z. & Hansen, E. J. (1998). *Infect. Immun.* **66**, 4511–4516.
- Cope, L. D., Thomas, S. E., Latimer, J. L., Slaughter, C. A., Müller-Eberhard, U. & Hansen, E. J. (1994). *Mol. Microbiol.* **13**, 863–873.
- Cope, L. D., Yogev, R., Muller-Eberhard, U. & Hansen, E. J. (1995). *J. Bacteriol.* **177**, 2644–2653.
- Delattre, A.-S., Saint, N., Clantin, B., Willery, E., Lippens, G., Locht, C., Villeret, V. & Jacob-Dubuisson, F. (2011). *Mol. Microbiol.* **81**, 99–112.
- Domenighini, M., Relman, D., Capiou, C., Falkow, S., Prugnola, A., Scarlato, V. & Rappuoli, R. (1990). *Mol. Microbiol.* **4**, 787–800.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. (2010). *Acta Cryst. D* **66**, 486–501.
- Fournier, C., Smith, A. & Delepelaire, P. (2011). *Mol. Microbiol.* **80**, 133–148.
- Grass, S. & St Geme, J. W. III (2000). *Mol. Microbiol.* **36**, 55–67.
- Hodak, H., Clantin, B., Willery, E., Villeret, V., Locht, C. & Jacob-Dubuisson, F. (2006). *Mol. Microbiol.* **61**, 368–382.
- Jacob-Dubuisson, F., Villeret, V., Clantin, B., Delattre, A.-S. & Saint, N. (2009). *Biol. Chem.* **390**, 675–684.
- Jenkins, J. & Pickersgill, R. (2001). *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **77**, 111–175.
- Kabsch, W. (2010). *Acta Cryst. D* **66**, 125–132.
- Kajava, A. V., Cheng, N., Cleaver, R., Kessel, M., Simon, M. N., Willery, E., Jacob-Dubuisson, F., Locht, C. & Steven, A. C. (2001). *Mol. Microbiol.* **42**, 279–292.
- Kajava, A. V. & Steven, A. C. (2006). *Adv. Protein Chem.* **73**, 55–96.
- Langer, G., Cohen, S. X., Lamzin, V. S. & Perrakis, A. (2008). *Nature Protoc.* **3**, 1171–1179.
- Mazar, J. & Cotter, P. A. (2006). *Mol. Microbiol.* **62**, 641–654.
- Méli, A. C., Hodak, H., Clantin, B., Locht, C., Molle, G., Jacob-Dubuisson, F. & Saint, N. (2006). *J. Biol. Chem.* **281**, 158–166.
- Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F. & Vagin, A. A. (2011). *Acta Cryst. D* **67**, 355–367.
- Petersen, T. N., Kauppinen, S. & Larsen, S. (1997). *Structure*, **5**, 533–544.
- Prilipov, A., Phale, P. S., Van Gelder, P., Rosenbusch, J. P. & Koebnik, R. (1998). *FEMS Microbiol. Lett.* **163**, 65–72.
- Sánchez-Pulido, L., Devos, D., Genevrois, S., Vicente, M. & Valencia, A. (2003). *Trends Biochem. Sci.* **28**, 523–526.
- Ward, C. K., Lumley, S. R., Latimer, J. L., Cope, L. D. & Hansen, E. J. (1998). *J. Bacteriol.* **180**, 6013–6022.
- Weaver, T. M., Hocking, J. M., Bailey, L. J., Wawrzyn, G. T., Howard, D. R., Sikkink, L. A., Ramirez-Alvarado, M. & Thompson, J. R. (2009). *J. Biol. Chem.* **284**, 22297–22309.
- Winn, M. D. *et al.* (2011). *Acta Cryst. D* **67**, 235–242.
- Yeo, H.-J., Yokoyama, T., Walkiewicz, K., Kim, Y., Grass, S. & St Geme, J. W. III (2007). *J. Biol. Chem.* **282**, 31076–31084.
- Yoder, M. D., Lietzke, S. E. & Jurnak, F. (1993). *Structure*, **1**, 241–251.

2. Revue : “ Two-partner secretion : as simple as it sounds?”



Institut Pasteur

Research in Microbiology 164 (2013) 583–595



www.elsevier.com/locate/resmic

Two-partner secretion: as simple as it sounds?

Françoise Jacob-Dubuisson^{a,b,c,d,*}, Jérémy Guérin^{a,b,c,d}, Stéphanie Baelen^{d,e}, Bernard Clantin^{d,e}

^a Inserm U1019, Lille, France

^b CNRS UMR 8204, Lille, France

^c Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille, 1 rue Calmette, 50919 Lille, France

^d Université Lille Nord de France, Lille, France

^e Interdisciplinary Research Institute, USR3078 CNRS, Parc de la Haute Borne, 50 av. Halley, BP 70478, 59658 Villeneuve d'Ascq, France

Received 12 November 2012; accepted 5 February 2013

Available online 28 March 2013

Abstract

The two-partner secretion (TPS) pathway is a branch of type V secretion. TPS systems are dedicated to the secretion across the outer membrane of long proteins that form extended β -helices. They are composed of a ‘TpsA’ cargo protein and a ‘TpsB’ transporter, which belongs to the Omp85 superfamily. This basic design can be supplemented by additional components in some TPS systems. X-ray structures are available for the conserved TPS domain of several TpsA proteins and for one TpsB transporter. However, the molecular mechanisms of two-partner secretion remain to be deciphered, and in particular, the specific role(s) of the TPS domain and the conformational dynamics of the TpsB transporter. Deciphering the TPS pathway may reveal functional features of other transporters of the Omp85 superfamily.
© 2013 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Protein secretion; Bacterial secretion pathways; Gram-negative bacteria; Membrane protein; Virulence factors; Protein transport

1. Introduction

The denomination ‘two-partner secretion pathway’ was coined in 2001 to describe what was then a handful of protein secretion systems homologous to one another and distinct from previously defined pathways in Gram-negative bacteria (Jacob-Dubuisson et al., 2001). It was soon to be considered a branch of type V secretion, alongside the autotransporter (AT) pathway (Henderson et al., 2004). This grouping, initially based on a number of common features between the two pathways, has recently found new ground with the discovery that secretion in both of them depends on transporters of the Omp85 superfamily.

Currently, hundreds of TPS systems have been identified thanks mainly to large-scale sequencing programs, and an increasing number of them are being characterized. As implied

by the name, there are two major players in TPS systems, the secreted proteins collectively called TpsA proteins (‘the cargos’) and their outer membrane partners collectively called TpsB proteins (‘the transporters’). The defining feature of the TpsA proteins is the presence of a conserved, approximately 250-residue-long ‘TPS’ domain located at the N-terminus of the mature protein. Most TpsA proteins are large and predicted to form extended solenoid structures, much like classical, type Va AT proteins (Kajava and Steven, 2006; Kajava et al., 2001).

TpsB partners are ≈ 60 kDa proteins embedded in the outer membrane. The structure of the TpsB transporter FhaC serves as a model for the TpsB family (Clantin et al., 2007). TpsB proteins are composed of two large moieties. The periplasmic moiety is formed by two successive POTRA (polypeptide transport-associated) domains (Sanchez-Pulido et al., 2003) involved in the recognition of the TpsA cargo (Delattre et al., 2011; Hodak et al., 2006). The C-terminal moiety is embedded in the outer membrane and forms a 16-stranded, anti-parallel β -barrel that delimits a channel thought to be the translocation pore for the TpsA partner (Méli et al., 2006). Schematically, the mechanistic model for two-partner secretion

* Corresponding author. Inserm U1019, Lille, France. Tel.: +33 320 87 11 55; fax: +33 320 87 11 58.

E-mail address: francoise.jacob@ibl.fr (F. Jacob-Dubuisson).

goes as follows. Like other signal-peptide-dependent secretion pathways, the first step is the export of the TpsA preprotein across the cytoplasmic membrane by the Sec machinery, coupled with signal-peptide cleavage (Braun et al., 1992; Chevalier et al., 2004; Grass and St Geme, 2000). No Tat-dependent TpsA proteins have been identified thus far, most likely because folded cargos are not compatible with TpsB-mediated translocation across the outer membrane (Guédin et al., 1998). The TpsA protein transits through the periplasm in an extended conformation assisted by chaperones (Baud et al., 2009) and recognizes the periplasmic domain of its cognate TpsB partner, which initiates TpsA translocation through the TpsB pore. The TpsA polypeptide progressively crosses the outer membrane and folds. Additional steps found in a subset of systems include proteolytic maturation of the TpsA protein and/or its release from the cell surface into the milieu (Aoki et al., 2005; Barenkamp and Leininger, 1992; Domenighini et al., 1990; Ward et al., 1998).

TpsB transporters belong to the Omp85 superfamily of protein transporters, ubiquitous proteins found in both the eukaryotic and prokaryotic kingdoms of life (Fairman et al., 2011; Gentle et al., 2005; Hsu and Inoue, 2009; Schleiff et al., 2011) (Fig. 1). Notably, BamA and its orthologs are essential proteins that, together with outer membrane lipoproteins, form hetero-oligomeric complexes involved in porin assembly in Gram-negative bacteria (for reviews: Bos et al., 2007; Grijpstra et al., in press; Knowles et al., 2009; Ruiz et al., 2006). Similar proteins are encoded in the genomes of other groups of bacteria with a second membrane (so-called 'diderms'; note that the composition of this membrane may differ from the outer membrane of Gram-negative bacteria), including Cyanobacteria, Spirochetes and Deinococcales

(Arnold et al., 2010; Bolter et al., 1998; Gentle et al., 2005; Nesper et al., 2008; Reumann et al., 1999). The superfamily also includes transporters in membranes of various organelles of endosymbiotic origin. Thus, Sam50/Tob55 is the central piece of a complex that mediates protein insertion into the outer membrane of mitochondria, and it is likely that Toc75-V (Oep80) has a similar function in chloroplasts (Hsu and Inoue, 2009; Paschen et al., 2003; Patel et al., 2008; Schleiff and Soll, 2005). Toc75-III is the core of a hetero-oligomeric complex involved in translocating proteins from the cytosol across the outer membrane of chloroplasts (Schleiff et al., 2003; Sommer et al., 2011). Similarly, the protein import channel of the trypanosomatid mitochondria outer envelope, called Atom, possibly belongs to the Omp85 superfamily (Harsman et al., 2012; Pusnik et al., 2011; Zarsky et al., 2012). Yet other Omp85 family members are found in prokaryotic-derived membranes of 'secondary' plastids of protists (Bullmann et al., 2010; Schleiff et al., 2011).

The hallmark features of the Omp85 superfamily include the presence of one to several N-terminal POTRA domains involved in protein–protein interactions – substrate recognition or assembly of heteromeric complexes–, and a predicted C-terminal β -barrel domain harboring conserved motifs (Arnold et al., 2010; Jacob-Dubuisson et al., 2009; Moslavac et al., 2005). The major roles of those proteins are the integration of cargo proteins into a membrane or the translocation of cargos across a membrane (Fig. 1). Regarding protein translocation, some transporters are specialized in the import of the cargo protein(s), while others mediate export. As for protein integration into the outer membranes of organelles, it occurs by conservative sorting in mitochondria, whereby proteins synthesized in the cytosol and destined to the outer

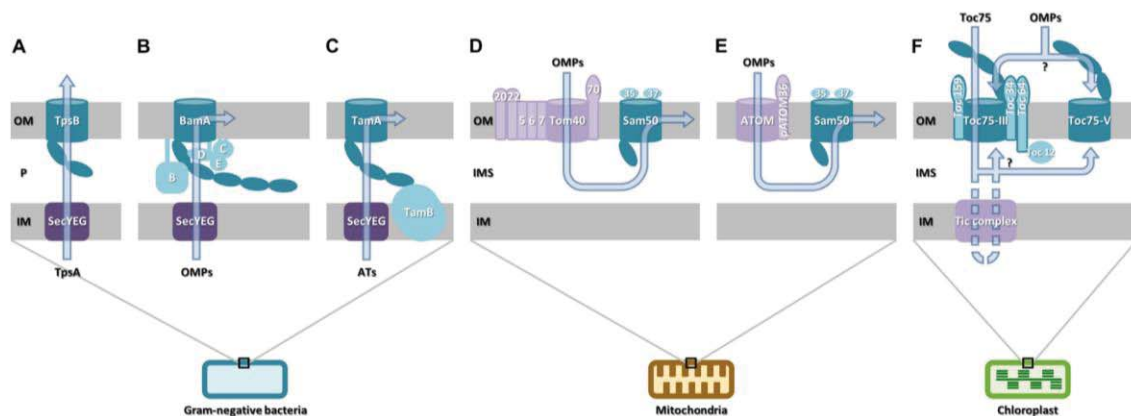


Fig. 1. Schematic representation of Omp85 superfamily proteins (in dark blue) and their major functions in Gram-negative bacteria (A–C), mitochondria (D–E) and chloroplasts (F). A) Two-partner secretion pathway. The TpsB protein secretes into the extracellular milieu its cognate TpsA partner. B) BamA is the core of the essential BAM complex (β -Barrel Assembly Machinery) responsible for integration of outer membrane proteins. C) TamA and TamB form the Translocation and Assembly Module (TAM) complex involved in the transport and assembly of a subset of autotransporters (ATs). D) Pre-proteins are translocated to mitochondria via the Translocase of the Outer Membrane (TOM) complex. The Sorting and Assembly of Mitochondria (SAM) complex, which includes the Omp85 protein Sam50, is required for the insertion of β -barrel OMPs and possibly of some α -helical components of the TOM complex. E) Mitochondria of trypanosomatids lack a bona fide Tom40. Instead, the Archaic Translocase of the Outer Mitochondrial membrane (ATOM) fulfills this function. Its phylogenetic origin remains debated, and sequence alignments have revealed a truncated barrel lacking some of the motifs of the Omp85 superfamily. F) Toc75-III is the core of the TOC complex required for the translocation into chloroplasts of cytosolically synthesized proteins, whereas Toc75-V is part of a complex involved in the assembly of outer membrane proteins. OM, outer membrane; IM, inner membrane; P, periplasm; IMS, intermembrane space; SecYEG, translocation channel complex of the Sec secretory system; OMPs, outer membrane proteins; ATs, autotransporters. Adapted from Fairman et al. (2011), Knowles et al. (2009), Schleiff and Soll (2005).

membrane of the organelle are first translocated to the inter-membrane space by a distinct machinery and then integrated into the outer membrane by the Sam complex (Schleiff and Soll, 2005; Sommer et al., 2011). Thus far, it appears that each type of transporter performs either integration or translocation and works in a single direction. However, even this may eventually be questioned.

TpsB transporters are not essential, nor are they part of large complexes, and therefore they appear to be ideally simple models to decipher essential principles of the super-family (Jacob-Dubuisson et al., 2009). However, the apparent simplicity of the TPS pathway is somewhat deceptive, and its molecular mechanisms of secretion largely remain to be understood.

2. Diversity of TPS systems: is “two-partner” a misnomer?

The functions of a limited number of TpsA proteins have been characterized among the hundreds of predicted TpsA proteins encoded in proteobacterial genomes. Although most systems under study are found in pathogenic bacteria, TPS systems are clearly not restricted to pathogens, but appear to be involved in interactions between bacteria and their environment in a general sense, either host tissues, substratum, self or other microorganisms. The functions identified for TpsA proteins include adherence, proteolysis, inhibition of phagocytosis, systemic dissemination of bacteria, intracellular survival, bacterial aggregation and biofilm formation, hemolysis/cytolysis, contact-dependent growth inhibition and iron acquisition, which contribute to bacterial fitness or virulence (Anderson et al., 2012; Aoki et al., 2005, 2010; Cope et al., 1995; Gottig et al., 2009; Jacob-Dubuisson et al., 2004; Kida et al., 2008; Nelson et al., 2001; Rojas et al., 2002; Roy et al., 2009; Serra et al., 2012; Tala et al., 2008; Vakevainen et al., 2003). Except for the TPS domain, TpsA proteins differ considerably. This very limited overall sequence identity and very diverse sizes – from approximately 700 to more than 5000 residues – likely explain their large functional diversity. Nevertheless, most of them are predicted to form extended β -helices, with the β -helical fold serving as a scaffold for the display of motifs or domains with specific functions (Bradley et al., 2001; Kajava and Steven, 2006).

