BUU & - 202564

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

THESE

présentée par

Corinne LAMBERT

pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITE de LILLE I en Sciences de la Vie et de la Santé

Sujet de la thèse:

Analyse des signaux de sécrétion de l'hémagglutinine filamenteuse de *Bordetella pertussis*



Présentée le 30 juin 1998 devant le jury composé de:

Mr Jean-Pierre BOHIN Mme Agnès ULLMANN Mr Claude PARSOT Mme Françoise JACOB-DUBUISSON Mr Michel SIMONET Mr Camille LOCHT Président Rapporteur Rapporteur Examinateur Examinateur Directeur de thèse Je voudrais tout d'abord remercier le Dr Camille Locht qui m'a accueillie dans son laboratoire et m'a permis d'y réaliser cette thèse.

Je remercie les membres de mon jury de m'avoir fait l'honneur de lire ce travail et de le juger.

Un grand merci Françoise pour ton encadrement efficace et stimulant,

merci Eve pour ton aide précieuse,

merci à l'équipe de l'U447: ce fut un plaisir quotidien de travailler avec vous tous.

Je remercie aussi Christelle, Fabien et mes parents, pour leur soutien affectueux.

Je dédie cette thèse à mon microbiologiste préféré, avec toute ma tendresse. Merci Philip pour tes encouragements et ta patience.

TABLE DES MATIERES

Introduction générale

1. Mécanismes de sécrétion des protéines chez les bactéries à Gram négatif	p. 1
I. Sécrétion de type I	p. 2
I. 1. Structure des systèmes de sécrétion de type I	p. 2
I. 2. Organisation génétique	p. 4
I. 3. Signal de sécrétion de HlyA	p. 4
II. Sécrétion de type II	p. 5
II. 1. Exportation à travers la membrane cytoplasmique	p. 5
a) Séquence signal	p. 6
b) Chaperone cytoplasmique SecB	p. 8
c) SecA	p. 8
d) Protéines Sec membranaires	p. 9
e) Signal-peptidases	p. 9
II. 2. Sécrétion à travers la membrane externe	p. 10
a) Pullulanase	p. 10
b) Pilis de type P	p. 11
c) Autosécrétion	p. 11
III. Sécrétion de type III	p. 12
III. 1. Caractéristiques des systèmes de type III	p. 12
III. 2. La sécrétion des Yops chez les bactéries du genre Yersinia	p. 12
a) Protéines effectrices	p. 13
b) Sécrétion	p. 13
c) Chaperones Syc	p. 13
d) Régulation de l'expression et de la sécrétion des Yops	p. 13
IV. Sécrétion de type IV	p. 14
2. Bordetella pertussis et la coqueluche	p. 16
I. Le genre Bordetella	p. 16
I. 1. Morphologie	p. 16
I. 2. Métabolisme et besoins nutritionnels	p. 16
I. 3. Culture	p. 17
I. 4. Hôtes	p. 17

II. La coqueluche	p. 17
II. 1. Manifestations cliniques	p. 17
II. 2. Epidémiologie	p. 18
II. 3. Vaccination	p. 19
III. Pathogenèse de <i>B. pertussis</i>	p. 19
III. 1. Etapes de l'infection	p. 19
III. 2. Facteurs de virulence	p. 19
III. 3. 1. Adhésines	p. 20
a) Hémagglutinine filamenteuse (FHA)	p. 20
b) Fimbriae	p. 20
c) Pertactine	p. 21
d) BrkA	p. 22
e) Tcf	p. 22
III. 3. 2. Toxines	p. 23
a) Toxine pertussique	p. 23
b) Adénylate cyclase-hémolysine	p. 23
c) Cytotoxine trachéale	p. 24
d) Toxine dermonécrotique	p. 24
III. 3. Régulation de la virulence par le système BvgA/S	p. 24
3. L'hémagglutinine filamenteuse de <i>B. pertussis</i> (FHA)	p. 26
I. La FHA, une adhésine multifonctionnelle	p. 26
I. 1. Activités d'adhérence de la FHA	p. 26
a) Liaison aux sucres sulfatés	p. 26
b) Liaison au lactosylcéramide des cellules ciliées et des	
macrophages	p. 27
c) Liaison à l'intégrine CR3 des macrophages	p. 27
d) Liaison au régulateur C4BP du complément	p. 28
I. 2. Autoagglutination, piratage d'adhésine et mimétisme	p. 28
I. 3. Importance de la FHA dans la pathogénicité de B. pertussis	p. 29
a) Comportement des mutants FHA chez l'animal	p. 29
b) Intérêt vaccinal de la FHA	p. 30
II. Biogénèse et sécrétion de la FHA	p. 31
II. 1. Structure primaire du précurseur FhaB	p. 31
a) Région N-terminale	p. 31
b) Partie centrale	p. 31
c) Région C-terminale	p. 32
II. 2. Structure tertiaire de la FHA	p. 32

II. 3. Régulation de l'expression de la FHA			
II. 4. Sécrétion de la FHA		p. 33	
	a) Séquence-signal et transport à travers la membrane		
	cytoplasmique	p. 33	
	b) Sécrétion à travers la membrane externe: la protéine		
	auxiliaire FhaC et le domaine de sécrétion de la FHA	p. 34	
	c) Importance du domaine C-terminal du précurseur Fl	naBp. 35	
Objectifs du tr	avail	p. 37	
Article 1. Maturation N-terminale de la FHA de B. pertussis			
Article 2. Cara	ctérisation de la région N-terminale de l'hémagglutinine		
filamenteuse de <i>B. pertussis</i>			
Article 3. Les machineries de sécrétion de la FHA de B. pertussis et de			
l'hémolysine HpmA de Proteus mirabilis ne sont pas interchangeables			
Discussion générale et perspectives			
Références bibliographiques p.			

Introduction générale

1. Mécanismes de sécrétion des protéines chez les bactéries à Gram négatif

La cellule bactérienne est protégée par une enveloppe qui constitue une barrière entre le cytoplasme et le milieu extérieur. Cependant, il est vital pour les bactéries de pouvoir prélever dans leur environnement nutriments et sources d'énergie, et d'y sécréter différentes molécules, telles que des enzymes, ou des facteurs de virulence dans le cas des bactéries pathogènes. Pour réaliser ces échanges, de nombreux systèmes de transport sont présents dans l'enveloppe bactérienne.

L'enveloppe des bactéries à Gram négatif se compose de trois éléments: la membrane cytoplasmique (ou membrane interne), le périplasme, et la membrane externe (figure 1). La membrane cytoplasmique est un double feuillet phospholipidique associé à des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique, le transport de nutriments, l'exportation de protéines et de polysaccharides, la transduction sensorielle, la biogenèse de lipides et celle du peptidoglycane (pour revue, voir Kadner, 1996). La membrane externe présente une structure asymétrique, avec un feuillet externe constitué de lipopolysaccharides (LPS) et un feuillet interne composé de phospholipides (pour revue, voir Nikaido, 1996). Parmi les systèmes de transport de la membrane externe, les porines sont majoritaires. Ce sont des complexes trimériques qui permettent le passage de petites molécules hydrophiles. La membrane externe contient aussi des récepteurs et des protéines impliquées dans des transports spécifiques. Situé entre les deux membranes, le périplasme est un compartiment dont la structure s'apparente à celle d'un gel (pour revue, voir Oliver, 1996). Il contient des protéines et une couche de peptidoglycane (ou muréine), un polymère complexe qui confère à la cellule sa forme et une certaine rigidité.

Les mécanismes de sécrétion des protéines chez les bactéries à Gram négatif suscitent depuis de nombreuses années un grand intérêt parmi les microbiologistes, en raison du rôle joué par les protéines sécrétées dans la pathogénicité vis à vis des animaux et des plantes. Dans d'autres cas, cet intérêt s'explique par l'importance biotechnologique de certaines protéines sécrétées. Dans la plupart des revues sur ce sujet, la classification des mécanismes de sécrétion est faite en 3 groupes, intitulés type I à type III (pour revues, voir Blight *et al*, 1994; Lory, 1992; Salmond and Reeves, 1993; Wandersman, 1992). Un nouveau groupe, le type IV, a récemment été proposé



Figure 1. Structure de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif. Les abbréviations sont: PM, protéine membranaire; PL, phospholipide; LP, lipoprotéine; PP, protéine périplasmique; PG, peptidoglycane; P, porine; LPS, lipopolysaccharide. D'après Rick et Silver, 1996

pour les protéines sécrétées selon un mode proche de mécanismes de transfert intercellulaire d'ADN (Christie, 1997).

I. Sécrétion de type I

Les protéines sécrétées *via* un système de type I sont essentiellement des toxines, des protéases et des lipases (tableau 1). Ces protéines possèdent généralement un signal de sécrétion C-terminal. Elles traversent l'enveloppe bactérienne en une seule étape, sans intermédiaire périplasmique. Leur machinerie de sécrétion comporte trois protéines dont deux sont associées à la membrane interne et la troisième à la membrane externe. Le prototype du type I est le système de sécrétion de l'hémolysine- α (HlyA) d'*Escherichia coli* (figure 2).

I. 1. Structure des sytèmes de sécrétion de type I

a) ATPase de la membrane cytoplasmique

Le premier composant du système de type I appartient à la superfamille des transporteurs ABC (pour "<u>ATP-b</u>inding <u>c</u>assette") qui se caractérise par la grande conservation d'une cassette de liaison à l'ATP (pour revues, voir Higgins, 1992; Fath et Kolter, 1993). En effet, de nombreux mécanismes de transport dépendent de l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie. En plus du domaine de liaison à l'ATP, les transporteurs de cette famille possèdent un domaine transmembranaire, appelé MSD (pour "<u>m</u>embrane-<u>s</u>panning <u>d</u>omain"). Dans certains cas, la cassette de liaison à l'ATP et le domaine transmembranaire sont portés par des polypeptides différents. La répartition des transporteurs ABC est relativement ubiquiste. On distingue 3 sous-familles:

- des transporteurs ABC eucaryotes: plusieurs membres de ce groupe présentent un intérêt médical. C'est le cas du CFTR (pour "cystic fibrosis transmembrane regulator") qui est défectueux chez les patients atteints de mucoviscidose, et de la glycoprotéine P, appelée également MDR (pour "multidrug resistance"), car elle est surexprimée dans les cellules tumorales résistantes à la chimiothérapie (Gregory *et al.*, 1990; Higgins, 1993). Dans les transporteurs ABC eucaryotes, le domaine de liaison à l'ATP et le domaine transmembranaire sont toujours portés par le même polypeptide.

- des systèmes d'importation bactériens: ce groupe correspond aux perméases de la membrane cytoplasmique qui assurent l'entrée dans la cellule

Protéine sécrétée	Organisme
Hémolysine HlyA	Escherichia coli
Hémolysine HlyA	Proteus vulgaris
Hémolysine HlyA	Morganella morganii
Hémolysine AppA	Actinobacillus pleuropneumoniae
Hémolysine AshA	Actinobacillus suis
Leucotoxine AktA	Actinobacillus actinomycetemcomitans
Leucotoxine LktA	Pasteurella haemolytica
Adénylate cyclase-hémolysine CyaA	Bordetella pertussis
Métalloprotéases PrtA, PrtB, PrtC, et PrtG	Erwinia chrysanthemi
Protéase alcaline AprA	Pseudomonas aeruginosa
Hémophore HasA	Serratia marcescens
Métalloprotease PrtSM	Serratia marcescens
Lipase LipA	Serratia marcescens

.

Tableau 1. Protéines sécrétées par un système de type I. D'après Fath et Kolter, 1993

bactérienne d'une large panoplie de molécules, telles que l'histidine (système HisJQMP) ou des oligopeptides (système OppABCDF), deux systèmes découverts chez *Salmonella typhimurium* (Higgins *et al.*, 1982; Hiles *et al.*, 1987). Dans ces systèmes d'importation, le domaine de liaison à l'ATP et le domaine transmembranaire sont portés par des polypeptides distincts. De plus, ces systèmes font appel à une protéine périplasmique qui lie le substrat et le présente à la perméase.

- des systèmes d'exportation bactériens: le premier transporteur ABC décrit chez les procaryotes fut HlyB, impliqué dans la sécrétion de HlyA chez *E. coli* (Felmlee *et al.*, 1985a). Par la suite, de nombreux systèmes similaires ont été identifiés chez d'autres bactéries à Gram négatif ou à Gram positif. Ils sont impliqués dans la sécrétion de protéines, de peptides comme la colicine V, un antibiotique produit par certaines espèces d'entérobactéries (Gilson *et al.*, 1990), ou de composés non protéiques, tels que le β -1,2-glucane chez *Rhizobium meliloti* (Stanfield *et al.*, 1988). Dans ces systèmes d'exportation, le domaine de liaison à l'ATP et le domaine transmembranaire sont généralement portés par le même polypeptide.

b) Protéine accessoire de la membrane cytoplasmique

Le deuxième composant appartient à la famille des protéines de fusion membranaire (MFP pour "membrane fusion proteins"). Ces protéines possèdent un segment transmembranaire N-terminal suivi d'un large domaine périplasmique hydrophile dont la conformation étendue permettrait au domaine C-terminal plus hydrophobe d'interagir avec la membrane externe. Elles assureraient ainsi une connexion entre la membrane interne et la membrane externe, pour faciliter le passage des substrats (pour revue, voir Dinh *et al.*, 1994). Les interactions de la protéine de fusion membranaire avec ses partenaires de la membrane interne et de la membrane externe ont pu être montrées par différentes approches dans le système de sécrétion de la colicine V (Hwang *et al.*, 1997) et dans le système de sécrétion de HlyA (Schlör *et al.*, 1997).

c) Protéine de la membrane externe

Le troisième composant du système de type I est une protéine de la membrane externe. La mieux caractérisée est TolC, qui appartient aux systèmes de sécrétion de HlyA et de la colicine V (Wandersman et Delepaire, 1990; Gilson *et al.*, 1990). La protéine TolC serait présente dans la membrane externe sous la forme de trimères. Chaque monomère possèderait un domaine membranaire dont la structure prédite est un tonneau β , et un petit segment périplasmique C-terminal qui interagirait avec les autres composants du système de sécrétion (Koronakis *et al.*, 1997).



Figure 2. Sécrétion de type I: exemple de l'hémolysine HlyA chez *E. coli.* HlyB est l'ATPase de la membrane cytoplasmique, HlyD est la protéine de fusion membranaire (MFP), et TolC est la protéine de membrane externe. D'après Fath et Kolter, 1993

I. 2. Systèmes de type I : organisation génétique

Dans le type I, les exoprotéines et leur système de sécrétion sont souvent codés par des gènes groupés en opéron. Par exemple, l'opéron *prtDEFBCA* de *Erwinia chrysanthemi* code les protéases PrtA, PrtB, et PrtC. PrtD est la protéine ABC, PrtE est la MFP et PrtF le composant de la membrane externe (Létoffé *et al.*, 1990). La même organisation se retrouve pour les opérons *cyaABDE* et *aprADEF* qui déterminent la synthèse et la sécrétion de l'adénylate cyclase-hémolysine CyaA de *Bordetella pertussis*, et la protéase alcaline PrtA de *Pseudomonas aeruginosa*, respectivement (Glaser *et al.*, 1988; Guzzo *et al.*, 1991).

D'autres systèmes présentent une organisation légèrement différente. Le gène *hlyA*, qui code l'hémolysine- α (HlyA) d'*E. coli* est adjacent aux gènes qui codent les 2 composants de la membrane interne, *hlyB* et *hlyD* (Felmlee *et al.*, 1985a). Par contre, le gène codant le composant de la membrane externe, *tolC*, ne fait pas partie de cet opéron (Wandersman et Delepaire, 1990). De même, chez *Serratia marcescens* le gène *hasF* homologue à *tolC* est séparé de l'opéron *hasADE* (Binet et Wandersman, 1996). HasD, HasE, et HasF forment l'appareil de sécrétion de HasA, une protéine capable de lier l'hème de l'hémoglobine et qui est importante pour l'acquisition du fer par la bactérie.

TolC présente la particularité d'être une protéine multifonctionnelle, impliquée notamment dans la synthèse du LPS, la résistance à certains antibiotiques et détergents, et l'entrée de la colicine E1 (Schnaitman et Klena, 1993; Whitney, 1971; Webster, 1991). Les différentes organisations génétiques décrites ci-dessus suggèrent qu'il existerait deux classes de protéines de membrane externe parmi les systèmes de type I: des protéines uniquement dédiées à la sécrétion d'une part, et des protéines multifonctionnelles de moindre spécificité comme TolC, d'autre part (Binet et Wandersman, 1996).

I. 3. Signal de sécrétion de HlyA

HlyA fait partie de la famille des toxines RTX (pour "repeats in toxin") (pour revue, voir Coote, 1992). Ce sont des toxines cytolytiques dont l'activité dépend du calcium et qui contiennent en nombre variable une séquence nonapeptidique riche en glycine et en acide aspartique répétée en tandem. Les toxines RTX sont synthétisées sous forme de prototoxines, puis activées par une modification post-traductionnelle. Dans le cas de HlyA, l'activation consiste en l'addition de palmitate sur les chaînes latérales de 2 résidus lysine (Stanley *et al.*, 1994). Cette réaction est catalysée par HlyC, dont le gène se trouve en amont de l'opéron *hlyABD*.

Le signal de sécrétion de HlyA a pu être localisé grâce à une série de délétions et de fusions génétiques. Il recouvre les 60 résidus C-terminaux de la protéine (Koronakis *et al.*, 1989; Hess *et al.*, 1990), et n'est pas clivé lors de la sécrétion de HlyA (Felmlee *et al.*, 1985b). Ce segment est aussi le plus petit polypeptide dérivé de HlyA capable d'être sécrété par le système HlyB-HlyD (Jarchau *et al.*, 1994). Curieusement, le signal de sécrétion de HlyA est relativement tolérant vis à vis de la plupart des mutations ponctuelles. Cependant, certaines mutations sont capables de réduire la sécrétion de HlyA (Kenny *et al.*, 1992; Stanley *et al.*, 1991). La sécrétion de HlyA pourrait donc dépendre de quelques résidus cruciaux répartis dans le signal de sécrétion et qui agiraient de façon coopérative, selon un mode qu'il reste à éclaircir.

II. Sécrétion de type II

La sécrétion de type II, appelée aussi voie générale de sécrétion (ou GSP pour "general secretory pathway") se déroule en deux étapes (pour revue, voir Pugsley, 1993). Les protéines qui utilisent cette voie sont synthétisées avec un signal de sécrétion N-terminal appelé séquence-signal ou peptide-signal qui les dirige vers la membrane cytoplasmique. Dans une première étape impliquant les produits des gènes *sec*, les protéines sont exportées vers le périplasme où la séquence-signal est clivée par une signal-peptidase. Dans la seconde étape, les protéines traversent la membrane externe à l'aide de protéines auxiliaires dont le nombre varie de 1 à plus de 14. Les machineries qui assurent la sécrétion des protéines à travers la membrane externe constituent les différentes branches terminales de la voie générale de sécrétion. Les exemples de la pullulanase de *Klebsiella oxytoca* et des pilis de type P seront détaillés. Un système particulier, qualifié d'autosécrétion, peut être classé parmi les systèmes de type II. II sera illustré par l'exemple de l'IgA protéase de *Neisseria gonorrhoeae*.

II. 1. Exportation à travers la membrane cytoplasmique

L'étape de translocation à travers la membrane cytoplasmique a été étudiée en détail chez *E. coli*. L'approche génétique a montré que les mutations affectant l'exportation d'une préprotéine se situent généralement soit dans la séquence-signal de la préprotéine, soit dans l'un des gènes *sec*. La majorité des mutations *sec* ont un effet léthal sur les bactéries dans les conditions normales de culture. D'autres mutations des gènes *sec*, les mutations *prl*, ont été sélectionnées suivant leur capacité à restaurer l'exportation de préprotéines possédant une séquence-signal mutée (Bieker-Brady et Silhavy, 1992). Comme elles n'affectent pas l'exportation des autres protéines, munies d'une séquence-signal normale, ces mutations ne sont pas léthales.

La machinerie d'exportation de la voie générale de sécrétion se compose de 7 protéines Sec: SecB est une chaperone cytoplasmique; SecA est une ATPase associée à la membrane interne; SecY, SecE, et SecG, SecD, SecF, et YajC forment un complexe membranaire, appelé la translocase.

<u>a) La séquence-signal</u>

La structure de la séquence-signal bactérienne est semblable à celle du peptide-signal eucaryote impliqué dans le transport des protéines à travers la membrane du réticulum endoplasmique. Bien que leur structure primaire soit très peu conservée, les séquences-signal partagent des caractéristiques essentielles (pour revue, voir Izard et Kendall, 1994). Une séquence-signal bactérienne se compose classiquement de 3 domaines (figure 3):

- un domaine N-terminal polaire (domaine N), long de 5 à 6 résidus, qui compte en moyenne 2 résidus chargés positivement. Des études mutationnelles ont montré que la lysine, l'arginine et même l'histidine peuvent indifféremment apporter la charge positive nécessaire à la translocation (Sasaki *et al.*, 1990). L'importance de la charge nette positive a pu être montrée par des mutations qui introduisaient une charge nette négative ou nulle, et ayant pour effet de réduire considérablement le taux d'exportation (Puziss *et al.*, 1989; Sasaki *et al.*, 1990).