The analysis of *tps* loci has revealed that, in many cases, the two partners are encoded in an operon (Jacob-Dubuisson et al., 2001) (Fig. 2A). However, several genomes encode more TpsA than TpsB proteins, and therefore it is likely that some TpsB transporters have more than one TpsA cargo. This was shown to be the case for the 86% identical LspA1 and LspA2 of *Haemophilus ducreyi*, both secreted by the LspB transporter, and for FhaB and FhaS of *Bordetella bronchiseptica*, both secreted by FhaC (Julio and Cotter, 2005; Ward et al., 1998, 2004). *Neisseria meningitidis* MC58 harbors genes for five TpsA proteins and two TpsB proteins, classified into three systems based on sequence similarities (van Ulsen and Tommassen, 2006; van Ulsen et al., 2008). The TpsA protein of system #3 is expressed during infection but has no

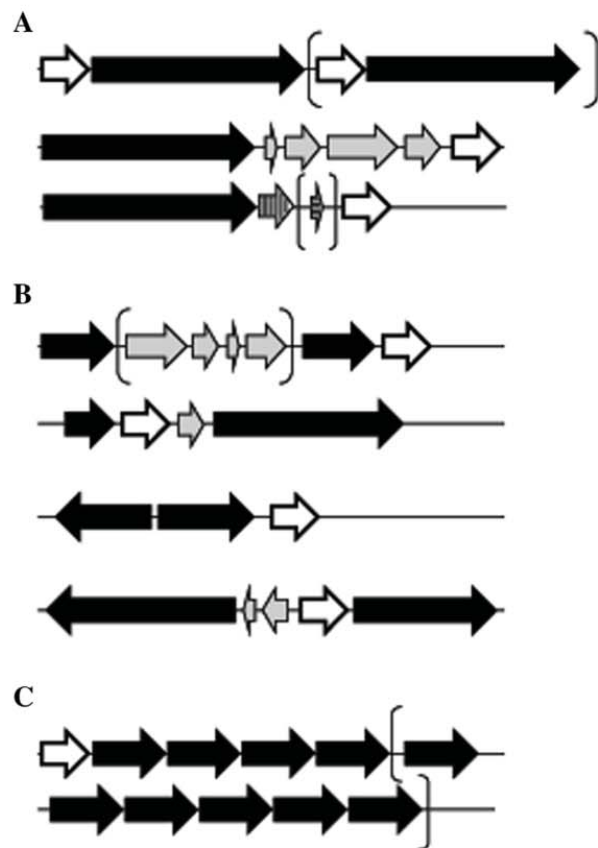


Fig. 2. Organization of *tps* loci. A) Most *tps* loci harbor a pair of *tpsA* and *tpsB* genes (shown in black and white throughout the figure, respectively), frequently in the order BA. In rare instances two BA pairs are found in tandem. This is exemplified by *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* Pm70 (PM0056 to PM0059) (first line). The A and B genes are not necessarily contiguous, like *fhaB* and *fhaC* in *Bordetella pertussis*, separated by four intervening, unrelated genes coding for the pilus assembly machinery (second line). In some operons, additional *tps*-related genes are found. These include the *hmcC* genes coding for glycosyltransferases that modify the TpsA HMW1 and 2 proteins in *H. influenzae*, and genes coding for immunity proteins of contact-dependent systems in various genera. A fourth gene, *bcpO*, can be found following *bcpI* as in *Burkholderia thailandensis* (BTH_I2721 to I2723) (third line). Note that, in some of those operons, the order of the genes differs from the one shown here. B) Several A genes can be found for a single B gene. They are either in tandem on the same strand as in *Minibacterium massiliensis* (mma_1615 to mma_1617), or with the second A separated from the complete pair by intervening genes as in *Arcobacter nitrofigilis* (Armit_2074, Armit_2075, Armit_2080) (first line). A *tpsB* gene with two *tpsA* genes on the same strand is found in *Burkholderia ambifaria* AMMD (Bamb_5443, Bamb_5444 and Bamb_5446) or in *Ralstonia eutropha* JMP134 (Reut_A2930, Reut_A2932, Reut_A2933) (second line). Alternatively, the second A is on the opposite strand as in *Burkholderia phymatum* (Bphy_5860 to Bphy_5862) (third line), or separated by intervening genes, as in *Neisseria meningitidis* H44/76 (NMBH4476_1684, NMBH4476_1685 and NMBH4476_1688) (fourth line). C) In rare cases, one B is found close to several As, as in *Pusillimonas* sp. T7-7 (PT7_0253, PT7_0268, PT7_0272, PT7_0286, PT7_0287) and in *Anabaena* sp. PCC7120 (all5116, all5104 to all5108 and all5110 to all5115). *tpsB* genes are represented by white arrows, *tpsA* genes by black arrows, and other genes by gray arrows. Genes are approximately drawn to scale. Parentheses indicate blocks absent from some of the loci described.

cognate transporter, and therefore it is probably secreted by a TpsB protein of system #1 or #2 (van Ulsen et al., 2008). A more extensive search for *tps* loci in eubacteria has confirmed that loci with *tpsB* and *tpsA* genes in tandem prevail, but several other arrangements are found. Thus, loci containing two pairs of *tpsB tpsA* genes occur (Fig. 2A), as well as loci harboring a single *tpsB* gene with two *tpsA* genes. The orientations of the *tpsA* genes relative to the *tpsB* – on the same strand or divergent – indicate the possibility of distinct regulations for the two *tpsA* genes (Fig. 2B). Rare cases have also been found with more than two *tpsA* genes in the same locus as a single *tpsB* gene (Fig. 2C). Although, whether the genes are transcribed and functional is unknown, in most of those cases, the one-to-one concept for the TPS pathway largely appears to be an oversimplification. It will be interesting to address the specificity of TpsB transporters for their TpsA substrates in a more thorough manner.

An additional layer of diversity comes from the fact that more than two partners are involved in some TPS systems (Fig. 2A). A first type is exemplified by the HMW1 and HMW2 adhesins of non-typeable *Haemophilus influenzae*, whose genes are found in the *hmw1abc* and *hmw2abc* operons, respectively (Barenkamp and St. Geme, 1994). Secretion of HMW1 and HMW2 requires both the TpsB transporters HMW1B or 2B and the enzymes HMW1C or 2C (St Geme and Grass, 1998). HMW1C has been shown to add mono- or di-hexoses to Asn residues in repeated sequence motifs of HMW1 (Gross et al., 2008), thus protecting the adhesin against proteolytic degradation.

Tps operons that encode contact-dependent growth inhibition (CDI) systems also contain additional genes (Aoki et al., 2005). The *cdiBA* genes are followed by a short *cdiI* gene coding for an immunity protein that protects the producing (CDI+) cells from auto-inhibition. The surface-associated CdiA protein mediates direct interbacterial interactions between the CDI+ cell and their target bacterial cells, causing growth inhibition of the latter bacteria (Fig. 3). In several species, the C-terminal portions of the CdiA proteins, called CdiA-CTs, and CdiIs are highly variable between strains (Aoki et al., 2010). The CdiA-CTs display distinct growth inhibition activities which are countered by binding of their cognate CdiI, but not by other CdiIs (Aoki et al., 2010). Some species harbor additional orphan *cdiA-CTcdiI* cassettes, which are most likely exchanged between CDI systems by homologous recombination, thus expanding the range of toxic activities that can be deployed for intercellular competition (Anderson et al., 2012; Poole et al., 2011). On top of this, an additional *bcpO* gene is found in most *Burkholderia*'s CDI operons (Anderson et al., 2012), whose product – most likely a lipoprotein – is necessary for the functioning of the system.

Other TPS systems make use of accessory proteins that are not encoded in the same locus. Thus, several TpsA proteins undergo proteolytic maturation in the course of secretion (see above), although in most cases the maturation protease has not been identified. The maturation of the precursor of the filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*, FhaB takes place at the bacterial surface after secretion by its TpsB

transporter, FhaC (Coutte et al., 2001, 2003a, 2003b). The removal of the C-terminal third of FhaB is catalyzed by the lipoprotein/AT SphB1 that belongs to the same virulence regulon as *fhaB* and *fhaC* (Antoine et al., 2000). In the absence of SphB1, FhaB is processed into a slightly larger form, presumably by other unidentified protease(s) (Mazar and Cotter, 2006).

This ever-growing list of more-than-two-partners systems illustrates the diversity found in the TPS pathway. However, the TpsA and TpsB partners form the basis of each system, and therefore the self-explanatory ‘TPS’ denomination appears to hold.

3. TpsB transporter

3.1. Structure

The structure of FhaC serves as a model for TpsB transporters (Fig. 4). In this paragraph, we describe briefly the major features of this structure and refer the interested readers to an earlier review for a more detailed analysis (Jacob-Dubuisson et al., 2009). The N-terminus of FhaC is localized on the extracellular side of the membrane domain and is immediately followed by a 20-residue-long α -helix called H1. The highly charged helix H1 passes through the β -barrel pore and is connected by a 30-residues proline-rich linker to two successive POTRA domains in the periplasm, POTRA1 and POTRA2. POTRA2 directly precedes the β -barrel composed of 16 anti-parallel β -strands, B1 to B16. The surface and periplasmic sides of the barrel are characterized by loops called L1 to L8 and short turns, respectively. The extra-long loop L6 that links B11 and B12 is folded as a hairpin into the barrel. The VRGY/F motif conserved in the Omp85 superfamily (Fig. 4) is located at the tip of the L6 hairpin oriented toward the periplasm. The β -barrel is thus occluded by H1 and L6, which are both poorly defined in the structure, indicating that they are mobile. Similarly, the linker between H1 and POTRA1 is not visible in the electron density map, reflecting its high flexibility.

Structure-based multiple sequence alignments of the TPS domains of TpsA proteins and of TpsB proteins have revealed two distinct subfamilies of TPS systems, exemplified by FHA/FhaC and by HMW1A/HMW1B, respectively (Jacob-Dubuisson et al., 2009; Yeo et al., 2007). Very few residues are conserved among TpsB proteins (Fig. 5). The conserved VRGY/F tetrad in L6 of FhaC is important for the functions of both FhaC and BamA (Delattre et al., 2010; Leonard-Rivera and Misra, 2012). We have also identified a conserved G/FxDxG sequence motif on strand B13 of FhaC (where x are hydrophobic residues) present in other Omp85 family members (Fig. 5). The F/G, D and G residues of the B13 motif are oriented toward the interior of the β -barrel, and in FhaC, D₄₉₂ is close to the L6 loop (Fig. 4) and important for activity (our unpublished data). Thus, we speculate that the two conserved VRGY/F and G/FxDxG motifs contribute to the general mechanism of translocation/insertion in the superfamily.

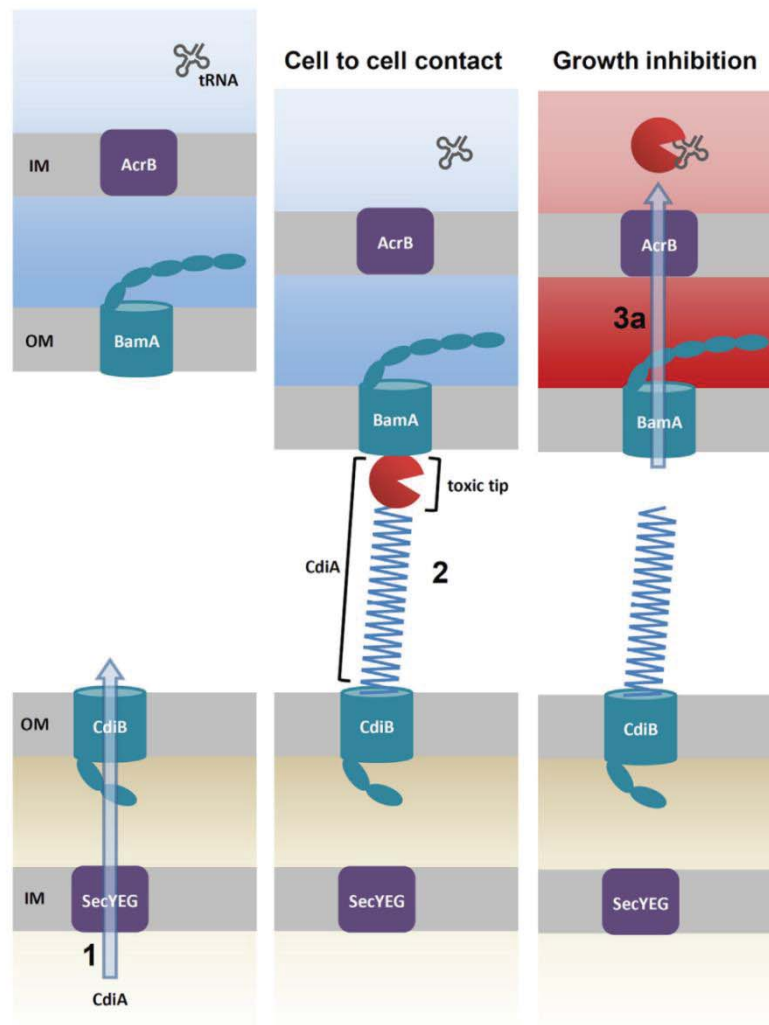


Fig. 3. Model of the CDI system in *E. coli*. CdiA crosses the inner membrane (IM) through Sec and is secreted to the cell surface of the inhibitor cell (shown at the bottom) through its TpsB partner CdiB (1). Cell-to-cell contact between CdiA and BamA in the outer membrane of the target bacterium (top of the figure) leads to the delivery of the toxic C-terminal moiety of CdiA (2). The most likely scenario is that the toxic moiety crosses the cell envelope through BamA and AcrB, gaining access to its specific cellular target (in this case, tRNA) and thus causing growth inhibition (3a). Alternatively, following cell-to-cell contact, a toxic signal is transmitted to the target cell. Cells producing the cognate immunity protein CdiI that inactivates the delivered toxin can grow (3b). Based on Aoki et al. (2010).

3.2. TpsB transporters: variations around a theme

FhaC and its orthologs in Proteobacteria represent prototypic TpsB proteins with two POTRA domains and a β -barrel (Fig. 6). In most of them, both an α -helical segment and a disordered proline-rich segment are predicted to precede the POTRAs, like H1 and the linker in FhaC. However, such sequences are absent from a few TpsB proteins, such as HMWIB (Jacob-Dubuisson et al., 2009).

Genes for classical TpsB proteins are also present in Cyanobacteria and in diderm bacteria generally classified as Gram-positive, such as Negativicutes, together with *tpsA* genes (Fig. 6) (Arnold et al., 2010). Note that those genomes harbor a *bamA* gene at a distinct location. In the

cyanobacterial TpsB proteins, two predicted POTRA domains are generally preceded by sequences predicted to form an α -helical structure followed by a proline-rich segment, two features reminiscent of H1 and the linker in proteobacterial TpsBs. We have also identified putative proteins where a predicted linker is not preceded by an α -helical structure (Fig. 6).

As in other types of secretion pathways, nature has taken advantage of the modular design of those systems to create hybrid proteins. Thus, in a few cases, *tpsA* and *tpsB* genes are fused, resulting in a large ORF coding for a protein with a TPS domain at the N-terminus, and POTRA domains and a β -barrel at the C-terminus (Fig. 6). An analogous situation is found in lipolytic patatin-like proteins present in Proteobacteria,

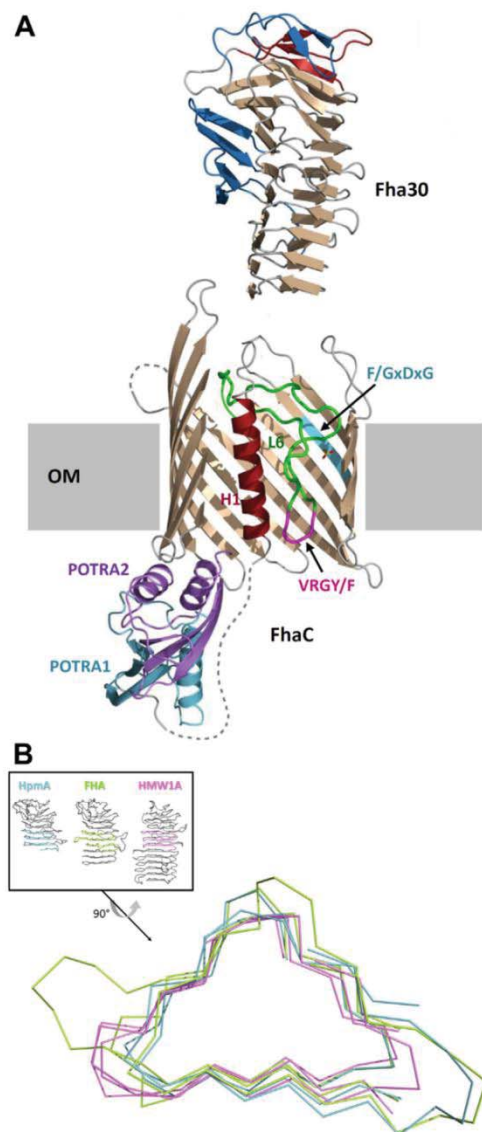


Fig. 4. A) Ribbon representations of Fha30 and FhaC at the same scale. This shows that the size of the Fha30 β -helix is incompatible with translocation in folded conformation through the TpsB pore as it is in the crystal structure. The capping and extra-helix motifs of the TPS domain are colored red and blue, respectively. The FhaC β -barrel represented by a cutaway view is obstructed by α -helix H1 and loop L6 colored red and green, respectively. The tip of L6 containing the VRGY/F motif is colored pink. The conserved F/GxDxG motif of β -barrel strand β 13 is colored blue. Periplasmic domains POTRA1 and POTRA2 are colored cyan and purple, respectively. The linker between H1 and POTRA1 and loop L5 are shown as dashed lines. The image was generated with PyMOL. B) Superposition of three coils of the TpsA proteins HpmA (blue), FHA (green) and HMW1A (pink). The structural elements flanking the β -helix have been removed for the superposition. Because HpmA265, Fha30 and HMW1A-PP proteins comprise 6, 9 or 12 coils, respectively, their lengths differ considerably, but their cross-sections have similar shapes and dimensions. The lengths of the loops also vary among the TpsA proteins. The small view in the left corner shows portions of the β -helices used for superposition.

Bacteroidetes, Fusobacteria and Chlorobi (Salacha et al., 2010). In PlpD of *Pseudomonas aeruginosa*, the characteristic patatin sequences are fused to a single predicted POTRA domain followed by a predicted 16-stranded β -barrel that mediates secretion of the N-terminal domain. The degeneracy in PlpD of the TpsB motifs described above indicates that the barrel domain of PlpD diverges from bona fide TpsBs. To which extent the secretion mechanism differs from classical two-partner secretion remains to be seen. The cargo has no TPS domain and most likely adopts a non- β -helix fold. Because the cargo and transporter are fused, the single POTRA domain most likely fulfills a strictly mechanistic role for secretion.

3.3. Beyond the structure: conformational dynamics of the TpsB transporter

The FhaC structure is thus far the only one of a full-length transporter of the Omp85 superfamily. Nevertheless, the structure does not provide strong clues on the mechanism of transport. Our hypothesis that the β -barrel serves as the TpsA-conducting channel is consistent with the pore-forming properties of TpsB proteins (Duret et al., 2008; Jacob-Dubuisson et al., 1999; Könniger et al., 1999; Méli et al., 2006; Surana et al., 2004). However, the channel of FhaC is almost totally obstructed (Fig. 4), and therefore if FHA crosses the outer membrane through this channel, significant conformational changes must occur. To test whether FhaC may adopt two conformations, a closed one like in the crystal structure and an open one with H1 and/or L6 out of the pore, we have tried to obtain its solution structure by using small angle neutron scattering (SANS). Our rationale was that both forms might exist in solution, but that crystal packing might have selected the closed form only. However, preliminary SANS data do not indicate an alternative conformation of FhaC (B. Clantin, F. Jacob-Dubuisson and others, unpublished). A caveat of this approach is that a minor form might not be detected if its relative abundance is too low. Alternatively, the cargo, which is not present in those experiments, might be required to open the transporter. We have thus turned to other techniques including site-specific labeling, electron paramagnetic resonance and in vivo cross-linking to address the conformational mobility of FhaC. Our preliminary results indicate that FhaC is much more dynamic than suggested by the X ray structure, and in particular that H1 can move to the periplasm (J. Guerin, unpublished). We thus speculate that H1 plugs the FhaC channel in the resting conformation of the transporter and that it is displaced out of the pore when FhaC secretes its cargo. Similarly, we have obtained preliminary information that L6 might change conformation in the presence of the cargo (Guédin et al., 2000), but the mutant that yielded this result is inactive, and thus further work is needed to confirm this.

If the TpsB transporter undergoes conformational changes in the course of secretion and if it turns over the cargo proteins — i.e., each copy of transporter successively secretes several copies of cargo — then the putative conformational changes

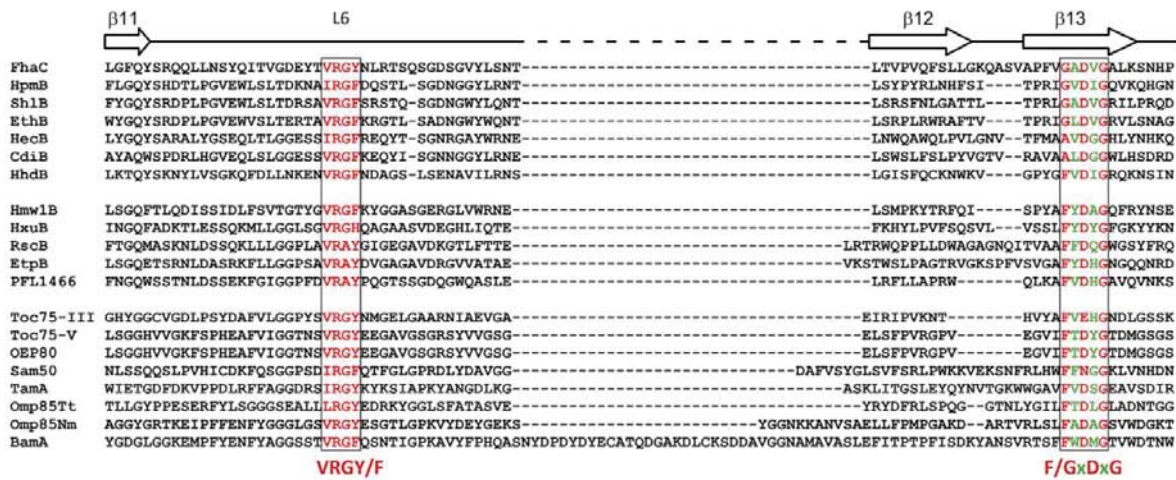


Fig. 5. Sequence alignments of representative TpsBs and other Omp85 proteins. The first and second blocks of sequences contain TpsB proteins of the first and second TpsB subfamilies, respectively. Various non-TpsB members of the Omp85 superfamily are shown in the third block. The region of FhaC from the end of B11 to the end of B13 has been aligned with that of other Omp85 proteins to show the conserved sequence motifs VRGY/F and F/GxDxG (colored red). The hydrophobic residues of the F/GxDxG oriented to the lipid bilayer are in green. Gly is most frequently found at the first position of this motif in the FhaC subfamily of TpsBs, while Phe is systematically present in the HMWB subfamily.

should be reversible. Because they occur in the absence of ATP or an electrochemical gradient, conversions between the different conformations should be close to energy-neutral. The question of one versus several rounds of translocation per transporter has not been addressed properly thus far, but preliminary experiments have indicated that one FhaC might transport several FHA in *B. pertussis* (our unpublished data). In contrast, for HMWB, the C-terminal domain of the HMW1 cargo plugs the channel at the end of translocation (Buscher et al., 2006), and therefore each transporter probably performs a single round of translocation.

In the course of cross-linking experiments we have identified a dimeric form of FhaC. Interestingly, HMW1B was shown earlier to form dimers and tetramers (Li et al., 2007; Surana et al., 2004), and other Omp85 proteins were reported to form homo-oligomers as well (Robert et al., 2006; Schleiff et al., 2003). These presumed FhaC dimers fall apart in the course of purification, indicating that they are rather labile. Whether TpsB oligomerization is permanent or transient and important for function remains unknown.

4. The TPS domain

4.1. The TPS domain: what is it for?

The N-terminal approximately 250-residue-long TPS domain is the defining feature of TpsA proteins (Fig. 4). Of note, the pfam domain PF05860 does not encompass the entire TPS domain; furthermore, it is wrongly called the ‘hemagglutination domain’. TPS domains come in two flavors, like their TpsB partners. In both subtypes, the TPS domain folds into a right-handed parallel β -helix formed of three parallel β -sheets, PB1 to PB3, and flanked by structural elements essentially composed of anti-parallel β -strands (Clantin et al., 2004;

Weaver et al., 2009; Yeo et al., 2007) (Fig. 4). The interior of the β -helix is mostly filled with aliphatic hydrophobic residues and capped at the N-terminus by anti-parallel β sheets as in some ATP passenger domains (Khan et al., 2011). The β -helix coils become more regular toward the C-terminus, with triangular-shaped cross-sections of similar size (Fig. 4). Although clearly related, each of the two TPS domain subtypes harbors specific sequence motifs found, in particular, in type I β -turns (Yeo et al., 2007). A type I β -turn with the NPNGI motif is conserved between the two subtypes, while a second one with the NPNL motif is found in the first subfamily only. These turns contribute to the stabilization of the β -helix and replacement of the first N-residue of each motif has drastic effects on secretion (Jacob-Dubuisson et al., 1997; Schonherr et al., 1993). In addition, a structural motif flanking the β -helix – a 4-stranded β -sheet composed of two β -hairpins or a 3-stranded β -sheet prolonged by an α -helix (Fig. 4) – is most likely involved in the mechanism of secretion in spite of low sequence conservation. Another structural motif is found only in the first subfamily, corresponding to β hairpin β 7/ β 8 in Fha30 and followed by the conserved NPNL motif (Fig. 4). Whether these minor structural differences between the two subfamilies cause mechanistic differences remains to be seen.

The TPS domain is essential for secretion in both subfamilies, as shown by targeted deletion and replacement of conserved residues (Grass and St Geme, 2000; Jacob-Dubuisson et al., 1997; Renauld-Mongénie et al., 1996; Schonherr et al., 1993). This has led to the hypothesis that it mediates molecular recognition of the cognate TpsB transporter. Indeed, direct interactions between the TPS domain of TpsA proteins and the POTRA domains of their transporters have been obtained by overlay, coprecipitation and surface plasmon resonance (SPR) (Delattre et al., 2011; Hodak et al., 2006; Surana et al., 2004). However, the crystal structures do

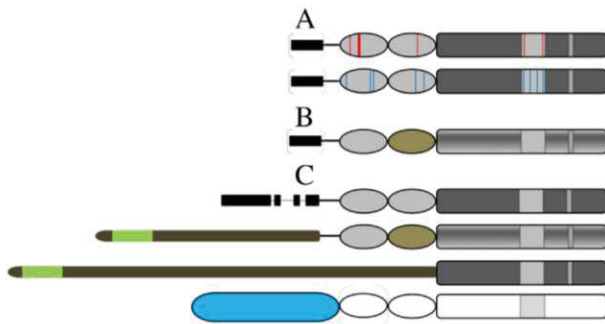


Fig. 6. Schematic representation of prototypical TpsBs and TpsB variants. Note that most of the latter proteins are only predicted from genomic sequences. The β -barrel domain is represented by a dark gray box, with gray rectangles inside indicating the motifs conserved in the Omp85 family. Predicted POTRA domains are represented by ovals. A) The two subtypes of TpsB are represented, with vertical red and blue lines indicating the positions of specific motifs found in each subtype. Representative members of the first subtype (first line) include FHAC_BORPE (*B. pertussis*), HLYB_SERMA (*S. marcescens*) and D2RM30_ACIFV (*Acidaminococcus fermentans*); representatives of the second subtype (second line) include HXUB2_HAEIF (*H. influenzae*), Q29XT8_ECCLX (*E. coli*) and D1BNY4_VEIPT (*Veillonella parvula*). In Proteobacteria, most TpsBs harbor an N-terminal α -helix (black box) followed by a Pro-rich region called linker in FhaC (black line). However, these elements are missing in a few cases (represented by the use of parentheses), such as B2PURI_PROST (*Providencia stuartii*), B4EST2_PROMH (*P. mirabilis*), C4T073_YERIN (*Yersinia intermedia*) and HMW1B (*H. influenzae*), which have neither element, or F0BGV1_9XANT (*Xanthomonas vesicatoria*), which has a predicted linker only. B) TpsBs of Cyanobacteria. The β -barrel domains are intermediate between those of Proteobacteria's TpsB and BamA barrels, and their POTRA2 (brown oval) are divergent from those of both Proteobacteria and Negativicutes (Arnold et al., 2010). A representative of this group is B1WPM2_CYAA5 (*Cyanothece* sp.). In a few cases, such as B2IZS4_NOSP7 (*Nostoc punctiforme*), A8ZPR7_A-CAMI (*Acarochloris marina*) and Q8DLPO_THIEB (*Thermosynechococcus elongatus*), the predicted N-terminal helix is missing (hence the parentheses), but the Pro-rich region is present. C) Atypical TpsB variants. A long N-terminal α -helical region is predicted in Q6Y659_BURPE (*Burkholderia pseudomallei*) (Brown et al., 2004) (first line). TpsA–TpsB fusions are predicted with two POTRAs and a β -barrel or with a barrel only for the cyanobacterial proteins Q10YU5, Q10YU7 and Q10YU7 (*Trichodesmium erythraeum*) (second line), or for B1FW34_9BURK (*Burkholderia graminis*) (third line), respectively. The TPS domain shown in pale green is followed by a region predicted to be rich in β -structure. Most patatin-TpsB fusions (see text) harbor a single predicted POTRA domain, such as in Q9HYQ6_PSEAE (*Pseudomonas aeruginosa*) and Q7MHW3_VIBVY (*Vibrio vulnificus*) (line 4). A few examples are found with two predicted POTRA domains, including Q8KC70_CHLTE (*Chlorobium tepidum*), A1B118_CHLPD (*Chlorobium phaeoacteroides*) and Q3ATV9_CHLCH (*Chlorobium chlorochromatii*). Note that the putative POTRA(s) and VRGY motifs are divergent from those of Proteobacteria, and the F/GxDxG motif is missing.

not give clues about the 'secretion signal', because interactions between cargo and transporter only occur with the TPS domain unfolded (Delattre et al., 2011; Hodak et al., 2006; Surana et al., 2004). Both conserved and non-conserved residues in two regions of the TPS domain appear to compose the putative secretion signal of FHA, indicating that specificity between the two partners may be determined by a combination of motifs (Hodak et al., 2006).