- un coeur hydrophobe, long d'environ 12 résidus, composé de résidus très hydrophobes et dépourvu de résidus chargés ou polaires (domaine H)

- une partie C-terminale, longue de 6 résidus, moins hydrophobe que le domaine H, et qui se termine par un site de clivage par la signal-peptidase LepB (domaine C). Les caractéristiques de ce site de clivage sont décrites plus bas.

Les résidus situés derrière le site de clivage de la séquence-signal possèdent souvent une charge nette négative ou neutre. C'est pourquoi la séquence-signal a été qualifiée de dipôle par von Heijne (1986), puisque les charges positives et négatives sont regroupées aux extrémités N-terminale et C-terminale, respectivement. Ce caractère dipolaire pourrait jouer un rôle dans la fonction de la séquence-signal, car le potentiel électrochimique de membrane dirigerait son insertion dans la membrane interne. Suivant cette théorie, le domaine chargé positivement serait orienté vers le cytoplasme, tandis que le domaine chargé négativement serait transporté vers le périplasme grâce au potentiel électrochimique de membrane (von Heijne, 1992).

De plus, le domaine chargé positivement pourrait être responsable d'une interaction électrostatique entre la séquence-signal et les phospholipides chargés négativement de la membrane interne. Cette interaction initiale serait suivie par l'insertion du domaine hydrophobe dans la double-couche lipidique. C'est le modèle de la boucle (pour revue, voir de Vrije *et al.*, 1990).

Le coeur hydrophobe constitue une sorte de signature de la séquence-signal, et son interruption par un résidu chargé, ou neutre mais polaire, ainsi que des délétions dans cette région, sont capables d'empêcher l'exportation. Les principales caractéristiques du coeur hydrophobe sont sa longueur, son hydrophobicité, et sa conformation. En remplaçant les 10 résidus du coeur hydrophobe de la séquence-



Figure 3. Structure des séquences-signal bactériennes. D'après Pugsley, 1993. A. Exemple de la séquence-signal de la phosphatase alcaline (PhoA) d'*E. coli*. B. Exemple de la séquence-signal de la pullulanase de *Klebsiella oxytoca*.

signal de PhoA par des homopolymères de 10 leucines, 10 valines ou 10 alanines, une diminution de l'exportation parallèle à la diminution de l'hydrophobicité des résidus introduits a été observée (Chou et Kendall, 1990). Le polymère de 10 leucines induit une exportation rapide et complète, alors que l'exportation est faible dans le cas des 10 valines, et pratiquement absente dans celui des 10 alanines. Cependant, la perte d'exportation peut être compensée en augmentant la longueur du polymère, mais il existe une longueur limite au-delà de laquelle le clivage de la séquence-signal n'a plus lieu. Ceci suggère que la longueur du coeur hydrophobe est importante pour une localisation correcte du site de clivage.

En plus de son rôle dans l'insertion membranaire de la séquence-signal, le coeur hydrophobe semble impliqué dans des interactions avec la machinerie d'exportation. En particulier, des mutations ayant un effet suppresseur sur certaines mutations du coeur hydrophobe ont été mises en évidence dans SecY, SecA, et SecE (Puziss *et al.*, 1992; Fikes et Bassford; 1989; Stader *et al.*, 1989).

La structure secondaire de la séquence-signal dépend de son environnement. Dans un milieu apolaire, elle adopte une conformation en hélice- α , particulièrement stable dans la région du coeur hydrophobe mais qui s'étend aux régions N- et Cterminales (Rizo *et al.*, 1989). L'avantage d'une telle structure est qu'elle contribue à l'hydrophobicité totale, car les groupement amides polaires sont alors mobilisés dans des liens hydrogène intrachaînes.

La seule région de la séquence-signal soumise à des contraintes de structure primaire est le site de clivage. Il obéit à la règle (-3, -1) définie par Von Heijne (1984). Les résidus situés en position -3 et -1, par rapport au site de clivage par la signal-peptidase LepB, sont de préférence neutres et de petite taille. C'est l'alanine qui est la plus fréquemment trouvée à ces positions. Une étude mutationnelle très complète du site de clivage de la MBP (pour "maltose-binding protein") a montré que la cystéine est tolérée aux positions -3 et -1, tandis que la thréonine en position -1 diminue fortement le clivage (Fikes *et al.*, 1990). Les mêmes auteurs ont observé que l'introduction de résidus défavorables en position -1 pouvait induire le clivage à un site alternatif. En position +1, seule la proline se révèle incompatible avec le clivage, et provoque une inhibition de la signal-peptidase LepB (Barkocy-Gallagher et Bassford, 1992).

La structure en hélice, qui participe à l'hydrophobicité totale, et la structure en dipôle semblent donc être les deux éléments qui confèrent sa fonction à la séquencesignal. L'altération de l'un des éléments peut cependant être compensée par l'optimisation de l'autre. Par exemple, la diminution de la charge nette positive dans la région N-terminale d'un mutant de la séquence-signal de la MBP a pu être corrigée par l'augmentation de l'hydrophobicité du coeur (Puziss *et al.*, 1989). Ceci suggère que les fonctions des différents domaines de la séquence-signal ne sont pas complètement indépendantes. D'autre part, il est possible d'améliorer l'exportation de certaines protéines en modifiant les caractéristiques de leur séquence-signal, mais cela se fait souvent aux dépens d'autres protéines. Ainsi, une séquence-signal mutante contenant 9 ou 10 leucines fonctionne mieux que la séquence-signal sauvage, mais induit l'accumulation du précurseur d'une autre protéine dans la bactérie, la β -lactamase (Rusch *et al.*, 1994). Les "imperfections" présentes dans les séquences-signal sont donc extrêmement utiles pour éviter une compétition entre les protéines, ce qui aurait pour effet l'encombrement du système d'exportation.

b) La chaperone cytoplasmique SecB

SecB est une protéine cytoplasmique probablement tétramérique. Elle est capable de se lier aux préprotéines en de multiples sites (pour revue, voir Kumamoto 1991), ce qui l'assimile à une chaperone moléculaire, bien qu'elle ne possède pas d'activité ATPasique, à la différence des chaperones "générales".

L'étude du système Sec a largement fait appel aux propriétés de la βgalactosidase, un enzyme cytoplasmique dont la forme active est un tétramère. L'expression d'un hybride séquence-signal-β-galactosidase induit un phénotype Lac⁻, indiquant l'absence de tétramérisation. De plus, une telle construction est toxique pour la bactérie, car elle provoque un blocage de la machinerie d'exportation (Lee et al., 1989). Ces expériences montrent qu'une structure volumineuse n'est pas compatible avec l'exportation via le système Sec. Pour une exportation efficace, il est donc nécessaire que la préprotéine se replie lentement et qu'elle conserve une conformation relativement étendue pendant l'exportation. Plusieurs facteurs interviennent pour maintenir les préprotéines dans une conformation compatible avec l'exportation. La séquence-signal est capable de retarder le repliement in vitro de préprotéines préalablement dénaturées (Liu et al., 1989). Les chaperones "générales" telles que GroEL et GroES s'associent également aux préprotéines (Kusukawa et al., 1989; Laminet et al., 1990). Enfin, les fonctions principales de SecB seraient d'empêcher l'aggrégation de certaines préprotéines (Breukink et al., 1992) et de les transférer à SecA (Hartl et al., 1990)

c) SecA

SecA joue un rôle central dans le système Sec, car ses activités de liaison et d'hydrolyse de l'ATP fournissent une partie de l'énergie nécessaire à la translocation des protéines à travers la membrane cytoplasmique (Lill, 1989) (Figure 4). SecA reconnaît les préprotéines et la chaperone SecB, et s'associe à la membrane cytoplasmique grâce à ses interactions avec les phospholipides acides et SecYE (Lill, 1990; Hartl *et al.*, 1990; Hendrik et Wickner, 1991). Les préprotéines, les phospholipides acides et SecYE stimulent l'activité ATPasique de SecA. La liaison de l'ATP provoque un profond changement conformationnel et l'insertion dans la membrane d'un large domaine de SecA (Economou et Wickner, 1994). Cette insertion induit une translocation de la préprotéine sur une longueur de 25 résidus environ (Uchida *et al.*, 1995; Schiebel *et al.*, 1991). A ce stade, l'hydrolyse de l'ATP induit la désinsertion de SecA et la dissociation de la préprotéine. Lorsque la préprotéine est libérée, sa translocation est relayée par le potentiel électrochimique de membrane



Figure 4. Représentation schématique du mécanisme de translocation d'une protéine par le système Sec. D'après Wickner et Leonard, 1996. Voir le texte pour l'explication du mécanisme.

-

(Schiebel *et al.*, 1991). La translocation de la totalité de la préprotéine s'opère grâce à plusieurs cycles successifs d'insertion/désinsertion de SecA (figure 4).

d) Protéines Sec membranaires

SecY, SecE, SecG, SecD, SecF, et YajC forment un complexe hétéromérique membranaire, appelé la translocase (pour revue, voir Wickner et Leonard, 1996). Le complexe SecYEG et SecA sont suffisants pour reconstituer un système de translocation dans des protéoliposomes (Hanada, 1994). Cependant, une translocation réellement efficace nécessite SecD, SecF, et YajC (Duong et Wickner, 1997a et 1997b). Il a été montré qu'une inversion de la topologie de SecG accompagne l'insertion de SecA (Nishiyama *et al.*, 1996). Cette insertion de SecA est stabilisée par SecDF (Economou *et al.*, 1995).

e) Signal-peptidases

Il existe 3 types de signal-peptidases. La plupart des préprotéines sont clivées par LepB, appelée aussi leader-peptidase I ou signal-peptidase I (pour revue, voir Tschantz et Dalbey, 1994). LepB possède 2 segments transmembranaires et un large domaine périplasmique porteur du site actif. Ses résidus sérine 90 et lysine 145 sont essentiels pour son activité.

La lipoprotéine-signal-peptidase LspA (ou signal-peptidase II) est une protéine polytopique de la membrane cytoplasmique (Munoa *et al.*, 1991). Elle clive la séquence-signal des lipoprotéines. Ce sont des protéines dont la forme mature porte comme résidu N-terminal une N-acyldiacylglycéryl-cystéine (pour revue, voir Sankaran et Wu, 1994). La séquence-signal des lipoprotéines est généralement plus courte que la séquence-signal classique et sa région centrale est plus hydrophobe (figure 3). Elle possède une leucine en position (-3) et surtout une cystéine en position (+1) (von Heijne, 1989).