Nevertheless, some of the substitutions in the TPS domain abolish secretion without affecting the interactions between

the two partners, indicating that the TPS domain's role goes beyond providing determinants for molecular recognition (Hodak et al., 2006). SPR experiments have shown that a non-TPS-containing FHA fragment is also recognized by FhaC's POTRAs (Delattre et al., 2011). POTRA domains have been proposed to interact with other proteins by β -augmentation, by which the POTRA β sheet is prolonged by an extended segment from another protein (Gatzeva-Topalova et al., 2008; Kim et al., 2007; Koenig et al., 2010). Cargo-transporter interactions by β -augmentation are compatible with some of the sites of interaction for FHA mapped on FhaC (Delattre et al., 2011). Since most of FHA beyond the TPS domain is composed of short, amphipathic strands suitable for β -augmentation, it is reasonable to expect that the POTRA domains of FhaC could recognize other regions of the FHA cargo. Indeed, we have discovered that FhaC can secrete short, non-TPS portions of FHA with a signal peptide, although at lower efficiencies than the TPS-containing fragment of similar length (our unpublished data). These findings thus question the dogma according to which the TPS is essential for mediating initial interactions with the transporter. Although it has most likely been optimized for molecular recognition of its TpsB partner, this might not be its only function.

4.2. Does the TPS domain couple folding and secretion?

The N-terminal position of the TPS domain ensures that it emerges first from the Sec machinery into the periplasm and is thus in a privileged position to engage with the TpsB partner and therefore to reach the cell surface early in the course of secretion. Preliminary experiments on mechanical unfolding of FHA by atomic force microscopy have indicated that the TPS domain has good mechanical resistance (FJD and others, unpublished). Therefore, we propose that the conserved TPS domain structure plays a key role in TpsA folding by forming a stable 'nucleus' upon reaching the cell surface, which serves as a template for the progressive assembly of the β -helix. The initial folding may be facilitated by the vectorial translocation of the polypeptide, which limits the conformational space to be explored, and by the design of the TPS domain. Such a model would nicely explain the transport of such long proteins across the outer membrane in the absence of an electrochemical or chemical energy source, with the free energy released upon progressive folding of the protein at the cell surface powering secretion. That the folding of the TPS domain is coupled with translocation is supported by the observation that substitutions of key residues for the structure of the TPS domain affect the efficiency of translocation both in vivo and in vitro (Fan et al., 2012; Hodak et al., 2006).

Another model has been proposed, with translocation of the rest of the polypeptide preceding that of the TPS domain and occurring via the formation of a hairpin in the TpsB pore (Leo et al., 2012; Mazar and Cotter, 2006; Noel et al., 2012). In the hairpin model, the exposed C-terminus of the TpsA protein is poised for activity, as would be expected for the toxic domains of CdiA proteins or the active domain of FHA (Aoki et al., 2010; Julio et al., 2009), while the N terminal TPS domain

remains associated with the transporter (Noel et al., 2012). However, the mode of secretion of HMW1 is difficult to reconcile with such a model, because an N-terminal TPS-containing propiece, HMW1-PP, is naturally cleaved from the rest of the protein in the course of secretion and released into the milieu, while the mature adhesin remains anchored to the HMWB pore by its C-terminus (Buscher et al., 2006; St Geme and Yeo, 2009). The hairpin model also implies that the periplasmic interaction between TPS and the POTRAS persists throughout secretion, and thus folding of the TPS domain occurs late. Our finding that the TPS-POTRA interaction is highly dynamic, as assessed by SPR (Delattre et al., 2011), is at odds with this idea. Rather, the strong conservation of the TPS domain and the observation that it can be secreted in the absence of the rest of the protein in several TPS systems argues in favor of its role for priming secretion. This does not necessarily imply an exposed N-terminus for TpsA proteins, as it might re-associate with the bacterial surface in the course of secretion.

Observations that the secreted, folded TPS domain of the TpsA hemolysin Sh1A of *Serratia marcescens* triggers in vitro folding of full-length inactive Sh1A* support the role that we propose for the TPS domain (Schiebel et al., 1989; Walker et al., 2004). Accordingly, experiments with the homologous HpmAB system of *Proteus mirabilis* have indicated that the exposed β -strand edges of the TPS-containing HpmA265 fragment serve for template-assisted refolding of HpmA* molecules (Weaver et al., 2009).

Finally, a ‘TPS-first’ model might help reconcile conflicting observations regarding TpsA periplasmic intermediates. In the FHA/FhaC system, TPS-containing N-terminal FHA fragments remain secretion-competent for very short periods of time in the absence of FhaC, and soluble periplasmic intermediates cannot be found (Fan et al., 2012; Guédin et al., 1998). In contrast, for the OtpAB system of *Escherichia coli* O157:H7, a bona fide OtpA periplasmic intermediate has been described (Choi and Bernstein, 2009). A difference between the two systems is the presence in FhaB of an extended signal peptide, which slows down the rate of export across the cytoplasmic membrane and/or delays signal peptide processing (Chevalier et al., 2004). Altogether, we favor the idea that export across the cytoplasmic membrane and secretion across the outer membrane of TpsA proteins are mechanically separate steps, but the time frame for secretion competence of the periplasmic intermediate varies between TpsA proteins. Nevertheless, it cannot be excluded that the TPS domain of very long TpsA proteins such as FhaB engages with the TpsB transporter before the C-terminus of the polypeptide has completed Sec-dependent export, with the intervening polypeptide looping in the periplasm.

5. Do TpsA proteins need chaperones?

If TpsA proteins remain in extended conformations in the periplasm even for short periods of time, their degradation, aggregation or misfolding must be prevented. In vitro, long β -helical proteins such as ATs and N-terminal derivatives of

FHA are not prone to self-aggregation, although they refold slowly after denaturation (Baud et al., 2009, 2011; Hodak et al., 2006; Junker et al., 2006; Junker and Clark, 2009). Slow refolding in vitro is most likely linked to the fact that the polypeptide has to explore a much larger conformational space than if folding occurs in a vectorial manner, as is believed to occur in vivo (Junker et al., 2009; Peterson et al., 2010; see above for TPS).

When secretion is impaired, e.g. in the absence of the TpsB transporter, the periplasmic TpsA intermediates do not accumulate in large quantities, suggesting that they undergo proteolytic degradation, as expected for proteins in extended conformations (Jacob-Dubuisson et al., 1997; St Geme and Grass, 1998). However, not all TpsA proteins are degraded to the same extent in the absence of their partners (Choi and Bernstein, 2009; van Ulsen et al., 2008). Periplasmic degradation is likely to be influenced by the rate at which a TpsA protein folds into a protease-resistant conformation and by the proteolytic activity in the periplasm of the host bacterium. We have investigated the involvement of periplasmic chaperones in the FhaB/FhaC system. In *B. pertussis*, the chaperone/protease DegP contributes to the secretion of FHA. In vitro, DegP binds to and degrades denatured FHA fragments (Baud et al., 2009). We have identified a cytoplasmic membrane-associated form of DegP with high affinity for non-native FHA fragments (Baud et al., 2011). We propose that it works as a ‘holding chaperone’ for FHA under normal circumstances and as a protease when secretion is impaired, thus facilitating secretion or preventing periplasmic stress if secretion is defective. Whether our findings will be relevant to the TPS pathway in a more general sense awaits similar analyses of other systems. Note that DegP was found to contribute to the proteolytic degradation of *H. influenzae*’s HMW1 in the periplasm (St Geme and Grass, 1998). The involvement of other types of chaperones cannot be excluded (Hodak et al., 2008).

6. Type V secretion: missing links found

Type V secretion comprises both the TPS and AT pathways, which were initially grouped together based on common features, including: 1) their apparent simplicity – a single component for AT and two for TPS; 2) their Sec-dependent export across the cytoplasmic membrane; 3) predicted structural similarities among many AT passenger domains and TpsA proteins; 4) the presence of a β -barrel domain to transport the functional domain; and 5) a probable independence from cytosolic energy sources. However, the 12-stranded β -barrel of AT and 16-stranded β -barrel of TpsB are clearly not homologous, leading to a debate on whether AT and TPS may be convergent solutions for the transport of extended proteins that form long β -helices or if they are mechanistically related pathways (Henderson et al., 2000; Jacob-Dubuisson et al., 2000; Leo et al., 2012).

More recently, the discovery that BamA and its orthologues mediate the insertion of the AT barrel and possibly also the translocation of its passenger has established clear mechanistic relationships between the TPS and AT pathways, since both

BamA and TpsB proteins belong to the Omp85 superfamily (Bodelon et al., 2009; Ieva and Bernstein, 2009; Jain and Goldberg, 2007; Peterson et al., 2010; Sauri et al., 2009; Voulhoux et al., 2003). Nevertheless, the AT and TPS mechanisms necessarily differ to some extent. AT secretion implies coordination between insertion of the barrel and translocation of the passenger, while in TPS systems, although membrane integration of the TpsB protein likely depends on BamA as well, the steps in TpsB insertion and TspA translocation are separate (Fan et al., 2012; Guédin et al., 1998). In other words, the AT protein is a substrate to be both inserted and secreted, while TpsA proteins are ‘simply’ secreted.

While there is a strong case for involvement of BamA in insertion of the AT barrel, transport of the passenger domain is more contentious. Recently, yet another Omp85 protein, TamA, was found to be involved in secretion of a subset of AT proteins. TamA (for translocation and assembly module) is a non-essential protein in some Proteobacteria (Selkrig et al., 2012). The TAM complex spans the periplasm and is composed of two proteins, TamA (YtfM) and TamB (YtfN). The latter has a large periplasmic domain of unknown function and a predicted C-terminal DUF490 domain including a cytoplasmic membrane anchor. The TAM complex is involved in the secretion of some AT proteins with a β -helical passenger domain. Based on those findings, the authors have proposed that the BAM complex assembles the β -barrel and the TAM complex assists in β -helix secretion (Selkrig et al., 2012). How they coordinate their action is unknown. It should be noted that the specific involvement of BAM for known TAM substrates – or vice versa – has not yet been demonstrated.

New discoveries are thus continuously expanding the range of action of Omp85 family members. To conclude, we raise questions regarding the versatility of those proteins. In particular, are Omp85 proteins one-function, one-way transporters? Is it possible that Omp85 proteins working as ‘insertases’ serve as ‘translocases’ as well? The role of BamA for contact-dependent inhibition mediated by a class of TPS systems (see above) is interesting in this respect. Thus, the toxic effect of CdiA-CT requires BamA in the outer membrane of the target cell, though not the rest of the Bam machinery, and BamA harboring a substitution that impairs OMP biogenesis remains competent for CDI (Aoki et al., 2008). BamA might serve as a receptor that transmits a signal triggering CDI rather than as a channel for the translocation of the CdiA-CT fragment into the target bacterium, but the second possibility is more alluring given that BamA belongs to a family that includes translocases such as TpsB transporters. In conclusion, it is likely that more diversity of structure and function will be found for Omp85 proteins. Much remains to be learned about this fascinating family.

Acknowledgments

This work is currently supported in our laboratories by the ANR Blanc grant ‘DYN FHAC’ (2010–2014) to F.J.-D.

References

- Anderson, M.S., Garcia, E.C., Cotter, P.A., 2012. The *Burkholderia bcpAIOB* genes define unique classes of two-partner secretion and contact dependent growth inhibition systems. *PLoS Genet.* 8, e1002877.
- Antoine, R., Alonso, S., Raze, D., Coutte, L., Lesjean, S., Willery, E., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., 2000. New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* 182, 5902–5905.
- Aoki, S.K., Diner, E.J., de Roodenbeke, C.T., Burgess, B.R., Poole, S.J., Braaten, B.A., Jones, A.M., Webb, J.S., Hayes, C.S., Cotter, P.A., Low, D.A., 2010. A widespread family of polymorphic contact-dependent toxin delivery systems in bacteria. *Nature* 468, 439–442.
- Aoki, S.K., Malinverni, J.C., Jacoby, K., Thomas, B., Pamma, R., Trinh, B.N., Remers, S., Webb, J., Braaten, B.A., Silhavy, T.J., Low, D.A., 2008. Contact-dependent growth inhibition requires the essential outer membrane protein BamA YaeT as the receptor and the inner membrane transport protein AcrB. *Mol. Microbiol.* 70, 323–340.
- Aoki, S.K., Pamma, R., Hernday, A.D., Bickham, J.E., Braaten, B.A., Low, D.A., 2005. Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science* 309, 1245–1248.
- Arnold, T., Zeth, K., Linke, D., 2010. Omp85 from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* differs from proteobacterial Omp85 in structure and domain composition. *J. Biol. Chem.* 285, 18003–18015.
- Barenkamp, S.J., Leininger, E., 1992. Cloning, expression and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 60, 1302–1313.
- Barenkamp, S.J., St. Geme, J.W.I., 1994. Genes encoding high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* are part of gene clusters. *Infect. Immun.* 62, 3320–3328.
- Baud, C., Hodak, H., Willery, E., Drobecq, H., Locht, C., Jamin, M., Jacob-Dubuisson, F., 2009. Role of DegP for two-partner secretion in *Bordetella*. *Mol. Microbiol.* 74, 315–329.
- Baud, C., Gutsche, I., Willery, E., de Paep, D., Drobecq, H., Gilleron, M., Locht, C., Jamin, M., Jacob-Dubuisson, F., 2011. Membrane-associated DegP in *Bordetella* chaperones a repeat-rich secretory protein. *Mol. Microbiol.* 80, 1625–1636.
- Bodelon, G., Marin, E., Fernandez, L.A., 2009. Role of periplasmic chaperones and BamA (YaeT/Omp85) in folding and secretion of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.* 191, 5169–5179.
- Bolter, B., Soll, J., Schulz, A., Hinnah, S., Wagner, R., 1998. Origin of a chloroplast protein importer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15831–15836.
- Bos, M.P., Robert, V., Tommassen, J., 2007. Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 191–214.
- Bradley, P., Cowen, L., Menke, M., King, J., Berger, B., 2001. Betawrap: successful prediction of parallel β -helices from primary sequence reveals an association with many microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14819–14824.
- Braun, V., Hobbie, S., Ondraczek, R., 1992. *Serratia marcescens* forms a new type of cytolysin. *FEMS Microbiol. Lett.* 100, 299–306.
- Brown, N.F., Logue, C.A., Boddey, J.A., Scott, R., Hirst, R.G., Beacham, I.R., 2004. Identification of a novel two-partner secretion system from *Burkholderia pseudomallei*. *Mol. Genet. Genomics* 272, 204–215.
- Bullmann, L., Haarmann, R., Mirus, O., Bredemeier, R., Hempel, F., Maier, U.G., Schleiff, E., 2010. Filling the gap, evolutionarily conserved omp85 in plastids of chromalveolates. *J. Biol. Chem.* 285, 6848–6856.
- Buscher, A.Z., Grass, S., Heuser, J., Roth, R., St Geme 3rd, J.W., 2006. Surface anchoring of a bacterial adhesin secreted by the two-partner secretion pathway. *Mol. Microbiol.* 61, 470–483.
- Chevalier, N., Moser, M., Koch, H.G., Schimz, K.L., Willery, E., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., Müller, M., 2004. Membrane targeting of a bacterial virulence factor harbouring an extended signal peptide. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 8, 7–18.

- Choi, P.S., Bernstein, H.D., 2009. Sequential translocation of an *Escherichia coli* two-partner secretion pathway exoprotein across the inner and outer membranes. *Mol. Microbiol.* 75, 440–451.
- Clantin, B., Delattre, A.S., Rucktooa, P., Saint, N., Meli, A.C., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., Villeret, V., 2007. Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily. *Science* 317, 957–961.
- Clantin, B., Hodak, H., Willery, E., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., Villeret, V., 2004. The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6194–6199.
- Cope, L.D., Yogev, R., Muller-Eberhard, U., Hansen, E.J., 1995. A gene cluster involved in the utilization of both free heme and heme:hemoexin by *Haemophilus influenzae* type b. *J. Bacteriol.* 177, 2644–2653.
- Coutte, L., Alonso, S., Reveneau, N., Willery, E., Quatannens, B., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., 2003a. Role of adhesin release for mucosal colonization by a bacterial pathogen. *J. Exp. Med.* 197, 735–742.
- Coutte, L., Antoine, R., Drobecq, H., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., 2001. Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO J.* 20, 5040–5048.
- Coutte, L., Willery, E., Antoine, R., Drobecq, H., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., 2003b. Surface anchoring of bacterial subtilisin important for maturation function. *Mol. Microbiol.* 49, 529–539.
- Delattre, A.S., Clantin, B., Saint, N., Locht, C., Villeret, V., Jacob-Dubuisson, F., 2010. Functional importance of a conserved sequence motif in FhaC, a prototypic member of the TpsB/Omp85 superfamily. *FEBS J.* 277, 4755–4765.
- Delattre, A.S., Saint, N., Clantin, B., Willery, E., Locht, C., Villeret, V., Jacob-Dubuisson, F., 2011. Substrate recognition by the POTRA domains of TpsB transporter FhaC. *Mol. Microbiol.* 81, 99–112.
- Domenighini, M., Relman, D., Capiou, C., Falkow, S., Prugnola, A., Scarlato, V., Rappuoli, R., 1990. Genetic characterization of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. *Mol. Microbiol.* 4, 787–800.
- Duret, G., Szymanski, M., Choi, K.J., Yeo, H.J., Delcour, A.H., 2008. The TpsB translocator HMW1B of *Haemophilus influenzae* forms a large conductance channel. *J. Biol. Chem.* 283, 15771–15778.
- Fairman, J.W., Noinaj, N., Buchanan, S.K., 2011. The structural biology of beta-barrel membrane proteins: a summary of recent reports. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21, 523–531.
- Fan, E., Fiedler, S., Jacob-Dubuisson, F., Muller, M., 2012. Two-partner secretion of gram-negative bacteria: a single beta-barrel protein enables transport across the outer membrane. *J. Biol. Chem.* 287, 2591–2599.
- Gatzeva-Topalova, P.Z., Walton, T.A., Sousa, M.C., 2008. Crystal structure of YaeT: conformational flexibility and substrate recognition. *Structure* 16, 1873–1881.
- Gentle, I.E., Burri, L., Lithgow, T., 2005. Molecular architecture and function of the Omp85 family of proteins. *Mol. Microbiol.* 58, 1216–1225.
- Gottig, N., Garavaglia, B.S., Garofalo, C.G., Orellano, E.G., Ottado, J., 2009. A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. *PLoS ONE* 4, e4358.
- Grass, S., St Geme 3rd, J.W., 2000. Maturation and secretion of the non-typable *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin: roles of the N-terminal and C-terminal domains. *Mol. Microbiol.* 36, 55–67.
- Grijpstra, J., Arenas, J., Rutten, L., Tommassen, J., Autotransport secretion: varying on a theme. *Res. Microbiol.*, in press.
- Gross, J., Grass, S., Davis, A.E., Gilmore-Erdmann, P., Townsend, R.R., St Geme 3rd, J.W., 2008. The *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin is a glycoprotein with an unusual N-linked carbohydrate modification. *J. Biol. Chem.* 283, 26010–26015.
- Guédin, S., Willery, E., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., 1998. Evidence that a globular conformation is not compatible with FhaC-mediated secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *Mol. Microbiol.* 29, 763–774.
- Guédin, S., Willery, E., Tommassen, J., Fort, E., Drobecq, H., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., 2000. Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J. Biol. Chem.* 275, 30202–30210.
- Harsman, A., Niemann, M., Pusnik, M., Schmidt, O., Burmann, B.M., Hiller, S., Meisinger, C., Schneider, A., Wagner, R., 2012. Bacterial origin of a mitochondrial outer membrane protein translocase: new perspectives from comparative single channel electrophysiology. *J. Biol. Chem.* 287, 31437–31445.
- Henderson, I.R., Cappello, R., Nataro, J.P., 2000. Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion. *Trends Microbiol.* 8, 529–532.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., Ala'Aldeen, D., 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 692–744.
- Hodak, H., Clantin, B., Willery, E., Villeret, V., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., 2006. Secretion signal of the filamentous haemagglutinin, a model two-partner secretion substrate. *Mol. Microbiol.* 61, 368–382.
- Hodak, H., Wohlkonig, A., Smet-Noeca, C., Drobecq, H., Wieruszkeski, J.M., Senechal, M., Landrieu, I., Locht, C., Jamin, M., Jacob-Dubuisson, F., 2008. The peptidyl-prolyl isomerase and chaperone Par27 of *Bordetella pertussis* as the prototype for a new group of parvulins. *J. Mol. Biol.* 376, 414–426.
- Hsu, S.C., Inoue, K., 2009. Two evolutionarily conserved essential beta-barrel proteins in the chloroplast outer envelope membrane. *Biosci. Trends* 3, 168–178.
- Ieva, R., Bernstein, H.D., 2009. Interaction of an autotransporter passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 19120–19125.
- Jacob-Dubuisson, F., Buisine, C., Willery, E., Renauld-Mongenie, G., Locht, C., 1997. Lack of functional complementation between *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and *Proteus mirabilis* HpmA hemolysin secretion machineries. *J. Bacteriol.* 179, 775–783.
- Jacob-Dubuisson, F., El-Hamel, C., Saint, N., Guédin, S., Willery, E., Molle, G., Locht, C., 1999. Channel formation by FhaC, the outer membrane protein involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J. Biol. Chem.* 274, 37731–37735.
- Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R., Coutte, L., 2004. Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1694, 235–257.
- Jacob-Dubuisson, F., Locht, C., Antoine, R., 2001. Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol. Microbiol.* 40, 306–313.
- Jacob-Dubuisson, F., Rudy, A., Locht, C., 2000. Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion: response. *Trends Microbiol.* 8, 534–535.
- Jacob-Dubuisson, F., Villeret, V., Clantin, B., Delattre, A.S., Saint, N., 2009. First structural insights into the TpsB/Omp85 superfamily. *Biol. Chem.* 390, 675–684.
- Jain, S., Goldberg, M.B., 2007. Requirement for YaeT in the outer membrane assembly of autotransporter proteins. *J. Bacteriol.* 189, 5393–5398.
- Julio, S.M., Cotter, P.A., 2005. Characterization of the filamentous hemagglutinin-like protein FhaS in *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.* 73, 4960–4971.
- Julio, S.M., Inatsuka, C.S., Mazar, J., Dieterich, C., Relman, D.A., Cotter, P.A., 2009. Natural-host animal models indicate functional interchangeability between the filamentous haemagglutinins of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica* and reveal a role for the mature C-terminal domain, but not the RGD motif, during infection. *Mol. Microbiol.* 71, 1574–1590.
- Junker, M., Besingi, R.N., Clark, P.L., 2009. Vectorial transport and folding of an autotransporter virulence protein during outer membrane secretion. *Mol. Microbiol.* 71, 1323–1332.
- Junker, M., Clark, P.L., 2009. Slow formation of aggregation-resistant beta-sheet folding intermediates. *Proteins* 78, 812–824.
- Junker, M., Schuster, C.C., McDonnell, A.V., Sorg, K.A., Finn, M.C., Berger, B., Clark, P.L., 2006. Pertactin beta-helix folding mechanism suggests common themes for the secretion and folding of autotransporter proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4918–4923.
- Kajava, A.V., Cheng, N., Cleaver, R., Kessel, M., Simon, M.N., Willery, E., Jacob-Dubuisson, F., Locht, C., Steven, A.C., 2001. Beta-helix model for

- the filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins. *Mol. Microbiol.* 42, 279–292.
- Kajava, A.V., Steven, A.C., 2006. The turn of the screw: variations of the abundant beta-solenoid motif in passenger domains of Type V secretory proteins. *J. Struct. Biol.* 155, 306–315.
- Khan, S., Mian, H.S., Sandercock, L.E., Chirgadze, N.Y., Pai, E.F., 2011. Crystal structure of the passenger domain of the *Escherichia coli* auto-transporter EspP. *J. Mol. Biol.* 413, 985–1000.
- Kida, Y., Higashimoto, Y., Inoue, H., Shimizu, T., Kuwano, K., 2008. A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF-kappaB through protease-activated receptors. *Cell. Microbiol.* 10, 1491–1504.
- Kim, S., Malinverni, J.C., Sliz, P., Silhavy, T.J., Harrison, S.C., Kahne, D., 2007. Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. *Science* 317, 961–964.
- Knowles, T.J., Scott-Tucker, A., Overduin, M., Henderson, I.R., 2009. Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 206–214.
- Koenig, P., Mirus, O., Haarmann, R., Sommer, M., Sinning, I., Schleiff, E., Tews, I., 2010. Conserved properties of POTRA domains derived from cyanobacterial OMP85. *J. Biol. Chem.* 285, 18016–18024.
- Könninger, U.W., Hobbie, S., Benz, R., Braun, V., 1999. The haemolysin-secreting ShlB protein of the outer membrane of *Serratia marcescens*: determination of surface-exposed residues and formation of ion-permeable pores by ShlB mutants in artificial lipid bilayer membranes. *Mol. Microbiol.* 32, 1212–1225.
- Leo, J.C., Grin, I., Linke, D., 2012. Type V secretion: mechanisms of auto-transport through the bacterial outer membrane. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 367, 1088–1101.
- Leonard-Rivera, M., Misra, R., 2012. Conserved residues of the putative L6 loop of *Escherichia coli* BamA play a critical role in the assembly of beta-barrel outer membrane proteins, including that of BamA itself. *J. Bacteriol.* 194, 4662–4668.
- Li, H., Grass, S., Wang, T., Liu, T., St Geme 3rd, J.W., 2007. Structure of the *Haemophilus influenzae* HMWIB translocator protein: evidence for a twin pore. *J. Bacteriol.* 189, 7497–7502.
- Mazar, J., Cotter, P.A., 2006. Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol. Microbiol.* 62, 641–654.
- Méli, A.C., Hodak, H., Clantin, B., Locht, C., Molle, G., Jacob-Dubuisson, F., Saint, N., 2006. Channel properties of TpsB transporter FhaC point to two functional domains with a C-terminal protein-conducting pore. *J. Biol. Chem.* 281, 158–166.
- Moslavac, S., Mirus, O., Bredemeier, R., Soll, J., von Haeseler, A., Schleiff, E., 2005. Conserved pore-forming regions in polypeptide-transporting proteins. *FEBS J.* 272, 1367–1378.
- Nelson, K.M., Young, G.M., Miller, V.L., 2001. Identification of a locus involved in systemic dissemination of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 69, 6201–6208.
- Nesper, J., Brosig, A., Ringler, P., Patel, G.J., Müller, S.A., Kleinschmidt, J.H., Boos, W., Diederichs, K., Welte, W., 2008. Omp85 Tt from *Thermus thermophilus* HB27: an ancestral type of the Omp85 protein family. *J. Bacteriol.* 190, 4568–4575.
- Noel, C., Mazar, J., Melvin, J.A., Sexton, J., Cotter, P.A., 2012. The prodomain of the *Bordetella* two-partner secretion pathway protein FhaB remains intracellular yet affects the conformation of the mature C-terminal domain. *Mol. Microbiol.* 86, 988–1006.
- Paschen, S.A., Waizenegger, T., Stan, T., Preuss, M., Cyrklaff, M., Hell, K., Rapaport, D., Neupert, W., 2003. Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* 426, 862–866.
- Patel, R., Hsu, S.C., Bedard, J., Inoue, K., Jarvis, P., 2008. The Omp85-related chloroplast outer envelope protein OEP80 is essential for viability in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 148, 235–245.
- Peterson, J.H., Tian, P., Ieva, R., Dautin, N., Bernstein, H.D., 2010. Secretion of a bacterial virulence factor is driven by the folding of a C-terminal segment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 17739–17744.
- Poole, S.J., Diner, E.J., Aoki, S.K., Braaten, B.A., t'Kint de Roodenbeke, C., Low, D.A., Hayes, C.S., 2011. Identification of functional toxin/immunity genes linked to contact-dependent growth inhibition CDI and rearrangement hotspot Rhs systems. *PLoS Genet.* 7, e1002217.
- Pusnik, M., Schmidt, O., Perry, A.J., Oeljeklaus, S., Niemann, M., Warscheid, B., Lithgow, T., Meisinger, C., Schneider, A., 2011. Mitochondrial preprotein translocase of trypanosomatids has a bacterial origin. *Curr. Biol.* 21, 1738–1743.
- Renauld-Mongé, G., Cornette, J., Mielcarek, N., Menozzi, F.D., Locht, C., 1996. Distinct roles of the N-terminal and the C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J. Bacteriol.* 178, 1053–1060.
- Reumann, S., Davila-Aponte, J., Keegstra, K., 1999. The evolutionary origin of the protein-translocating channel of chloroplast envelope membranes: identification of a cyanobacterial homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 784–789.
- Robert, V., Volokhina, E.B., Senf, F., Bos, P.M., Van Gelder, P., Tommassen, J., 2006. Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif. *PLoS Biol.* 4, e377.
- Rojas, C.M., Ham, J.H., Deng, W.L., Doyle, J.J., Collmer, A., 2002. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana glauca* seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13142–13147.
- Roy, K., Hilliard, G.M., Hamilton, D.J., Luo, J., Ostmann, M.M., Fleckenstein, J.M., 2009. Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells. *Nature* 457, 594–598.
- Ruiz, N., Kahne, D., Silhavy, T.J., 2006. Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 57–66.
- Salacha, R., Kovacic, F., Brochier-Armanet, C., Wilhelm, S., Tommassen, J., Filloux, A., Voulhoux, R., Blevès, S., 2010. The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein PlpD is the archetype of a novel Type V secretion system. *Environ. Microbiol.* 12, 1498–1512.
- Sanchez-Pulido, L., Devos, D., Genevrois, S., Vicente, M., Valencia, A., 2003. POTRA: a conserved domain in the FtsQ family and a class of beta-barrel outer membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 523–526.
- Sauri, A., Soprova, Z., Wickstrom, D., de Gier, J.W., Van der Schors, R.C., Smit, A.B., Jong, W.S., Luirink, J., 2009. The Bam (Omp85) complex is involved in secretion of the autotransporter haemoglobin protease. *Microbiology* 155, 3982–3991.
- Schiebel, E., Schwarz, H., Braun, V., 1989. Subcellular localization and unique secretion of the hemolysin of *Serratia marcescens*. *J. Biol. Chem.* 264, 16311–16320.
- Schleiff, E., Maier, U.G., Becker, T., 2011. Omp85 in eukaryotic systems: one protein family with distinct functions. *Biol. Chem.* 392, 21–27.
- Schleiff, E., Soll, J., 2005. Membrane protein insertion: mixing eukaryotic and prokaryotic concepts. *EMBO Rep.* 6, 1023–1027.
- Schleiff, E., Soll, J., Kuchler, M., Kuhlbrandt, W., Harrer, R., 2003. Characterization of the translocon of the outer envelope of chloroplasts. *J. Cell. Biol.* 160, 541–551.
- Schonherr, R., Tsolis, R., Focareta, T., Braun, V., 1993. Amino acid replacements in the *Serratia marcescens* haemolysin ShIA define sites involved in activation and secretion. *Mol. Microbiol.* 9, 1229–1237.
- Selkrig, J., Mosbahi, K., Webb, C.T., Belousoff, M.J., Perry, A.J., Wells, T.J., Morris, F., Leyton, D.L., Totsika, M., Phan, M.D., Celik, N., Kelly, M., Oates, C., Hartland, E.L., Robins-Browne, R.M., Ramarathnam, S.H., Purcell, A.W., Schembri, M.A., Strugnelli, R.A., Henderson, I.R., Walker, D., Lithgow, T., 2012. Discovery of an archetypal protein transport system in bacterial outer membranes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 506–510. S501.
- Serra, D.O., Conover, M.S., Arnal, L., Sloan, G.P., Rodríguez, M.E., Yantorno, O.M., Deora, R., 2012. FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS ONE* 6, e28811.
- Sommer, M.S., Daum, B., Gross, L.E., Weis, B.L., Mirus, O., Abram, L., Maier, U.G., Kuhlbrandt, W., Schleiff, E., 2011. Chloroplast Omp85 proteins change orientation during evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13841–13846.