Enfin, la prépiline-peptidase est une protéine polytopique de la membrane cytoplasmique dont le site actif, contrairement aux 2 signal-peptidases précédentes, se situe du côté cytoplasmique de la membrane (pour revue, voir Strom et Lory, 1993). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, la prépiline-peptidase PilD clive la séquencesignal de la piline PilA, qui compose les pili de type IV. La séquence-signal de PilA, longue de 6 résidus, est suivie d'une région hydrophobe très conservée parmi les membres de la famille des pilines de type IV (figure 5). En plus du clivage de la séquence-signal, PilD catalyse la N-méthylation du résidu N-terminal de PilA, une phénylalanine. Des homologues de PilD ont été mis en évidence dans les espèces bactériennes qui synthétisent des pili de type IV, mais aussi dans les espèces qui possèdent une machinerie de sécrétion de type II.

<u>Pili de type IV</u>			Prépiline signal peptidase
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Pi	IA MKAQK G	FTLIELMIVVAIIGILAAIAIPQY	PilA
<i>Neisseria gonorhhoeae</i> PilE	MNTLQK G	FTLIELMIVIAIVGILAAVALPAY	PilE
<i>Vibrio cholerae</i> TcpA	MQLLKQLFKKKFVKEEHDKKTGQE G	MTLLEVIIVLGIMGVVSAGVVTLA	TcpJ
Sécrétion de la pullulanase			
Klebsiella oxytoca PulH	MRQR G	FTLLEMMLILLLMGVSAGMVLLAF	PulO
Klebsiella oxytoca PulI	MKKQS G	MTLIEVMVALVVFALAGLAVMQAT	PulO
Klebsiella oxytoca PulJ	MIRRSS G	FTLVEMLLALAILAALSVAAVTVL	PulO
Klebsiella oxytoca PulG	MQRQR G	FTLLEIMVVIVILGVLASLVVPNL	PulO

Figure 5. Alignement de la séquence N-terminale de la prépiline de type IV de *P. aeruginosa* avec plusieurs séquences homologues. D'après Pugsley, 1993. Le site de clivage par la prepiline signal peptidase est indiqué par une flêche. Les résidus invariants sont en gras.

II. 2. Sécrétion à travers la membrane externe

Suite à la translocation *via* le système Sec et le clivage de la séquence-signal, les protéines exportées sont libérées dans le périplasme. Ce compartiment contient plusieurs enzymes qui participent au repliement des protéines (pour revue, voir Missiakas et Raina, 1997). La formation et l'isomérisation des ponts disulfures est assurée par des PDI (pour "protein <u>d</u>isulfide <u>i</u>somerase"), notamment DsbA, la disulfide oxydase prototypique, et la disulfide isomérase, DsbC. *E. coli* possède également plusieurs peptidyl-prolyl isomérases (PPI) périplasmiques, qui catalysent l'isomérisation des liens peptidiques de type X-Pro.

D'autre part, les protéines exportées peuvent s'associer à des chaperones périplasmiques spécialisées, telles que PapD, qui est nécessaire pour l'assemblage des pili de type P dans les souches uropathogènes d'*E. coli* (Kuehn *et al.*, 1991).

Enfin, le repliement correct de certaines protéines (souvent des enzymes) dépend d'un pro-peptide, que l'on peut qualifier de chaperone intramoléculaire car il est essentiel pour l'acquisition de la structure active de l'enzyme (pour revue, voir Eder et Fersht, 1995). Le propeptide peut être localisé entre la séquence-signal et la protéine mature ou être attaché à l'extrémité C-terminale du domaine mature. Il est clivé dès que le repliement de la protéine est terminé.

Suite à la traversée de la membrane cytoplasmique via le système Sec, la sécrétion à travers la membrane externe se fait *via* différentes "branches terminales" de la voie générale de sécrétion. La "branche principale" est utilisée par un grand nombre de bactéries (tableau 2). Elle a été particulièrement bien étudiée chez *K. oxytoca.* Cette bactérie sécrète un enzyme de dégradation de l'amidon, la pullulanase, grâce à une machinerie comportant plus de 14 protéines. Une autre branche bien caractérisée est le système d'assemblage des pili de type P chez les souches uropathogènes d'*E. coli.* Enfin, une branche se caractérise par l'absence de protéines auxiliaires, et a été qualifiée d'autosécrétion.

<u>a) Pullulanase</u>

La pullulanase est une lipoprotéine produite par la plupart des espèces du genre *Klebsiella* (pour revue, voir Pugsley, 1993). A l'instar des autres lipoprotéines, son peptide-signal est clivé par la signal-peptidase II. Son gène de structure, *pulA*, et les gènes codant la machinerie de sécrétion (baptisée sécréton) sont groupés dans un seul locus chromosomique. Le gène *pulA* forme avec *pulB* un opéron, en aval duquel se trouve un autre gène, *pulS*. En amont de *pulA*, on trouve un long opéron de 13 gènes (*pulC* à *pulO*). Il faut noter que dans les autres systèmes de la branche principale décrits dans le tableau 2, le gène de structure de la protéine sécrétée n'est généralement pas localisé à proximité immédiate des gènes impliqués dans la sécrétion.

Protéine sécrétée	Système	Organisme
Pullulanase	Pul	K. oxytoca
?	Gsp	E. coli K12
Pectate lyases, cellulase	Out	Erwinia chrysanthemi
Pectate lyases, cellulase	Out	Erwinia carotovora
Cellulase, protéase	Xps	Xanthomonas campestris
Exotoxine A, lipases, protéases	Хср	Pseudomonas aeruginosa
Toxine du choléra, protéase	Тср	Vibrio cholerae
Toxines, protéase, acyltransférase	Exe	Aeromonas hydrophila

Tableau 2. Protéines sécrétées par la branche principale de la voie générale de sécrétion

D'après Pugsley, 1993

La fonction des produits des gènes *pul* commence à être connue. Les gènes *pulS* et *pulC-O* sont tous nécessaires pour la sécrétion de la pullulanase, contrairement à *pulB* dont la fonction est inconnue. PulO est homologue à la prépiline-peptidase PilD de *P. aeruginosa* (Pugsley et Dupuy, 1992). Ses substrats seraient PulG, PulH, PulI, et PulJ, qui possèdent une séquence-signal homologue à celle des prépilines de type IV (figure 5). Sur la base de ces homologies, il est proposé que PulG, H, I, et J s'assembleraient dans l'espace périplasmique de la bactérie pour former un pseudo-pilus. PulE possède des sites de liaison à l'ATP. Cependant, PulE n'interviendrait pas directement dans l'énergétisation de la sécrétion, mais plutôt dans l'assemblage du sécréton (Possot *et al.*, 1997). PulS est une lipoprotéine de la membrane externe. Cette protéine constitue un nouveau type de chaperone nécessaire à la formation de complexes multimériques de PulD dans la membrane externe (Hardie *et al.*, 1996a). Ces complexes de 10-12 sous-unités pourraient former des canaux à travers lesquels la pullulanase serait transportée (Hardie *et al.*, 1996b).

La nature du signal de sécrétion reconnu par le sécréton n'est pas connue avec certitude. Cependant, il a été montré que 2 régions non adjacentes d'environ 80 acides aminés sont nécessaires pour une sécrétion efficace de la pullulanase (Sauvonnet et Pugsley, 1996). Une des hypothèses envisagées est que ces régions agissent coopérativement lorsque la pullulanase acquiert sa conformation dans le périplasme.

b) Pili de type P

Les pili de type P sont des structures adhésives relativement rigides, produites à la surface de souches uropathogènes d'*E. coli*. Ce sont les prototypes d'une vaste famille de pili bactériens dont font également partie les pilis de type I, qui sont tous assemblés par la voie dite "de la chaperone et du placeur" (pour revue, voir Hultgren *et al.*, 1993). Ils sont composés d'une sous-unité majeure, PapA, et de 5 sous-unités mineures, PapH, PapE, PapF, PapG, et PapK. Les gènes codant les sous-unités et les gènes impliqués dans la biogénèse du pilus sont groupés en opéron. Les différentes sous-unités du pilus sont synthétisées avec une séquence-signal classique, et exportées à travers la membrane interne via le système Sec. Après le clivage de la séquence-signal par la signal-peptidase LepB, les sous-unités s'associent dans le périplasme avec la chaperone PapD, qui empêche leur aggrégation prématurée. Les complexes PapD/sous-unité sont ensuite dirigés vers le placeur moléculaire PapC, une protéine de la membrane externe dont la fonction est d'assembler les sous-unités dans un ordre bien défini au cours de l'extrusion du pilus.

c) Autosécrétion

L'IgA protéase de *N. gonorrhoeae* possède une séquence-signal classique, et traverse la membrane interne en utilisant le système Sec. Son domaine C-terminal de 30 kDa possède une structure en tonneau β , et le dernier résidu de ce domaine est

une phénylalanine. Ces caractéristiques sont communes à beaucoup de protéines de la membrane externe de bactéries à Gram négatif. Le domaine C-terminal s'insère dans la membrane externe, formant un canal qui permet le passage du reste de la protéine (Klauser *et al.*, 1993). Contrairement aux autres protéines qui utilisent la voie générale de sécrétion, l'IgA protéase traverse la membrane externe dans une conformation étendue et ne se replie qu'au sortir de celle-ci (Klauser *et al.*, 1990). La protéase est libérée dans le milieu suite à un clivage autoprotéolytique.

III. Sécrétion de type III

III. 1. Caractéristiques des systèmes de type III

Le type III est, comme le type I, un mécanisme de sécrétion indépendant du système Sec. Il a été mis en évidence chez des bactéries pathogènes pour les animaux ou pour les plantes qui sécrètent certains facteurs de virulence suite au contact entre la bactérie et la cellule hôte (pour revue, voir Lee, 1997). Les facteurs de virulence protéiques comme les Yops chez *Yersinia*, les Ipas chez *Shigella*, les Sips chez *Salmonella* et les Harpins chez *Pseudomonas* sont sécrétés par des systèmes de ce type. Un système de type III a également été découvert chez des souches d'*E. coli* entérohémorragiques. D'autre part, certains composants du système de type III possèdent des homologues dans la machinerie d'assemblage des flagelles d'*E. coli, S. typhimurium, Caulobacter crescentus*, et *Bacillus subtilis*.

Dans ce système, les protéines dites "effectrices" sont sécrétées par la bactérie suite au contact avec la cellule-cible: c'est une sécrétion "contact-dépendante". Les protéines effectrices sont directement injectées dans le cytoplasme de la cellule-cible dont elles vont altérer les fonctions, afin de permettre la survie et la multiplication du pathogène.