- St Geme 3rd, J.W., Grass, S., 1998. Secretion of the *Haemophilus influenzae* HMW1 and HMW2 adhesins involves a periplasmic intermediate and requires the HMWB and HMWC proteins. *Mol. Microbiol.* 27, 617–630.
- St Geme 3rd, J.W., Yeo, H.J., 2009. A prototype two-partner secretion pathway: the *Haemophilus influenzae* HMW1 and HMW2 adhesin systems. *Trends Microbiol.* 17, 355–360.
- Surana, N.K., Grass, S., Hardy, G.G., Li, H., Thanassi, D.G., St Geme 3rd, J.W., 2004. Evidence for conservation of architecture and physical properties of Omp85-like proteins throughout evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 14497–14502.
- Tala, A., Progidia, C., De Stefano, M., Cogli, L., Spinosa, M.R., Bucci, C., Alifano, P., 2008. The HrpB-HrpA two-partner secretion system is essential for intracellular survival of *Neisseria meningitidis*. *Cell. Microbiol.* 10, 2461–2482.
- Vakevainen, M., Greenberg, S., Hansen, E.J., 2003. Inhibition of phagocytosis by *Haemophilus ducreyi* requires expression of the LspA1 and LspA2 proteins. *Infect. Immun.* 71, 5994–6003.
- van Ulsen, P., Rutten, L., Feller, M., Tommassen, J., van der Ende, A., 2008. Two-partner secretion systems of *Neisseria meningitidis* associated with invasive clonal complexes. *Infect. Immun.* 76, 4649–4658.
- van Ulsen, P., Tommassen, J., 2006. Protein secretion and secreted proteins in pathogenic Neisseriaceae. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 292–319.
- Voulhoux, R., Bos, M.P., Geursten, J., Mols, M., Tommassen, J., 2003. Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane assembly. *Science* 299, 262–265.
- Walker, G., Hertle, R., Braun, V., 2004. Activation of *Serratia marcescens* hemolysin through a conformational change. *Infect. Immun.* 72, 611–614.
- Ward, C.K., Lumbley, S.R., Latimer, J.L., Cope, L.D., Hansen, E.J., 1998. *Haemophilus ducreyi* secretes a filamentous hemagglutinin-like protein. *J. Bacteriol.* 180, 6013–6022.
- Ward, C.K., Mock, J.R., Hansen, E.J., 2004. The LspB protein is involved in the secretion of the LspA1 and LspA2 proteins by *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* 72, 1874–1884.
- Weaver, T.M., Hocking, J.M., Bailey, L.J., Wawrzyn, G.T., Howard, D.R., Sikkink, L.A., Ramirez-Alvarado, M., Thompson, J.R., 2009. Structural and functional studies of truncated hemolysin a from *Proteus mirabilis*. *J. Biol. Chem.* 284, 22297–22309.
- Yeo, H.J., Yokoyama, T., Walkiewicz, K., Kim, Y., Grass, S., St Geme 3rd, J.W., 2007. The structure of the *Haemophilus influenzae* HMW1 pro-piece reveals a structural domain essential for bacterial two-partner secretion. *J. Biol. Chem.* 282, 31076–31084.
- Zarsky, V., Tachezy, J., Dolezal, P., 2012. Tom40 is likely common to all mitochondria. *Curr. Biol.* 22, R479–R481. author reply R481–472.

*Références
bibliographiques*

- Alvarez-Martinez, C.E., and Christie, P.J. (2009) Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 775–808.
- Anderson, P., Peter, G., Johnston, R.B., Jr, Wetterlow, L.H., and Smith, D.H. (1972) Immunization of humans with polyribophosphate, the capsular antigen of Hemophilus influenzae, type b. *J Clin Invest* **51**: 39–44.
- Arcoleo, J.P., and Greer, J. (1982) Hemoglobin binding site and its relationship to the serine protease-like active site of haptoglobin. *J Biol Chem* **257**: 10063–10068.
- Arnold, T., Zeth, K., and Linke, D. (2010) Omp85 from the thermophilic cyanobacterium Thermosynechococcus elongatus differs from proteobacterial Omp85 in structure and domain composition. *J Biol Chem* **285**: 18003–18015.
- Avadhanula, V., Rodriguez, C.A., Ulett, G.C., Bakaletz, L.O., and Adderson, E.E. (2006) Nontypeable Haemophilus influenzae adheres to intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on respiratory epithelial cells and upregulates ICAM-1 expression. *Infect Immun* **74**: 830–838.
- Barenkamp, S.J., and Leininger, E. (1992) Cloning, expression, and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable Haemophilus influenzae high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of Bordetella pertussis. *Infect Immun* **60**: 1302–1313.
- Barenkamp, S.J., and St Geme, J.W., 3rd (1996) Identification of a second family of high-molecular-weight adhesion proteins expressed by non-typable Haemophilus influenzae. *Mol Microbiol* **19**: 1215–1223.
- Barnard, T.J., Dautin, N., Lukacik, P., Bernstein, H.D., and Buchanan, S.K. (2007) Autotransporter structure reveals intra-barrel cleavage followed by conformational changes. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 1214–1220.
- Baud, C., Hodak, H., Willery, E., Drobecq, H., Loch, C., Jamin, M., and Jacob-Dubuisson, F. (2009) Role of DegP for two-partner secretion in Bordetella. *Mol Microbiol* **74**: 315–329.
- Baumann, U., Wu, S., Flaherty, K.M., and McKay, D.B. (1993) Three-dimensional structure of the alkaline protease of Pseudomonas aeruginosa: a two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif. *EMBO J* **12**: 3357–3364.
- Bayrhuber, M., Meins, T., Habeck, M., Becker, S., Giller, K., Villinger, S., et al. (2008) Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 15370–15375.
- Behrens, S., Maier, R., Cock, H. de, Schmid, F.X., and Gross, C.A. (2001) The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity. *EMBO J* **20**: 285–294.
- Berg, B. van den (2010) Crystal structure of a full-length autotransporter. *J Mol Biol* **396**: 627–633.
- Berks, B.C., Palmer, T., and Sargent, F. (2005) Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr Opin Microbiol* **8**: 174–181.
- Bingle, L.E., Bailey, C.M., and Pallen, M.J. (2008) Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr Opin Microbiol* **11**: 3–8.
- Bitto, E., and McKay, D.B. (2004) Binding of phage-display-selected peptides to the periplasmic chaperone protein SurA mimics binding of unfolded outer membrane proteins. *FEBS Lett* **568**: 94–98.

- Boer, H.A. de, Comstock, L.J., and Vasser, M. (1983) The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 21–25.
- Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y., and Attree, I. (2009) Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics* **10**: 104.
- Braun, V., Hobbie, S., and Ondraczek, R. (1992) *Serratia marcescens* forms a new type of cytolysin. *FEMS Microbiol Lett* **79**: 299–305.
- Buscher, A.Z., Grass, S., Heuser, J., Roth, R., and St Geme, J.W., 3rd (2006) Surface anchoring of a bacterial adhesin secreted by the two-partner secretion pathway. *Mol Microbiol* **61**: 470–483.
- Cascales, E. (2008) The type VI secretion toolkit. *EMBO Rep* **9**: 735–741.
- Cascales, E., and Cambillau, C. (2012) Structural biology of type VI secretion systems. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* **367**: 1102–1111.
- Chevalier, N., Moser, M., Koch, H.-G., Schimz, K.-L., Willery, E., Loch, C., *et al.* (2004) Membrane targeting of a bacterial virulence factor harbouring an extended signal peptide. *J Mol Microbiol Biotechnol* **8**: 7–18.
- Clantin, B., Delattre, A.-S., Rucktooa, P., Saint, N., Méli, A.C., Loch, C., *et al.* (2007) Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily. *Science* **317**: 957–961.
- Clantin, B., Hodak, H., Willery, E., Loch, C., Jacob-Dubuisson, F., and Villeret, V. (2004) The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 6194–6199.
- Cope, L.D., Love, R.P., Guinn, S.E., Gilep, A., Usanov, S., Estabrook, R.W., *et al.* (2001) Involvement of HxuC outer membrane protein in utilization of hemoglobin by *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **69**: 2353–2363.
- Cope, L.D., Thomas, S.E., Hrkal, Z., and Hansen, E.J. (1998) Binding of heme-hemopexin complexes by soluble HxuA protein allows utilization of this complexed heme by *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **66**: 4511–4516.
- Cope, L.D., Thomas, S.E., Latimer, J.L., Slaughter, C.A., Müller-Eberhard, U., and Hansen, E.J. (1994) The 100 kDa haem:haemopexin-binding protein of *Haemophilus influenzae*: structure and localization. *Mol Microbiol* **13**: 863–873.
- Cope, L.D., Yogev, R., Muller-Eberhard, U., and Hansen, E.J. (1995) A gene cluster involved in the utilization of both free heme and heme:hemopexin by *Haemophilus influenzae* type b. *J Bacteriol* **177**: 2644–2653.
- Cornelis, G.R., and Wolf-Watz, H. (1997) The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **23**: 861–867.
- Crowther, L.J., Anantha, R.P., and Donnenberg, M.S. (2004) The inner membrane subassembly of the enteropathogenic *Escherichia coli* bundle-forming pilus machine. *Mol Microbiol* **52**: 67–79.
-

- Daniel, A., Singh, A., Crowther, L.J., Fernandes, P.J., Schreiber, W., and Donnenberg, M.S. (2006) Interaction and localization studies of enteropathogenic *Escherichia coli* type IV bundle-forming pilus outer membrane components. *Microbiology (Reading, Engl)* **152**: 2405–2420.
- De, S., and Olson, R. (2011) Crystal structure of the *Vibrio cholerae* cytolysin heptamer reveals common features among disparate pore-forming toxins. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 7385–7390.
- Dekker, N., Tommassen, J., Lustig, A., Rosenbusch, J.P., and Verheij, H.M. (1997) Dimerization regulates the enzymatic activity of *Escherichia coli* outer membrane phospholipase A. *J Biol Chem* **272**: 3179–3184.
- Delattre, A.-S., Clantin, B., Saint, N., Loch, C., Villeret, V., and Jacob-Dubuisson, F. (2010) Functional importance of a conserved sequence motif in FhaC, a prototypic member of the TpsB/Omp85 superfamily. *FEBS J* **277**: 4755–4765.
- Delattre, A.-S., Saint, N., Clantin, B., Willery, E., Lippens, G., Loch, C., *et al.* (2011) Substrate recognition by the POTRA domains of TpsB transporter FhaC. *Mol Microbiol* **81**: 99–112.
- Delepelaire, P. (2004) Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 149–161.
- Dinh, T., Paulsen, I.T., and Saier, M.H., Jr (1994) A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **176**: 3825–3831.
- Driessen, A.J. (2001) SecB, a molecular chaperone with two faces. *Trends Microbiol* **9**: 193–196.
- Dutzler, R., Schirmer, T., Karplus, M., and Fischer, S. (2002) Translocation mechanism of long sugar chains across the maltoporin membrane channel. *Structure* **10**: 1273–1284.
- Dwyer, R.S., Ricci, D.P., Colwell, L.J., Silhavy, T.J., and Wingreen, N.S. (2013) Predicting Functionally Informative Mutations in *Escherichia coli* BamA Using Evolutionary Covariance Analysis. *Genetics* .
- Ehrmann, D.M. (2007) *The Periplasm*. ASM Press, .
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 486–501.
- Fairman, J.W., Dautin, N., Wojtowicz, D., Liu, W., Noinaj, N., Barnard, T.J., *et al.* (2012) Crystal structures of the outer membrane domain of intimin and invasins from enterohemorrhagic *E. coli* and enteropathogenic *Y. pseudotuberculosis*. *Structure* **20**: 1233–1243.
- Faller, M., Niederweis, M., and Schulz, G.E. (2004) The structure of a mycobacterial outer-membrane channel. *Science* **303**: 1189–1192.
- Fink, D.L., Buscher, A.Z., Green, B., Fernsten, P., and St Geme, J.W., 3rd (2003) The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter mediates microcolony formation and adherence to epithelial cells and extracellular matrix via binding regions in the C-terminal end of the passenger domain. *Cell Microbiol* **5**: 175–186.
- Forst, D., Welte, W., Wacker, T., and Diederichs, K. (1998) Structure of the sucrose-specific porin ScrY from *Salmonella typhimurium* and its complex with sucrose. *Nat Struct Biol* **5**: 37–46.

- Fournier, C., Smith, A., and Delepelaire, P. (2011) Haem release from haemopexin by HxuA allows *Haemophilus influenzae* to escape host nutritional immunity. *Mol Microbiol* **80**: 133–148.
- Galdiero, S., Galdiero, M., and Pedone, C. (2007) beta-Barrel membrane bacterial proteins: structure, function, assembly and interaction with lipids. *Curr Protein Pept Sci* **8**: 63–82.
- Gatzeva-Topalova, P.Z., Walton, T.A., and Sousa, M.C. (2008) Crystal structure of YaeT: conformational flexibility and substrate recognition. *Structure* **16**: 1873–1881.
- Genevrois, S., Steeghs, L., Roholl, P., Letesson, J.-J., and Ley, P. van der (2003) The Omp85 protein of *Neisseria meningitidis* is required for lipid export to the outer membrane. *EMBO J* **22**: 1780–1789.
- Gentle, I., Gabriel, K., Beech, P., Waller, R., and Lithgow, T. (2004) The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *J Cell Biol* **164**: 19–24.
- Gilsdorf, J.R., Tucci, M., and Marrs, C.F. (1996) Role of pili in *Haemophilus influenzae* adherence to, and internalization by, respiratory cells. *Pediatr Res* **39**: 343–348.
- Grass, S., Buscher, A.Z., Swords, W.E., Apicella, M.A., Barenkamp, S.J., Ozchlewski, N., and St Geme, J.W., 3rd (2003) The *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin is glycosylated in a process that requires HMW1C and phosphoglucomutase, an enzyme involved in lipooligosaccharide biosynthesis. *Mol Microbiol* **48**: 737–751.
- Grass, S., and St Geme, J.W., 3rd (2000) Maturation and secretion of the non-typable *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin: roles of the N-terminal and C-terminal domains. *Mol Microbiol* **36**: 55–67.
- Grijpstra, J., Arenas, J., Rutten, L., and Tommassen, J. (2013) Autotransporter secretion: varying on a theme. *Res Microbiol* .
- Grosskinsky, U., Schütz, M., Fritz, M., Schmid, Y., Lamparter, M.C., Szczesny, P., *et al.* (2007) A conserved glycine residue of trimeric autotransporter domains plays a key role in *Yersinia* adhesin A autotransport. *J Bacteriol* **189**: 9011–9019.
- Gruss, F., Zähringer, F., Jakob, R.P., Burmann, B.M., Hiller, S., and Maier, T. (2013) The structural basis of autotransporter translocation by TamA. *Nat Struct Mol Biol* .
- Guédin, S., Willery, E., Locht, C., and Jacob-Dubuisson, F. (1998) Evidence that a globular conformation is not compatible with FhaC-mediated secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol* **29**: 763–774.
- Guédin, S., Willery, E., Tommassen, J., Fort, E., Drobecq, H., Locht, C., and Jacob-Dubuisson, F. (2000) Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Biol Chem* **275**: 30202–30210.
- Haarmann, R., Ibrahim, M., Stevanovic, M., Bredemeier, R., and Schleiff, E. (2010) The properties of the outer membrane localized Lipid A transporter LptD. *J Phys Condens Matter* **22**: 454124.
- Habib, S.J., Waizenegger, T., Niewienda, A., Paschen, S.A., Neupert, W., and Rapaport, D. (2007) The N-terminal domain of Tob55 has a receptor-like function in the biogenesis of mitochondrial beta-barrel proteins. *J Cell Biol* **176**: 77–88.
- Hagan, C.L., Westwood, D.B., and Kahne, D. (2013) Bam Lipoproteins Assemble BamA in Vitro. *Biochemistry* .

- Hanson, M.S., Pelzel, S.E., Latimer, J., Muller-Eberhard, U., and Hansen, E.J. (1992) Identification of a genetic locus of *Haemophilus influenzae* type b necessary for the binding and utilization of heme bound to human hemopexin. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 1973–1977.
- Harrison, S.C. (1996) Peptide-surface association: the case of PDZ and PTB domains. *Cell* **86**: 341–343.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., and Ala'Aldeen, D. (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 692–744.
- Hertle, R. (2000) Serratia type pore forming toxins. *Curr Protein Pept Sci* **1**: 75–89.
- Hiller, S., Garces, R.G., Malia, T.J., Orekhov, V.Y., Colombini, M., and Wagner, G. (2008) Solution structure of the integral human membrane protein VDAC-1 in detergent micelles. *Science* **321**: 1206–1210.
- Hinnah, S.C., Hill, K., Wagner, R., Schlicher, T., and Soll, J. (1997) Reconstitution of a chloroplast protein import channel. *EMBO J* **16**: 7351–7360.
- Hodak, H., Clantin, B., Willery, E., Villeret, V., Locht, C., and Jacob-Dubuisson, F. (2006) Secretion signal of the filamentous haemagglutinin, a model two-partner secretion substrate. *Mol Microbiol* **61**: 368–382.
- Hodak, H., and Jacob-Dubuisson, F. (2007) Current challenges in autotransport and two-partner protein secretion pathways. *Res Microbiol* **158**: 631–637.
- Hoiczky, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A., and Heesemann, J. (2000) Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J* **19**: 5989–5999.
- Hood, R.D., Singh, P., Hsu, F., Güvener, T., Carl, M.A., Trinidad, R.R.S., *et al.* (2010) A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe* **7**: 25–37.
- Hoppins, S.C., Go, N.E., Klein, A., Schmitt, S., Neupert, W., Rapaport, D., and Nargang, F.E. (2007) Alternative splicing gives rise to different isoforms of the *Neurospora crassa* Tob55 protein that vary in their ability to insert beta-barrel proteins into the outer mitochondrial membrane. *Genetics* **177**: 137–149.
- Hrkal, Z., Vodrázka, Z., and Kalousek, I. (1974) Transfer of heme from ferrihemoglobin and ferrihemoglobin isolated chains to hemopexin. *Eur J Biochem* **43**: 73–78.
- Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **14**: 33–38, 27–28.
- Ieva, R., and Bernstein, H.D. (2009) Interaction of an autotransporter passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 19120–19125.
- Ieva, R., Skillman, K.M., and Bernstein, H.D. (2008) Incorporation of a polypeptide segment into the beta-domain pore during the assembly of a bacterial autotransporter. *Mol Microbiol* **67**: 188–201.
- Ieva, R., Tian, P., Peterson, J.H., and Bernstein, H.D. (2011) Sequential and spatially restricted interactions of assembly factors with an autotransporter beta domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: E383–391.

Iwanczyk, J., Damjanovic, D., Kooistra, J., Leong, V., Jomaa, A., Ghirlando, R., and Ortega, J. (2007) Role of the PDZ domains in Escherichia coli DegP protein. *J Bacteriol* **189**: 3176–3186.

Jacob-Dubuisson, F., Buisine, C., Willery, E., Renauld-Mongénie, G., and Locht, C. (1997) Lack of functional complementation between Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin and Proteus mirabilis HpmA hemolysin secretion machineries. *J Bacteriol* **179**: 775–783.

Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R., and Coutte, L. (2004) Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 235–257.

Jacob-Dubuisson, F., Guérin, J., Baelen, S., and Clantin, B. (2013) Two-partner secretion: as simple as it sounds? *Res Microbiol* **164**: 583–595.

Jacob-Dubuisson, F., Locht, C., and Antoine, R. (2001) Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol Microbiol* **40**: 306–313.

Jacob-Dubuisson, F., Villeret, V., Clantin, B., Delattre, A.-S., and Saint, N. (2009) First structural insights into the TpsB/Omp85 superfamily. *Biol Chem* **390**: 675–684.

Jain, S., and Goldberg, M.B. (2007) Requirement for YaeT in the outer membrane assembly of autotransporter proteins. *J Bacteriol* **189**: 5393–5398.

Jani, A.J., and Cotter, P.A. (2010) Type VI secretion: not just for pathogenesis anymore. *Cell Host Microbe* **8**: 2–6.

Jenkins, J., and Pickersgill, R. (2001) The architecture of parallel beta-helices and related folds. *Prog Biophys Mol Biol* **77**: 111–175.

Jiang, J., Zhang, X., Chen, Y., Wu, Y., Zhou, Z.H., Chang, Z., and Sui, S.-F. (2008) Activation of DegP chaperone-protease via formation of large cage-like oligomers upon binding to substrate proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 11939–11944.

Julio, S.M., and Cotter, P.A. (2005) Characterization of the filamentous hemagglutinin-like protein FhaS in Bordetella bronchiseptica. *Infect Immun* **73**: 4960–4971.

Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 125–132.

Kajava, A.V., Cheng, N., Cleaver, R., Kessel, M., Simon, M.N., Willery, E., *et al.* (2001) Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of Bordetella pertussis and related bacterial secretory proteins. *Mol Microbiol* **42**: 279–292.

Kajava, A.V., and Steven, A.C. (2006) Beta-rolls, beta-helices, and other beta-solenoid proteins. *Adv Protein Chem* **73**: 55–96.

Kim, S., Malinverni, J.C., Sliz, P., Silhavy, T.J., Harrison, S.C., and Kahne, D. (2007) Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. *Science* **317**: 961–964.

Klein, A., Israel, L., Lackey, S.W.K., Nargang, F.E., Imhof, A., Baumeister, W., *et al.* (2012) Characterization of the insertase for β -barrel proteins of the outer mitochondrial membrane. *J Cell Biol* **199**: 599–611.

Knowles, T.J., Jeeves, M., Bobat, S., Dancea, F., McClelland, D., Palmer, T., *et al.* (2008) Fold and function of polypeptide transport-associated domains responsible for delivering unfolded proteins to membranes. *Mol Microbiol* **68**: 1216–1227.

Knowles, T.J., Scott-Tucker, A., Overduin, M., and Henderson, I.R. (2009) Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. *Nat Rev Microbiol* **7**: 206–214.

Koebnik, R., Locher, K.P., and Gelder, P. Van (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* **37**: 239–253.

Koenig, P., Mirus, O., Haarmann, R., Sommer, M.S., Sinning, I., Schleiff, E., and Tews, I. (2010) Conserved properties of polypeptide transport-associated (POTRA) domains derived from cyanobacterial Omp85. *J Biol Chem* **285**: 18016–18024.

Könninger, U.W., Hobbie, S., Benz, R., and Braun, V. (1999) The haemolysin-secreting ShIB protein of the outer membrane of *Serratia marcescens*: determination of surface-exposed residues and formation of ion-permeable pores by ShIB mutants in artificial lipid bilayer membranes. *Mol Microbiol* **32**: 1212–1225.

Koskelo, P., and Muller-Eberhard, U. (1977) Interaction of porphyrins with proteins. *Semin Hematol* **14**: 221–226.

Kozjak, V., Wiedemann, N., Milenkovic, D., Lohaus, C., Meyer, H.E., Guiard, B., *et al.* (2003) An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* **278**: 48520–48523.

Krojer, T., Sawa, J., Huber, R., and Clausen, T. (2010) HtrA proteases have a conserved activation mechanism that can be triggered by distinct molecular cues. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 844–852.

Krojer, T., Sawa, J., Schäfer, E., Saibil, H.R., Ehrmann, M., and Clausen, T. (2008) Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature* **453**: 885–890.

Lackey, S.W.K., Wideman, J.G., Kennedy, E.K., Go, N.E., and Nargang, F.E. (2011) The *Neurospora crassa* TOB complex: analysis of the topology and function of Tob38 and Tob37. *PLoS ONE* **6**: e25650.

Langer, G., Cohen, S.X., Lamzin, V.S., and Perrakis, A. (2008) Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nat Protoc* **3**: 1171–1179.

Lazar, S.W., and Kolter, R. (1996) SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *J Bacteriol* **178**: 1770–1773.

Lee, P.A., Tullman-Ercek, D., and Georgiou, G. (2006) The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu Rev Microbiol* **60**: 373–395.

Lehr, U., Schütz, M., Oberhettinger, P., Ruiz-Perez, F., Donald, J.W., Palmer, T., *et al.* (2010) C-terminal amino acid residues of the trimeric autotransporter adhesin YadA of *Yersinia enterocolitica* are decisive for its recognition and assembly by BamA. *Mol Microbiol* **78**: 932–946.

Leo, J.C., Grin, I., and Linke, D. (2012) Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* **367**: 1088–1101.

- Leonard-Rivera, M., and Misra, R. (2012) Conserved residues of the putative L6 loop of Escherichia coli BamA play a critical role in the assembly of β -barrel outer membrane proteins, including that of BamA itself. *J Bacteriol* **194**: 4662–4668.
- Li, H., Grass, S., Wang, T., Liu, T., and Geme, J.W.S. (2007) Structure of the Haemophilus influenzae HMW1B Translocator Protein: Evidence for a Twin Pore. *J Bacteriol* **189**: 7497–7502.
- Lilly, A.A., Crane, J.M., and Randall, L.L. (2009) Export chaperone SecB uses one surface of interaction for diverse unfolded polypeptide ligands. *Protein Sci* **18**: 1860–1868.
- Linke, D., Riess, T., Autenrieth, I.B., Lupas, A., and Kempf, V.A.J. (2006) Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends Microbiol* **14**: 264–270.
- Liu, H., Magoun, L., Luperchio, S., Schauer, D.B., and Leong, J.M. (1999) The Tir-binding region of enterohaemorrhagic Escherichia coli intimin is sufficient to trigger actin condensation after bacterial-induced host cell signalling. *Mol Microbiol* **34**: 67–81.
- Locht, C., Bertin, P., Menozzi, F.D., and Renauld, G. (1993) The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent Bordetella spp. *Mol Microbiol* **9**: 653–660.
- Lybarger, S.R., Johnson, T.L., Gray, M.D., Sikora, A.E., and Sandkvist, M. (2009) Docking and assembly of the type II secretion complex of Vibrio cholerae. *J Bacteriol* **191**: 3149–3161.
- MacIntyre, D.L., Miyata, S.T., Kitaoka, M., and Pukatzki, S. (2010) The Vibrio cholerae type VI secretion system displays antimicrobial properties. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 19520–19524.
- Makhov, A.M., Hannah, J.H., Brennan, M.J., Trus, B.L., Kocsis, E., Conway, J.F., *et al.* (1994) Filamentous hemagglutinin of Bordetella pertussis. A bacterial adhesin formed as a 50-nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in beta strands and turns. *J Mol Biol* **241**: 110–124.
- Malinverni, J.C., Werner, J., Kim, S., Sklar, J.G., Kahne, D., Misra, R., and Silhavy, T.J. (2006) YfiO stabilizes the YaeT complex and is essential for outer membrane protein assembly in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **61**: 151–164.
- Mazar, J., and Cotter, P.A. (2006) Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol Microbiol* **62**: 641–654.
- Mazar, J., and Cotter, P.A. (2007) New insight into the molecular mechanisms of two-partner secretion. *Trends Microbiol* **15**: 508–515.
- Méli, A.C., Hodak, H., Clantin, B., Locht, C., Molle, G., Jacob-Dubuisson, F., and Saint, N. (2006) Channel properties of TpsB transporter FhaC point to two functional domains with a C-terminal protein-conducting pore. *J Biol Chem* **281**: 158–166.
- Meltzer, M., Hasenbein, S., Hauske, P., Kucz, N., Merdanovic, M., Grau, S., *et al.* (2008) Allosteric activation of HtrA protease DegP by stress signals during bacterial protein quality control. *Angew Chem Int Ed Engl* **47**: 1332–1334.
- Meng, G., Surana, N.K., St Geme, J.W., 3rd, and Waksman, G. (2006) Structure of the outer membrane translocator domain of the Haemophilus influenzae Hia trimeric autotransporter. *EMBO J* **25**: 2297–2304.

- Merdanovic, M., Mamant, N., Meltzer, M., Poepsel, S., Auckenthaler, A., Melgaard, R., *et al.* (2010) Determinants of structural and functional plasticity of a widely conserved protease chaperone complex. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 837–843.
- Moslavac, S., Mirus, O., Bredemeier, R., Soll, J., Haeseler, A. von, and Schleiff, E. (2005) Conserved pore-forming regions in polypeptide-transporting proteins. *FEBS J* **272**: 1367–1378.
- Muller-Eberhard, U., and Nikkilä, H. (1989) Transport of tetrapyrroles by proteins. *Semin Hematol* **26**: 86–104.
- Murdoch, S.L., Trunk, K., English, G., Fritsch, M.J., Pourkarimi, E., and Coulthurst, S.J. (2011) The opportunistic pathogen *Serratia marcescens* utilizes type VI secretion to target bacterial competitors. *J Bacteriol* **193**: 6057–6069.
- Murphy, T.F., Brauer, A.L., Schiffmacher, A.T., and Sethi, S. (2004) Persistent colonization by *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **170**: 266–272.
- Murphy, T.F., and Sethi, S. (1992) Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* **146**: 1067–1083.
- Murshudov, G.N., Skubák, P., Lebedev, A.A., Pannu, N.S., Steiner, R.A., Nicholls, R.A., *et al.* (2011) REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**: 355–367.
- Natale, P., Brüser, T., and Driessen, A.J.M. (2008) Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 1735–1756.
- Nikaido, H. (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 593–656.
- Noinaj, N., Kuszak, A.J., Gumbart, J.C., Lukacik, P., Chang, H., Easley, N.C., *et al.* (2013) Structural insight into the biogenesis of β -barrel membrane proteins. *Nature* **501**: 385–390.
- Oomen, C.J., Ulsen, P. van, Gelder, P. van, Feijen, M., Tommassen, J., and Gros, P. (2004) Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *EMBO J* **23**: 1257–1266.
- Pagès, J.-M., James, C.E., and Winterhalter, M. (2008) The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **6**: 893–903.
- Panek, H., and O'Brian, M.R. (2002) A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology (Reading, Engl)* **148**: 2273–2282.
- Paschen, S.A., Waizenegger, T., Stan, T., Preuss, M., Cyrklaff, M., Hell, K., *et al.* (2003) Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* **426**: 862–866.
- Peabody, C.R., Chung, Y.J., Yen, M.-R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A.P., and Saier, M.H., Jr (2003) Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology (Reading, Engl)* **149**: 3051–3072.
- Petersen, T.N., Kauppinen, S., and Larsen, S. (1997) The crystal structure of rhamnogalacturonase A from *Aspergillus aculeatus*: a right-handed parallel beta helix. *Structure* **5**: 533–544.