III. 2. La sécrétion des Yops chez les bactéries du genre *Yersinia*

Les bactéries du genre Yersinia (Y. pestis, Y. pseudotuberculosis, et Y. enterocolitica) possèdent un plasmide d'environ 70 kb appelé pYV (pour "yersinia virulence"). Ce plasmide code les Yops (pour "yersinia outer proteins") et leur machinerie de sécrétion, qui compte plus de 20 protéines. Certaines protéines Yops, comme YopE, YopH, YpkA, et YopM, sont des protéines effectrices destinées à être transférées à l'intérieur de la cellule-cible. D'autres, comme YopB et D font partie de la machinerie de translocation, qui est nécessaire aux protéines effectrices pour traverser la membrane plasmique eucaryote.

a) Protéines effectrices

Les activités enzymatiques des protéines Yops effectrices seraient responsables de la résistance des bactéries à la réponse immunitaire de type phagocytaire (Cornelis et Wolf-Watz, 1997). YopE est une cytotoxine qui détruit le réseau d'actine de la cellule-cible. YopH est une tyrosine phosphatase. Elle contribue à inhiber l'internalisation des bactéries dans les macrophages et l'attaque oxydative, vraisemblablement en déphosphorylant des protéines impliquées dans la transduction de signaux. YpkA est une sérine/thréonine kinase qui pourrait également interférer avec une voie de transduction de signaux dans la cellule-cible. Comme YopE, YopH, et YpkA, YopM est transférée à l'intérieur de la cellule-cible, mais sa fonction est encore inconnue. Les protéines Yops effectrices possèdent un signal de sécrétion N-terminal non clivé, de 15 et 17 résidus pour YopE et YopH, respectivement (Sory *et al.*, 1995).

b) Sécrétion

La sécrétion des Yops à travers l'enveloppe bactérienne fait appel à une vingtaine de protéines qui constituent le système Ysc (pour "Yop secretion"). Quelques-unes de ces protéines ont été caractérisées. YscR, LcrD et YscU sont des protéines de la membrane interne (Fields *et al.*, 1994; Plano *et al.*, 1991; Allaoui *et al.*, 1994). YscN possède des sites de liaison à l'ATP caractéristiques des ATPases et fournirait en partie l'énergie nécessaire à la sécrétion des Yops (Woestyn *et al.*, 1994). YscC, une protéine homologue à la protéine PulD de *K. oxytoca*, forme dans la membrane externe un large canal multimérique (Koster *et al.*, 1997).

c) Chaperones Syc

Les protéines Syc (pour "specific Yop chaperones") sont des chaperones cytoplasmiques spécifiques nécessaires à la sécrétion de YopE (SycE), YopH (SycH), et YopB et D (SycD) (pour revue, voir Wattiau *et al.*, 1996). A la différence de SecB qui se lie aux préprotéines en de multiples sites, SycE et SycH se lient à un site unique dans la région amino-proximale de leur partenaire (Woestyn *et al.*, 1996). Cette région de liaison est aussi la région nécessaire à la translocation de YopE et YopH à travers la membrane plasmique de la cellule cible via le pore YopB/YopD (Sory *et al.*, 1995). Le rôle des chaperones Syc pourrait être d'empêcher des interactions précoces entre les protéines Yops à l'intérieur de la bactérie, à la façon de la chaperone périplasmique PapD dans le système d'assemblage des pili de type P.

d) Régulation de l'expression et de la sécrétion des Yops

La régulation de la synthèse et de la sécrétion des Yops est complexe et se fait à plusieurs niveaux. Les gènes *yop* et certains gènes *ysc* forment un régulon placé sous le contrôle de VirF, un activateur transcriptionnel de la famille d'AraC (Cornelis *et al.*, 1989). La transcription de *virF* est induite à 37°C. La sécrétion des Yops est donc thermorégulée.

Le second niveau de régulation implique chez *Y. pseudotuberculosis* la sécrétion de LcrQ (YscM chez *Y. enterocolitica*), un répresseur des gènes *yop* (Pettersson *et al.*, 1996). Lorsque le contact avec la cellule-cible est établi, le système de sécrétion de type III s'ouvre. LcrQ est alors expulsé de la bactérie et la répression des gènes *yop* est levée. Chez *S. typhimurium*, la synthèse des flagelles est contrôlée par un système analogue. YopN serait l'élément qui contrôle l'ouverture et la fermeture du canal de sécrétion.

IV. Sécrétion de type IV

La sécrétion de protéines par un système de type IV se ferait en 2 étapes. Après la traversée de la membrane interne *via* le système Sec, la sécrétion dans le milieu extérieur se fait grâce à une machinerie comportant une dizaine de protéines homologues à des protéines impliquées dans des transferts d'ADN (tableau 3). A cause de cette homologie originale avec des systèmes de transfert d'ADN, ce type de sécrétion n'a pas été inclus dans le type II, malgré l'utilisation du système Sec pour la traversée de la membrane interne.

Les exemples répertoriés de protéines sécrétées par un système de type IV sont peu nombreux. On peut citer le système synthétisé à partir de l'ilôt de pathogénicité cag chez Helicobacter pylori, qui sécréterait un facteur induisant la production d'une cytokine inflammatoire, l'IL-8, par les cellules épithéliales gastriques (Censini et al., 1996). Chez B. pertussis, la sécrétion de la toxine pertussique dépend d'un système de type IV (Weiss et al., 1993). La toxine pertussique est une protéine multimérique composée des sous-unités S1, S2, S3, deux copies de S4, et S5. Les gènes codant ces sous-unités forment l'opéron ptx. Chaque sous-unité est munie d'une séquence-signal classique et est probablement transportée à travers la membrane cytoplasmique de *B*. pertussis par un système équivalent au système Sec d'E. coli (Locht et Keith, 1986; Nicosia et al., 1986). L'assemblage de la toxine se fait dans l'espace périplasmique. En aval de l'opéron *ptx*, le locus *ptl* code 9 protéines, de PtlA à PtlI (Weiss *et al.*, 1993; Farizo et al., 1996) essentielles à la sécrétion de la toxine assemblée à travers la membrane externe. Les protéines Ptl sont homologues aux protéines VirB, impliquées dans le transport de l'ADN-T oncogénique d'Agrobacterium tumefaciens vers les cellules de plantes et aux protéines Tra, impliquées dans les transferts d'ADN plasmidique par conjugaison (pour revues, voir Christie et al., 1997; Winans et al., 1996). Dans ces systèmes de transfert, l'ADN traverse l'enveloppe de la bactérie donneuse grâce à un complexe multimérique formé par les protéines VirB et Tra, et qui formerait un pore. Sur la base des homologies entre les systèmes Ptl, VirB, et Tra, il est concevable que les protéines Ptl forment un tel pore. PtlE, PtlF, et PtlG ont pu être détectées dans la fraction membranaire de *B. pertussis* (Johnson et Burns, 1994). PtlC et PtlH possèdent des séquences de liaison à l'ATP, et pourraient donc jouer un rôle dans l'énergisation du processus de sécrétion (Kotob et Burns, 1997). A ce jour, la seule interaction démontrée entre des protéines Ptl est la formation de complexes PtlI-PtlF (Farizo *et al.*, 1996).

Protéineª	Localisation	Fonction proposée	Protéines homologues ^c
VirB1	Exportée ^b	Transglycosylase	TraL
VirB2	Exportée	Piline	TraM, PtlA
VirB3	Exportée	Inconnue	TraA, PtlB
VirB4	Membrane cytoplasmique	ATPase	TraB, PtlC
VirB5	Exportée	Inconnue	TraC
VirB6	Membrane cytoplasmique	Pore	TraD, PtlD
VirB7	Membrane externe	Centre de nucléation du complexe (sous forme de dimère VirB7- VirB9)	TraN, PtlI
VirB8	Membrane cytoplasmique	Inconnue	TraE, PtlE
VirB9	Membrane externe	Centre de nucléation du complexe (sous forme de dimère VirB7-VirB9)	TraO, PtlF
VirB10	Membrane cytoplasmique	Inconnue	TraF, PtlG
VirB11	Cytoplasme et membrane cytoplasmique	ATPase	TraG, PtlH

Tableau 3. Systèmes de sécrétion de type IV. D'après Christie, 1997

^a Les protéines Vir B forment le complexe de sécrétion de l'ADN-T oncogénique chez Agrobacterium tumefasciens
^b Exportée désigne une protéine qui a franchi la membrane interne
^c Les systèmes homologues au système VirB sont: le système de transfert d'ADN plasmidique par conjugaison (système Tra) et le système de sécrétion de la toxine pertussique (système Ptl)

I. Le genre Bordetella

Le genre *Bordetella* a été créé en 1952 par Moreno-Lopez, en hommage au bactériologiste belge Jules Bordet qui, au début de ce siècle, découvrit avec O. Gengou *Bordetella pertussis*, l'agent de la coqueluche humaine (Bordet et Gengou, 1906). Actuellement, le genre *Bordetella* comprend 6 espèces (tableau 4). *B. pertussis, Bordetella parapertussis*, et *Bordetella bronchiseptica* sont génétiquement proches avec un contenu en G+C de 66 à 70 %. *Bordetella avium* se distingue de ces trois espèces par un contenu en G+C de 62 % seulement (Marcon, 1995). Deux nouvelles espèces, *Bordetella holmesii* et *Bordetella hinzii*, ont récemment été rattachées au genre *Bordetella*, sur la base de caractères génotypiques et phénotypiques (Weyant *et al.*, 1995; Vandamme *et al.*, 1995; Parton, 1996).

I. 1. Morphologie

Les membres du genre *Bordetella* sont des petits coccobacilles à Gram négatif en forme de bâtonnets. Ils se présentent seuls, en paires ou par petits groupes. Trois espèces (*B. bronchiseptica*, *B. avium et B. hinzii*) sont mobiles grâce à des flagelles péritriches; les espèces *B. pertussis*, *B. parapertussis* et *B. holmesii* sont immobiles (Pittman, 1984; Weyant *et al.*, 1995; Vandamme *et al.*, 1995).

I. 2. Métabolisme et besoins nutritionels

Les bactéries du genre *Bordetella* sont des aérobes strictes ne métabolisant pas les sucres. Leur énergie provient de l'oxydation des acides aminés. Ces bactéries chimio-organotrophes ont des besoins en soufre (cystéine et glutathion) et en azote organiques (acides aminés). La seule vitamine nécessaire est l'acide nicotinique. La température optimale de croissance se situe entre 35 et 37°C (Pittman, 1984).

	Mobilité	Croissance sur milieu BG	% GCb	Hôtes	Maladies
B. pertussis B.	-	3-6 jours 2-3 jours	67,7-68,9 68,1-69	Homme Homme	Coqueluche Coqueluche
parapertussis B. bronchiseptica	+	1-2 jours	68,2-69,5	Porc	Rhinite atrophique
				Chien, chat Animaux de laboratoire	Bordetellose Infections respiratoires
				(Homme)	
B. avium	+	1-2 jours	61,6-62,6	Oiseaux	Rhinotrachéite
B. holmesii	-	ND^{a}	61,5-62,3	Homme	Septicémie
B. hinzii	+	NDª	65-67	Oiseaux Homme	Non pathogène Bactériémie

Tableau 4. Caractéristiques des bactéries du genre Bordetella

^a Non déterminé
^b Kersters et al. 1984, Weyant et al. 1995, Vandamme et al. 1995

I. 3. Culture

La vitesse de croissance et les conditions de culture des bactéries du genre *Bordetella* sont variables suivant les espèces. La culture de *B. pertussis* est la plus lente et la plus délicate. Le milieu solide classique dérive de celui utilisé en 1906 pour isoler *B. pertussis* (Bordet et Gengou, 1906). A base d'infusion de pommes de terre, le milieu de Bordet-Gengou contient 20% de sang de mouton. Sur ce milieu, les colonies de *B. pertussis* apparaissent en 3 à 6 jours. De petite taille, entourées d'une zone d'hémolyse, ces colonies ont un aspect de "gouttes de mercure", brillantes, rondes, au contour régulier et net, à la surface lisse et bombée. La culture liquide de *B. pertussis* s'effectue couramment dans le milieu synthétique de Stainer et Scholte qui contient notamment du glutamate, de la proline, de la cystéine, différents sels et de l'acide nicotinique (Stainer et Scholte, 1971).

I. 4. Hôtes

Toutes les espèces du genre *Bordetella*, exceptées *B. holmesii* et *B. hinzii*, sont des pathogènes respiratoires ayant en commun un tropisme pour les cellules ciliées des voies aériennes. L'homme est l'unique hôte de *B. pertussis* et de *B. parapertussis*. Cette dernière est responsable d'une forme atténuée de la coqueluche (Eldering et Kendrick, 1938). *B. bronchiseptica* infecte un grand nombre de mammifères comme le chien (toux des chenils), le porc (rhinite atrophique), les animaux de laboratoire, et dans de très rares cas l'homme (Goodnow, 1980). *B. avium* est un pathogène exclusivement aviaire responsable de rhinotrachéites chez les dindes (Kersters *et al.*, 1984).

B. holmesii a été isolée à partir d'hémocultures de patients atteints de septicémie et dont certains étaient immunodéprimés (Weyant *et al.*, 1995). *B. hinzii*, une espèce proche de *B. avium*, a été découverte dans le tractus respiratoire de dindes et de poulets mais serait non pathogène pour ces oiseaux. Elle a également été détectée dans le sang d'un malade du SIDA ayant développé une bactériémie et dans un crachat d'un autre patient (Vandamme *et al.*, 1995).

II. La coqueluche

II. 1. Manifestations cliniques

La coqueluche est une maladie très contagieuse qui se transmet par aérosol. Dans la grande majorité des cas, elle touche les nourrissons et les enfants de moins de cinq ans. La maladie évolue en trois phases, après une incubation de 8 jours en moyenne (pour revue, voir Marcon, 1995).

- la **phase catarrhale** commence avec des symptômes semblables à ceux d'une banale infection virale des voies respiratoires supérieures: écoulement nasal, peu ou pas de fièvre, toux légère. Pendant 1 à 2 semaines, l'intensité et la fréquence de la toux augmentent progressivement. Le malade est extrêmement contagieux. C'est aussi la phase où le traitement par des antibiotiques est le plus efficace. L'érythromycine est généralement préconisée.

- la phase paroxystique est marquée par une production abondante de mucus, et des quintes de toux spasmodiques pouvant provoquer des vomissements et se terminer par une inspiration profonde, sonore et sifflante: le "chant du coq". Le nourrisson est souvent victime de crises d'apnée. Pendant la phase paroxystique, qui dure de 1 à 4 semaines, différentes complications peuvent survenir et s'avérer fatales dans les cas les plus graves: infections bactériennes secondaires (pneumonie, otite), encéphalopathies. Une lymphocytose est fréquemment observée. Pendant cette phase, les antibiotiques ont peu d'effet sur l'évolution de la maladie, mais ils sont indispensables pour éliminer complètement les bactéries.

- la **phase de convalescence** peut s'étendre sur plusieurs semaines, voire plusieurs mois. Les quintes de toux persistent, mais deviennent progressivement moins intenses et plus espacées. Suite à la maladie, une immunité vis à vis de la coqueluche s'établit durablement.

II. 2. Epidémiologie

La coqueluche a considérablement régressé depuis les années 1950, grâce à l'existence de vaccins efficaces. Cependant, cette maladie touche encore plus de 50 millions de personnes dans le monde et l'Organisation Mondiale de la Santé a estimé la mortalité à 355 000 décès pour 1995 (Young, 1996). Les pays en voie de développement sont particulièrement atteints, car la vaccination y est insuffisante. Par contre, dans les pays où la vaccination est obligatoire, la coqueluche ne constitue plus un problème de santé publique majeur. Toutefois, une résurgence de la maladie a été observée dans plusieurs pays développés, comme les Etats-Unis, l'Australie, la France, et la Hollande (Hansen, 1994; de Melker et al., 1997). Les causes de ce phénomène, vraisemblablement multiples, ne sont pas encore toutes connues. On invoque généralement le fait que le vaccin ne soit pas efficace à 100%, la réticence de certains parents vis à vis de la vaccination, un affaiblissement de l'immunité protectrice vaccinale chez les adultes dû à l'absence de rappel vaccinal tardif, la contamination des enfants par des porteurs asymptomatiques qui constitueraient un réservoir pour la maladie, une diminution de l'adéquation entre la souche vaccinale et les souches de B. pertussis en circulation (Hansen, 1994; Marcon, 1995; de Melker et al., 1997).

II. 3. Vaccination

La vaccination constitue une arme de choix dans la prévention de la coqueluche. Après la description de *B. pertussis* par Bordet et Gengou en 1906, des vaccins à base de bactéries tuées furent élaborés et combinés avec les anatoxines diphtériques et tétaniques pour donner le vaccin trivalent diphtérie-tétanos-coqueluche (DTP) (pour revue, voir Cherry, 1996). Cependant, les effets secondaires occasionnellement associés à ce vaccin ont favorisé le développement de nouveaux vaccins, dits acellulaires, contenant des antigènes de *B. pertussis* purifiés. Ces nouveaux vaccins en cours d'évaluation, ou déjà utilisés dans certains pays, contiennent la toxine pertussique détoxifiée (par une méthode chimique ou génétique), associée à un ou plusieurs composants supplémentaires: l'hémagglutinine filamenteuse (FHA), les agglutinogènes (fimbriae), ou la pertactine (Ewald, 1996; Redhead, 1995).

III. Pathogénicité de B. pertussis

III. 1. Etapes de l'infection

Suite à son entrée dans l'organisme sous forme d'aérosol, *B. pertussis* colonise le tractus respiratoire depuis sa partie supérieure jusqu'à l'entrée des poumons. La bactérie évite d'être piégée dans le mucus et d'être éliminée par les battements des cellules ciliées de la trachée en s'attachant fermement à l'épithélium par l'intermédiaire de plusieurs adhésines. Ensuite, les bactéries se multiplient et libérent plusieurs toxines responsables d'altérations locales (destruction des cellules ciliées, hypersécrétion de mucus), d'effets systémiques (hyperlymphocytose, hyperglycémie), et d'une inhibition de la réponse immunitaire (figure 6). Pour échapper aux défenses de l'hôte, *B. pertussis* a développé une stratégie de survie à l'intérieur des macrophages alvéolaires.

III. 2. Facteurs de virulence

B. pertussis se distingue particulièrement parmi les bactéries pathogènes à la fois par la diversité de ses facteurs de virulence et la variété de leurs voies de biosynthèse. En effet, elle est capable de produire et de sécréter plusieurs adhésines et plusieurs toxines distinctes (tableau 5). Pour la sécrétion de ces facteurs de virulence, elle fait appel à des systèmes de sécrétion différents. Cette stratégie



Figure 6. Cycle infectieux de B. pertussis. D'après Akerley et Miller, 1996

garantit vraisemblablement l'efficacité de l'infection (pour revue, voir Rappuoli, 1994).

III. 2. 1. Adhésines de B. pertussis

L'adhérence bactérienne constitue une étape précoce dans la colonisation de l'hôte. Sa réussite nécessite souvent la production de plusieurs adhésines (pour revue, voir Finlay et Falkow, 1997). *B. pertussis* produit au moins 6 adhésines, dont la toxine pertussique qui est impliquée à la fois dans l'adhérence et dans l'intoxication de l'hôte. Ces adhésines sont produites à des étapes successives de l'infection et s'attachent à différents types cellulaires.

a) Hémagglutinine filamenteuse (FHA)

La FHA est l'adhésine majeure de *B. pertussis* (pour revue, voir Locht *et al.*, 1993). Ses fonctions et son mécanisme de biogenèse sont détaillés dans le chapitre 3 de cette introduction. En résumé, la FHA est une protéine de 220 kDa dérivant d'un grand précurseur de 367 kDa codé par le gène *fhaB* (Arico *et al.*, 1993; Delisse-Gathoye *et al.*, 1990; Domenighini *et al.*, 1990; Relman *et al.*, 1989). Le précurseur est exporté à travers la membrane cytoplasmique selon un mécanisme encore inconnu, mais qui pourrait être dépendant du système Sec. La FHA est ensuite sécrétée à la surface bactérienne grâce à la protéine accessoire FhaC située dans la membrane externe (Willems *et al.*, 1994).

La FHA possède plusieurs activités d'adhérence. Elle se lie au lactosylcéramide des cellules ciliées (Tuomanen *et al.*, 1988) et des macrophages (Relman, 1990). De plus, la FHA contient un motif Arg-Gly-Asp impliqué dans la liaison à l'intégrine CR3 des macrophages (Relman *et al.*, 1990). Cette interaction permettrait l'internalisation et la survie de *B. pertussis* dans les macrophages (Saukkonen *et al.*, 1991). La FHA reconnaîtrait également les protéoglycanes sulfatés présents dans le mucus, dans la matrice extracellulaire, et à la surface des cellules épithéliales (Hannah *et al.*, 1994; Menozzi *et al.*, 1994). Enfin, la liaison de la FHA au régulateur C4BP du complément a récemment été mise en évidence (Berggard, 1997).

b) Fimbriae

B. pertussis produit des fimbriae de sérotype 2 et de sérotype 3, composés des sous-unités majeures Fim2 et Fim3, respectivement (Robinson *et al.*, 1989). En plus de ces sous-unités majeures, les fimbriae contiennent une sous-unité mineure, l'adhésine FimD (Willems *et al.*, 1993) (figure 7). L'expression de Fim2 et Fim3 est régulée par des mutations dans les promoteurs de *fim2* et de *fim3*, ce qui induit une variation antigénique (Willems *et al.*, 1990). Les fimbriae de *B. pertussis* sont apparentés aux pilis de type I des entérobactéries. Leur assemblage fait donc intervenir une
	B. pertussis	В.	В.	B. avium
		parapertussis	bronchiseptica	
Adhésines		<u> </u>		<u></u>
Hémagglutinine filamenteuse	+	+	+	-
Fimbriae	+	+	+	+
Pertactine	+	+	+	ND^{a}
BrkA	+	+	+	-
TcfA	+	-	-	ND^{a}
Toxines				
Toxine pertussique	+	-	-	-
Adénylate cyclase- hémolysine	+	+	+	-
Cytotoxine trachéale	+	+	+	+
Toxine dermonécrotique	+	+	+	+

Tableau 5. Facteurs de virulence des bactéries du genre Bordetella

^a Non déterminé

D'après Parton, 1996

chaperone périplasmique, FimB, et un placeur de la membrane externe, FimC (Locht *et al.*, 1992; Willems *et al.*, 1992). Les gènes *fimB*, *fimC* et *fimD* sont groupés en opéron, tandis que *fim2* et *fim3* sont dispersés sur le chromosome (Stibitz, 1992) (figure 8). Le gène *fimA* situé en amont de *fimB* représenterait le gène primordial de la sous-unité majeure des fimbriae (Willems *et al.*, 1992). Les gènes *fim2*, *fim3*, et *fimX* en dériveraient par duplication. Chez *B. pertussis*, *fimA* et *fimX* sont silencieux à cause de mutations.