- Peterson, J.H., Tian, P., Ieva, R., Dautin, N., and Bernstein, H.D. (2010) Secretion of a bacterial virulence factor is driven by the folding of a C-terminal segment. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 17739–17744.
- Pidcock, K.A., Wooten, J.A., Daley, B.A., and Stull, T.L. (1988) Iron acquisition by *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **56**: 721–725.
- Pittman, M. (1931) VARIATION AND TYPE SPECIFICITY IN THE BACTERIAL SPECIES HEMOPHILUS INFLUENZAE. *J Exp Med* **53**: 471–492.
- Plessis, D.J.F. du, Nouwen, N., and Driessen, A.J.M. (2011) The Sec translocase. *Biochim Biophys Acta* **1808**: 851–865.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K., and Meyer, T.F. (1987) Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **325**: 458–462.
- Prilipov, A., Phale, P.S., Gelder, P. Van, Rosenbusch, J.P., and Koebnik, R. (1998) Coupling site-directed mutagenesis with high-level expression: large scale production of mutant porins from *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett* **163**: 65–72.
- Pugsley, A.P. (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 50–108.
- Rêgo, A.T., Chandran, V., and Waksman, G. (2010) Two-step and one-step secretion mechanisms in Gram-negative bacteria: contrasting the type IV secretion system and the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Biochem J* **425**: 475–488.
- Remaut, H., Tang, C., Henderson, N.S., Pinkner, J.S., Wang, T., Hultgren, S.J., *et al.* (2008) Fiber formation across the bacterial outer membrane by the chaperone/usher pathway. *Cell* **133**: 640–652.
- Robert, V., Filloux, A., and Michel, G.P.F. (2005) Subcomplexes from the Xcp secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **252**: 43–50.
- Rodrigues, L.P., Schneerson, R., and Robbins, J.B. (1971) Immunity to *Haemophilus influenzae* type b. I. The isolation, and some physicochemical, serologic and biologic properties of the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J Immunol* **107**: 1071–1080.
- Rosqvist, R., Forsberg, A., and Wolf-Watz, H. (1991) Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect Immun* **59**: 4562–4569.
- Rosqvist, R., Håkansson, S., Forsberg, A., and Wolf-Watz, H. (1995) Functional conservation of the secretion and translocation machinery for virulence proteins of *Yersinia*, *Salmonella* and *Shigella*. *EMBO J* **14**: 4187–4195.
- Rositter, A.E., Leyton, D.L., Tveen-Jensen, K., Browning, D.F., Sevastyanovich, Y., Knowles, T.J., *et al.* (2011) The essential β -barrel assembly machinery complex components BamD and BamA are required for autotransporter biogenesis. *J Bacteriol* **193**: 4250–4253.
- Rouvière, P.E., and Gross, C.A. (1996) SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev* **10**: 3170–3182.
- Ruiz, N., Falcone, B., Kahne, D., and Silhavy, T.J. (2005) Chemical conditionality: a genetic strategy to probe organelle assembly. *Cell* **121**: 307–317.

- Ruiz-Perez, F., Henderson, I.R., Leyton, D.L., Rossiter, A.E., Zhang, Y., and Nataro, J.P. (2009) Roles of periplasmic chaperone proteins in the biogenesis of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae. *J Bacteriol* **191**: 6571–6583.
- Russel, M. (1998) Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems. *J Mol Biol* **279**: 485–499.
- Russell, A.B., Hood, R.D., Bui, N.K., LeRoux, M., Vollmer, W., and Mougous, J.D. (2011) Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature* **475**: 343–347.
- Salacha, R., Kovacic, F., Brochier-Armanet, C., Wilhelm, S., Tommassen, J., Filloux, A., *et al.* (2010) The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein PlpD is the archetype of a novel Type V secretion system. *Environ Microbiol* **12**: 1498–1512.
- Sánchez-Pulido, L., Devos, D., Genevrois, S., Vicente, M., and Valencia, A. (2003) POTRA: a conserved domain in the FtsQ family and a class of beta-barrel outer membrane proteins. *Trends Biochem Sci* **28**: 523–526.
- Sauri, A., Soprova, Z., Wickström, D., Gier, J.-W. de, Schors, R.C. Van der, Smit, A.B., *et al.* (2009) The Bam (Omp85) complex is involved in secretion of the autotransporter haemoglobin protease. *Microbiology (Reading, Engl)* **155**: 3982–3991.
- Saurin, W., Hofnung, M., and Dassa, E. (1999) Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol* **48**: 22–41.
- Savva, C.G., Fernandes da Costa, S.P., Bokori-Brown, M., Naylor, C.E., Cole, A.R., Moss, D.S., *et al.* (2013) Molecular architecture and functional analysis of NetB, a pore-forming toxin from *Clostridium perfringens*. *J Biol Chem* **288**: 3512–3522.
- Schäfer, U., Beck, K., and Müller, M. (1999) Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins. *J Biol Chem* **274**: 24567–24574.
- Schirmer, T., Keller, T.A., Wang, Y.F., and Rosenbusch, J.P. (1995) Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* **267**: 512–514.
- Schleiff, E., and Becker, T. (2011) Common ground for protein translocation: access control for mitochondria and chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 48–59.
- Schnell, D.J., Kessler, F., and Blobel, G. (1994) Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science* **266**: 1007–1012.
- Schulz, G.E. (2002) The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1565**: 308–317.
- Schwarz, S., Hood, R.D., and Mougous, J.D. (2010) What is type VI secretion doing in all those bugs? *Trends Microbiol* **18**: 531–537.
- Schwarz, S., West, T.E., Boyer, F., Chiang, W.-C., Carl, M.A., Hood, R.D., *et al.* (2010) Burkholderia type VI secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions. *PLoS Pathog* **6**: e1001068.

- Selkrig, J., Mosbahi, K., Webb, C.T., Belousoff, M.J., Perry, A.J., Wells, T.J., *et al.* (2012) Discovery of an archetypal protein transport system in bacterial outer membranes. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 506–510, S1.
- Sklar, J.G., Wu, T., Gronenberg, L.S., Malinverni, J.C., Kahne, D., and Silhavy, T.J. (2007) Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 6400–6405.
- Sklar, J.G., Wu, T., Kahne, D., and Silhavy, T.J. (2007) Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **21**: 2473–2484.
- Smart, O.S., Goodfellow, J.M., and Wallace, B.A. (1993) The pore dimensions of gramicidin A. *Biophys J* **65**: 2455–2460.
- Snijder, H.J., Ubarretxena-Belandia, I., Blaauw, M., Kalk, K.H., Verheij, H.M., Egmond, M.R., *et al.* (1999) Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase. *Nature* **401**: 717–721.
- Soll, J., and Schleiff, E. (2004) Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 198–208.
- Sommer, M.S., Daum, B., Gross, L.E., Weis, B.L.M., Mirus, O., Abram, L., *et al.* (2011) Chloroplast Omp85 proteins change orientation during evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 13841–13846.
- Song, L., Hobaugh, M.R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., and Gouaux, J.E. (1996) Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* **274**: 1859–1866.
- Sory, M.P., and Cornelis, G.R. (1994) Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol Microbiol* **14**: 583–594.
- Spiess, C., Beil, A., and Ehrmann, M. (1999) A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* **97**: 339–347.
- St Geme, J.W., 3rd (1993) Nontypeable *Haemophilus influenzae* disease: epidemiology, pathogenesis, and prospects for prevention. *Infect Agents Dis* **2**: 1–16.
- St Geme, J.W., 3rd (2002) Molecular and cellular determinants of non-typeable *Haemophilus influenzae* adherence and invasion. *Cell Microbiol* **4**: 191–200.
- St Geme, J.W., 3rd, Falkow, S., and Barenkamp, S.J. (1993) High-molecular-weight proteins of nontypable *Haemophilus influenzae* mediate attachment to human epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 2875–2879.
- St Geme, J.W., 3rd, Kumar, V.V., Cutter, D., and Barenkamp, S.J. (1998) Prevalence and distribution of the hmw and hia genes and the HMW and Hia adhesins among genetically diverse strains of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **66**: 364–368.
- St Geme, J.W., 3rd, and Yeo, H.-J. (2009) A prototype two-partner secretion pathway: the *Haemophilus influenzae* HMW1 and HMW2 adhesin systems. *Trends Microbiol* **17**: 355–360.
- Stojanovski, D., Guiard, B., Kozjak-Pavlovic, V., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2007) Alternative function for the mitochondrial SAM complex in biogenesis of alpha-helical TOM proteins. *J Cell Biol* **179**: 881–893.

- Stull, T.L. (1987) Protein sources of heme for *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **55**: 148–153.
- Subrini, O., and Betton, J.-M. (2009) Assemblies of DegP underlie its dual chaperone and protease function. *FEMS Microbiol Lett* **296**: 143–148.
- Surana, N.K., Grass, S., Hardy, G.G., Li, H., Thanassi, D.G., and Geme, J.W.S., 3rd (2004) Evidence for conservation of architecture and physical properties of Omp85-like proteins throughout evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 14497–14502.
- Swords, W.E., Chance, D.L., Cohn, L.A., Shao, J., Apicella, M.A., and Smith, A.L. (2002) Acylation of the lipooligosaccharide of *Haemophilus influenzae* and colonization: an *htrB* mutation diminishes the colonization of human airway epithelial cells. *Infect Immun* **70**: 4661–4668.
- Szczesny, P., and Lupas, A. (2008) Domain annotation of trimeric autotransporter adhesins--daTAA. *Bioinformatics* **24**: 1251–1256.
- Tajima, N., Kawai, F., Park, S.-Y., and Tame, J.R.H. (2010) A novel intein-like autoproteolytic mechanism in autotransporter proteins. *J Mol Biol* **402**: 645–656.
- Taylor, R.K., Hall, M.N., Enquist, L., and Silhavy, T.J. (1981) Identification of OmpR: a positive regulatory protein controlling expression of the major outer membrane matrix porin proteins of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **147**: 255–258.
- Thanassi, D.G., Stathopoulos, C., Karkal, A., and Li, H. (2005) Protein secretion in the absence of ATP: the autotransporter, two-partner secretion and chaperone/usher pathways of gram-negative bacteria (review). *Mol Membr Biol* **22**: 63–72.
- Thornton, N., Stroud, D.A., Milenkovic, D., Guiard, B., Pfanner, N., and Becker, T. (2010) Two modular forms of the mitochondrial sorting and assembly machinery are involved in biogenesis of alpha-helical outer membrane proteins. *J Mol Biol* **396**: 540–549.
- Tsai, J.C., Yen, M.-R., Castillo, R., Leyton, D.L., Henderson, I.R., and Saier, M.H., Jr (2010) The bacterial intimins and invasins: a large and novel family of secreted proteins. *PLoS ONE* **5**: e14403.
- Ujwal, R., Cascio, D., Colletier, J.-P., Faham, S., Zhang, J., Toro, L., *et al.* (2008) The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 Å resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 17742–17747.
- Uphoff, T.S., and Welch, R.A. (1990) Nucleotide sequencing of the *Proteus mirabilis* calcium-independent hemolysin genes (*hpmA* and *hpmB*) reveals sequence similarity with the *Serratia marcescens* hemolysin genes (*shIA* and *shIB*). *J Bacteriol* **172**: 1206–1216.
- Ureta, A.R., Endres, R.G., Wingreen, N.S., and Silhavy, T.J. (2007) Kinetic analysis of the assembly of the outer membrane protein LamB in *Escherichia coli* mutants each lacking a secretion or targeting factor in a different cellular compartment. *J Bacteriol* **189**: 446–454.
- Vogt, J., and Schulz, G.E. (1999) The structure of the outer membrane protein OmpX from *Escherichia coli* reveals possible mechanisms of virulence. *Structure* **7**: 1301–1309.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M.L., Lazdunski, A., Wu, L.F., and Filloux, A. (2001) Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J* **20**: 6735–6741.

- Voulhoux, R., Bos, M.P., Geurtsen, J., Mols, M., and Tommassen, J. (2003) Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* **299**: 262–265.
- Ward, C.K., Lumbley, S.R., Latimer, J.L., Cope, L.D., and Hansen, E.J. (1998) Haemophilus ducreyi secretes a filamentous hemagglutinin-like protein. *J Bacteriol* **180**: 6013–6022.
- Ward, C.K., Mock, J.R., and Hansen, E.J. (2004) The LspB protein is involved in the secretion of the LspA1 and LspA2 proteins by Haemophilus ducreyi. *Infect Immun* **72**: 1874–1884.
- Weaver, T.M., Hocking, J.M., Bailey, L.J., Wawrzyn, G.T., Howard, D.R., Sikkink, L.A., *et al.* (2009) Structural and functional studies of truncated hemolysin A from Proteus mirabilis. *J Biol Chem* **284**: 22297–22309.
- White, D.C., and Granick, S. (1963) HEMIN BIOSYNTHESIS IN HAEMOPHILUS. *J Bacteriol* **85**: 842–850.
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Chacinska, A., Schönfisch, B., Rospert, S., Ryan, M.T., *et al.* (2003) Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature* **424**: 565–571.
- Willey, J.M., Sherwood, L., and Woolverton, C.J. (2008) *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology*. McGraw-Hill Higher Education, .
- Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., *et al.* (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**: 235–242.
- Wollmann, P., Zeth, K., Lupas, A.N., and Linke, D. (2006) Purification of the YadA membrane anchor for secondary structure analysis and crystallization. *Int J Biol Macromol* **39**: 3–9.
- Wong, J.C., Holland, J., Parsons, T., Smith, A., and Williams, P. (1994) Identification and characterization of an iron-regulated hemopexin receptor in Haemophilus influenzae type b. *Infect Immun* **62**: 48–59.
- Wong, J.C., Patel, R., Kendall, D., Whitby, P.W., Smith, A., Holland, J., and Williams, P. (1995) Affinity, conservation, and surface exposure of hemopexin-binding proteins in Haemophilus influenzae. *Infect Immun* **63**: 2327–2333.
- Wu, T., Malinverni, J., Ruiz, N., Kim, S., Silhavy, T.J., and Kahne, D. (2005) Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in Escherichia coli. *Cell* **121**: 235–245.
- Yamashita, K., Kawai, Y., Tanaka, Y., Hirano, N., Kaneko, J., Tomita, N., *et al.* (2011) Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal γ -hemolysin reveals the β -barrel pore formation mechanism by two components. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 17314–17319.
- Yen, M.R., Peabody, C.R., Partovi, S.M., Zhai, Y., Tseng, Y.H., and Saier, M.H. (2002) Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1562**: 6–31.
- Yeo, H.-J., Yokoyama, T., Walkiewicz, K., Kim, Y., Grass, S., and Geme, J.W.S., 3rd (2007) The structure of the Haemophilus influenzae HMW1 pro-piece reveals a structural domain essential for bacterial two-partner secretion. *J Biol Chem* **282**: 31076–31084.
- Yoder, M.D., and Jurnak, F. (1995) Protein motifs. 3. The parallel beta helix and other coiled folds. *FASEB J* **9**: 335–342.

Yoder, M.D., Keen, N.T., and Jurnak, F. (1993) New domain motif: the structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor. *Science* **260**: 1503–1507.

Yoder, M.D., Lietzke, S.E., and Jurnak, F. (1993) Unusual structural features in the parallel beta-helix in pectate lyases. *Structure* **1**: 241–251.

Zdobnov, E.M., and Apweiler, R. (2001) InterProScan--an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* **17**: 847–848.

Zhai, Y., Zhang, K., Huo, Y., Zhu, Y., Zhou, Q., Lu, J., *et al.* (2011) Autotransporter passenger domain secretion requires a hydrophobic cavity at the extracellular entrance of the β -domain pore. *Biochem J* **435**: 577–587.

Zhang, H., Gao, Z.-Q., Hou, H.-F., Xu, J.-H., Li, L.-F., Su, X.-D., and Dong, Y.-H. (2011) High-resolution structure of a new crystal form of BamA POTRA4-5 from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **67**: 734–738.

Zverev, V.V., and Khmel, I.A. (1985) The nucleotide sequences of the replication origins of plasmids ColA and ColD. *Plasmid* **14**: 192–199.