Comme la FHA, les sous-unités majeures des fimbriae sont capables de se lier aux sucres sulfatés présents à la surface des cellules épithéliales (Geuijen *et al.*, 1996). La sous-unité mineure se lie à l'intégrine VLA-5 des macrophages (Hazenbos *et al.*, 1995a). Comme l'attachement de *B. pertussis* par l'intermédiaire de VLA-5 active le récepteur CR3, il a été suggéré que les fimbriae et la FHA pourraient coopérer lors de l'invasion des macrophages alvéolaires par *B. pertussis* (Hazenbos *et al.*, 1995b). L'étude chez la souris de mutants de *B. pertussis* dépourvus de fimbriae ou de FHA suggère que ces adhésines coopèrent également pour la colonisation de la trachée (Kimura *et al.*, 1990; Mooi *et al.*, 1992).

Les trois adhésines suivantes appartiennent à une nouvelle famille de protéines synthétisées sous la forme de grands précurseurs dont le domaine C-terminal fortement conservé est nécessaire pour l'expression de la protéine mature à la surface bactérienne. Leur structure est comparée dans la figure 9.

c) Pertactine

La pertactine, une protéine de la membrane externe de *B. pertussis*, est aussi appelée P.69 en raison de sa taille apparente en SDS-PAGE (Makoff *et al.*, 1990). Son gène de structure *prn* code une protéine de 93 kDa exportée vers le périplasme par un mécanisme vraisemblablement dépendant du système Sec. Ce précurseur subit une maturation protéolytique pour donner la pertactine mature, qui correspond aux 60 kDa N-terminaux du précurseur (Charles *et al.*, 1989, 1994; Makoff *et al.*, 1990). La portion C-terminale de 30 kDa du précurseur reste associée à la membrane externe. Nécessaire pour la sécrétion de la pertactine, elle est homologue aux domaines Cterminaux des précurseurs de plusieurs protéines sécrétées dont SepA chez *Shigella flexneri* (Benjelloun-Touimi *et al.*, 1995) et AIDA-I chez *E. coli* (Suhr *et al.*, 1996). Ces domaines C-terminaux pourraient former dans la membrane externe un tonneau- β permettant la sécrétion de la partie N-terminale des précurseurs, selon un mécanisme analogue à l'autosécrétion décrite pour l'IgA protéase de *N. gonorrhoeae*.

Le rôle exact de la pertactine est encore mal défini. Des études *in vitro* ont montré qu'elle est impliquée dans l'adhérence de *B. pertussis* aux cellules eucaryotes (Leininger *et al.*, 1991, 1992; Roberts *et al.*, 1991; Arico *et al.*, 1993). Cette interaction se ferait, comme dans le cas de la FHA, par l'intermédiaire d'un motif Arg-Gly-Asp, mais d'autres régions de la pertactine pourraient également être nécessaires



Figure 7. Biosynthèse et structure des fimbriae chez B. pertussis. Les sous-unités Fim2, Fim3, et FimD possèdent une séquence-signal et sont exportées à travers la membrane cytoplasmique par le système Sec. Dans le périplasme, les sous-unités s'associent avec la chaperone FimB qui empêche une polymérisation prématurée des sous-unités. FimC est responsable de l'assemblage et de l'ancrage des fimbriae dans la membrane externe. D'après Mooi, 1994



Figure 8. Position des gènes de virulence sur le chromosome de B. pertussis. Le sens de transcription des gènes *bvgS*, *bvgA*, *fhaB*, *fimA*, *fimB*, *fimC*, *fimD*, et *fhaC* est indiqué par des flèches. D'après Stibitz et Garletts, 1992

(Leininger *et al.*, 1991, 1992; Everest *et al.*, 1996). L'influence de la pertactine dans la colonisation du tractus respiratoire a été étudiée chez la souris à l'aide d'une souche de *B. pertussis* dont le gène *prn* est inactivé. De façon intéressante, la capacité de ce mutant à coloniser la trachée et les poumons est identique à celle de la souche sauvage (Roberts *et al.*, 1991). Il est possible que le récepteur de la pertactine soit simplement absent chez la souris, ou que l'absence de la pertactine soit compensée par les autres adhésines de *B. pertussis*.

<u>d) BrkA</u>

Le locus *brk* de *B. pertussis* code 2 protéines, BrkA et BrkB, responsables de la résistance des bactéries au sérum (d'où le nom de Brk pour <u>Bordetella r</u>esistance to <u>k</u>illing), selon un mécanisme qui n'est pas encore clairement défini (Fernandez et Weiss, 1994). Cependant, BrkA présente plusieurs caractéristiques indiquant son rôle possible dans l'adhérence aux cellules eucaryotes. Elle possède en particulier deux motifs Arg-Gly-Asp et deux sites de liaison potentiels aux glycosaminoglycanes sulfatés. Un mutant BrkA⁻ obtenu par insertion du transposon Tn5 *lac* est affecté dans sa capacité à adhérer aux cellules eucaryotes *in vitro* (Ewanowitch *et al.*, 1989; Fernandez et Weiss, 1994) et il est moins virulent que la souche sauvage dans le modèle murin (Weiss et Goodwin, 1989).

L'examen de la structure primaire de BrkA suggère qu'elle dérive d'un précurseur de 103 kDa muni d'un peptide-signal. Ce précurseur comprend un site de clivage protéolytique et un signal de localisation dans la membrane externe également présents dans le précurseur de la pertactine. Le degré d'identité entre BrkA et la pertactine est de 54.5% pour les 300 résidus C-terminaux. La protéine BrkB est dépourvue de peptide-signal; ce serait une protéine de la membrane cytoplasmique dont la fonction n'est pas connue. Les hypothèses proposées par Fernandez et Weiss (1994) sont un rôle possible de BrkB dans la sécrétion de BrkA ou directement dans le mécanisme de résistance à l'attaque du complément.

<u>e) Tcf</u>

Le gène *tcfA*, récemment cloné, code un facteur important pour la colonisation de la trachée chez la souris. Ce facteur a donc été appelé Tcf, pour <u>t</u>racheal <u>c</u>olonization <u>factor</u> (Finn et Stevens, 1995). Comme la pertactine, le Tcf possède un peptide-signal, un motif Arg-Gly-Asp et existe sous deux formes: un précurseur associé aux cellules bactériennes et une forme sécrétée, plus courte. L'extrémité C-terminale du précurseur présente 50% d'identité avec la séquence C-terminale du précurseur de la pertactine.



100 aa

Figure 9. Structures comparées de la pertactine, BrkA et TcfA. Les rectangles gris représentent les séquences-signal, les rectangles blancs les protéines matures, les rectangles rayés les régions C-terminales conservées, et les rectangles noirs les signaux de localisation dans la membrane externe. Les sites de clivage protéolytique, et la position des motifs de liaison aux intégrines (RGD) et des motifs de liaison aux glycosaminoglycanes (SGXG) sont indiqués par les flêches.

III. 2. 2. Toxines de B. pertussis

a) Toxine pertussique

La toxine pertussique (PTX) est une protéine multimérique complexe dont la structure est de type A-B, comme la toxine du choléra (figure 10B). La partie A est composée de la sous-unité catalytique S1, et la partie B des sous-unités S2, S3, deux copies de S4, et S5 (Tamura *et al.*, 1982). Cette structure a été confirmée par la détermination de la structure cristalline de la protéine (Stein *et al.*, 1994). Le pentamère B est responsable de la liaison de la toxine à des récepteurs glycosylés (Saukkonen *et al.*, 1992) et de l'entrée de la sous-unité catalytique dans le cytoplasme des cellules où se trouvent les cibles de S1. S1 est capable de transférer l'ADP-ribose du NAD sur certaines protéines G impliquées dans la transduction des signaux chez les eucaryotes. Cette ADP-ribosylation des protéines G perturbe les fonctions cellulaires normales et se traduit par différents effets toxiques: inhibition de la migration de certaines cellules du système immunitaire, hyperinsulinémie entraînant une hypoglycémie, sensibilité augmentée à l'histamine et à la sérotonine (pour revues, voir Locht et Antoine, 1997; Weiss, 1997).

Les gènes codant les sous-unités de la toxine (gènes *ptx*) et les gènes codant le système de sécrétion de la toxine dans le milieu extracellulaire (gènes *ptl*) sont groupés en opéron (figure 10A). Plusieurs auteurs ont montré que cet opéron est transcrit et régulé grâce au promoteur situé en amont des gènes *ptx* (Ricci *et al.*, 1996; Baker *et al.*, 1995; Kotob *et al.*, 1995). Le système Ptl est décrit plus haut dans la partie Sécrétion de type IV.

b) Adénylate cyclase-hémolysine

L'adénylate cyclase-hémolysine CyaA est une protéine bifonctionnelle. Elle est capable de convertir l'ATP en AMP cyclique (cette activité adénylate cyclase est activée par la calmoduline) et montre une activité hémolytique vis à vis des globules rouges *in vitro*. Ces activités sont portées par les régions N-terminale et C-terminale de CyaA, respectivement (Glaser *et al.*, 1988) (figure 11B). Suite à l'insertion de la partie hémolysine dans la membrane des cellules-cibles (cellules épithéliales et cellules du système immunitaire), la partie adénylate cyclase entre dans le cytoplasme et induit une synthèse considérable d'AMP cyclique ayant pour effet une altération de la réponse oxydative des cellules intoxiquées (Confer et Eaton, 1982; Pearson *et al.*, 1987).

En aval du gène de structure *cyaA*, se trouvent 3 gènes, *cyaB*, *cyaD*, et *cyaE*, impliqués dans la sécrétion de CyaA selon un mécanisme de type I homologue à celui de la sécrétion de l'hémolysine HlyA chez *E. coli* (Glaser *et al.*, 1988) (figure 11A). En amont de *cyaA*, le gène *cyaC* code une protéine nécessaire pour l'activation de CyaA (Barry *et al.*, 1991; Hewlett *et al.*, 1993). Cette activation correspond à l'acylation d'un résidu lysine de CyaA (Hacket *et al.*, 1994).



 S_3 S_2 S_3 S_2 S_3 S_2 S_3 S_2 S_3 S_4 S_5 S_5

Vue transversale

B.

Vue supérieure

Figure 10. La toxine pertussique. A. Organisation génétique. D'après Kotob et Burns, 1997. Les gènes *ptx* codent les sous-unités structurales de la toxine pertussique. Les gènes *ptl* codent les 9 protéines essentielles pour la sécrétion de la toxine. L'opéron *ptx/ptl* est transcrit à partir d'un seul promoteur (P). B. Modèle basé sur la structure tridimensionnelle. En vue supérieure, la sous-unité S1 est omise par souci de clarté. D'après Stein et al., 1994

c) Cytotoxine trachéale

La cytotoxine trachéale (TCT) est un fragment de dégradation du peptidoglycane de la paroi de *B. pertussis* (Cookson *et al.*, 1989a et 1989b) (figure 12). Sa toxicité, spécifique vis à vis des cellules ciliées, serait liée à une induction de la synthèse d'interleukine-1 par l'épithélium, ce qui activerait la production d'oxyde nitrique, lui-même toxique pour de nombreux types cellulaires (Heiss *et al.*, 1993; Heiss *et al.*, 1994).

d) Toxine dermonécrotique

La toxine dermonécrotique (DNT) est aussi appelée HLT (pour <u>h</u>eat-<u>l</u>abile <u>toxin</u>) car elle est inactivée par un chauffage à 56°C (Bordet et Gengou, 1909). Cette protéine d'environ 140 kDa est localisée dans le cytoplasme, par conséquent sa libération nécessiterait une lyse des bactéries ou une machinerie non caractérisée (Cowell *et al.*, 1979).

Le rôle de la DNT dans la pathogénicité de *B. pertussis* reste énigmatique. En effet, des mutants ne produisant pas cette toxine sont aussi virulents que la souche sauvage chez la souris (Weiss et Goodwin, 1989). Pourtant, les effets cytotoxiques de la DNT sont puissants. Elle induit notamment des lésions dermonécrotiques chez différents animaux de laboratoire après injection intradermique, et a un effet léthal à faible dose après injection intraveineuse (Bordet et Gengou, 1909; Livey and Wardlaw, 1984). Sur cellules en culture, la DNT induit un changement morphologique en modifiant la protéine Rho, une petite GTPase qui contrôle les réarrangements du cytosquelette (Horiguchi *et al.*, 1995).

III. 3. Régulation de la virulence par le système BvgA/S

La régulation coordonnée des facteurs de virulence en réponse à des signaux environnementaux est une stratégie souvent utilisée par les bactéries pathogènes (Mekalanos, 1992). Chez les bactéries du genre *Bordetella*, les gènes de virulence ne sont pas exprimés dans certaines conditions: basse température, addition de MgSO₄ ou d'acide nicotinique dans le milieu de culture. C'est la modulation phénotypique (Lacey, 1960). D'autre part, à partir d'une souche virulente de *B. pertussis* on peut obtenir spontanément des mutants avirulents dépourvus de la plupart des facteurs de virulence: c'est la variation de phase (Leslie et Gardner, 1931). La compréhension de ces modifications dans la virulence a beaucoup progressé grâce à la découverte du locus responsable de la modulation phénotypique et de la variation de phase: le locus *bvg*, anciennement appelé *vir* (Weiss et Falkow, 1984, Arico *et al.*, 1989; Monack *et al.*, 1989; Arico *et al.*, 1991; Stibitz *et al.* 1988; Stibitz *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1992).

Le locus *bvg* code les protéines BvgA et BvgS, qui forment un système de régulation à 2 composants (Arico *et al.*, 1989; Stibitz *et al.*, 1989; Stibitz et Yang, 1991).







Figure 11. L'adénylate cyclase-hémolysine. A. Organisation génétique du locus *cya*. B. Structure de la toxine. Le domaine N-terminal (400 résidus) porte l'activité adénylate cyclase. La structure du domaine C-terminal est celle d'une toxine RTX classique: le domaine transmembranaire formerait dans la membrane des cellules eucaryotes un pore permettant la translocation de la partie enzymatique. Ce domaine est aussi responsable de l'activité hémolytique de la protéine. Les séquences répétées riches en glycine et aspartate forment un domaine de liaison du calcium impliqué dans la fixation aux cellules cibles. Le site d'activation par CyaC est une lysine (K963). Le signal de sécrétion se situe à l'extrémité C-terminale de la protéine. D'après Westrop et al., 1997



Figure 12. Structure de la cytotoxine trachéale (TCT). La TCT est une molécule de 921 Da. Sa structure est la suivante: *N*-acétylglucosaminyl-1,6-anhydro-*N*-acétylmuramyl-(L)-alanyl-g-(D)glutamyl-*meso*-diaminopimelyl-(D)-alanine. D'après Luker et al., 1995

BvgA est un régulateur transcriptionnel typique, avec un domaine receveur Nterminal et un motif hélice-tour-hélice C-terminal (Arico *et al.*, 1989; Stibitz et Yang, 1991). Le senseur BvgS, situé dans la membrane cytoplasmique, possède un large domaine périplasmique, connecté par une séquence de liaison à une région cytoplasmique. BvgS se distingue des senseurs d'autres systèmes à 2 composants par la structure de sa région cytoplasmique: celle-ci possède en effet un domaine receveur et un domaine C-terminal, en plus du domaine transmetteur classique qui contient une histidine conservée et un site de liaison à l'ATP (Stibitz et Yang, 1991).

La transduction du signal par le système BvgA/S se fait grâce à une succession de phosphotransferts (figure 13). BvgS s'autophosphoryle sur l'histidine conservée de son domaine transmetteur. Le groupement phosphate est transféré sur le domaine receveur, puis sur le domaine C-terminal de BvgS, et enfin sur BvgA (Uhl et Miller, 1994; Uhl et Miller, 1996a et 1996b). La phosphorylation de BvgA augmente son affinité pour ses cibles et active la transcription (Steffen *et al.*, 1996; Boucher *et al.*, 1994). Le signal s'amplifie grâce à une autoactivation de la transcription du locus *bvgA/S* par BvgA (Roy *et al.*, 1990; Scarlato *et al.*, 1990).

A l'origine, le système BvgA/S a été identifié comme un système d'activation des gènes de virulence ou *vags* (pour <u>vir-activated genes</u>). Par la suite, il est apparu que le système BvgA/S exerce un contrôle négatif sur une autre série de gènes, les *vrgs* (pour <u>vir-repressed genes</u>) (Knapp et Mekalanos, 1988; Beattie *et al.*, 1993). Lorsque BvgA/S est activé (on parle alors de phase Bvg⁺), les *vags* sont exprimés et les *vrgs* sont réprimés. La répression des *vrgs* impliquerait plusieurs facteurs, dont BvgR (Beattie *et al.*, 1993; Merkel et Stibitz, 1995). Chez *B. pertussis*, la fonction des *vrgs* est inconnue. Il est possible qu'ils jouent un rôle dans la pathogénicité, car la persistance de *B. pertussis* dans les poumons et la trachée chez la souris est réduite suite à l'inactivation de l'un des *vrgs*, *vrg-6* (Beattie *et al.*, 1992). Chez *B. bronchiseptica*, la mobilité est contrôlée par le système BvgA/S (Akerley *et al.*, 1992; Akerley *et al.*, 1993). En présence de modulateurs ou de mutations dans *bvgAS* (phase Bvg⁻), les bactéries synthétisent des flagelles et sont mobiles. La phase Bvg⁻ pourrait être importante pour la survie de *B. bronchiseptica* en dehors de ses hôtes, dans des milieux pauvres en nutriments (Cotter *et al.*, 1994).



Figure 13. Modèle de transduction du signal dans le système BvgA/S. En réponse à un signal environnemental, le senseur BvgS, situé dans la membrane cytoplasmique (MC), s'autophosphoryle sur l'histidine 729 (H) de son domaine transmetteur (T). Le groupement phosphate est ensuite transféré sur l'aspartate 1023 (D) du domaine receveur (C) puis sur l'histidine 1172 (H) du domaine C-terminal (C) et enfin sur l'aspartate 54 (D) du régulateur BvgA. BvgA phosphorylé est alors capable de se fixer sur les promoteurs des gènes cibles pour contrôler leur transcription, par l'intermédiaire de son domaine C-terminal qui contient un motif hélice-tour-hélice (HTH). D'après Uhl et Miller, 1994.

I. La FHA, une adhésine multifonctionnelle

L'hémagglutinine filamenteuse (FHA) est une adhésine majeure de *B. pertussis* (pour revue, voir Locht *et al.*, 1993). Les mécanismes d'interaction de la FHA avec les cellules eucaryotes sont complexes. En effet, cette grande protéine de 220 kDa possède plusieurs activités d'adhérence localisées dans des régions distinctes, permettant à la bactérie de s'attacher à différents types cellulaires (tableau 6).

I. 1. Activités d'adhérence de la FHA

a) Liaison aux sucres sulfatés

Les glycosaminoglycanes (GAGs) sont de longs polysaccharides composés d'unités disaccharidiques répétées. Les sucres composant ces structures sont généralement sulfatés. Les glycosaminoglycanes sulfatés sont particulièrement abondants dans la matrice extracellulaire des tissus, sous la forme de protéoglycanes, c'est à dire de protéines sur lesquelles sont attachées de façon covalente de nombreuses chaînes de glycosaminoglycanes (pour revue, voir Kjellen et Lindahl, 1991). Les protéoglycanes sulfatés, et notamment les protéoglycanes à héparane sulfate, sont également présents à la surface de différents types cellulaires (Yanagishita et Hascall, 1992). L'utilisation de protéoglycanes à héparane sulfate comme récepteurs a été décrite pour plusieurs pathogènes tels que la bactérie à Gram positif *Listeria monocytogenes* (Alvarez-Dominguez *et al.*, 1997), la bactérie à Gram négatif *Borrelia burgdorferi* (Isaacs, 1994), le virus de l'herpès (Shieh *et al.*, 1992), ou le parasite *Trypanosoma cruzi* (Ortega-Barria et Pereira, 1991).

Dans le cas de *B. pertussis*, la reconnaissance des sucres sulfatés par l'intermédiaire de la FHA a pu être montrée par différentes approches. Par exemple, l'agglutination des érythrocytes par la FHA est inhibée par des sucres sulfatés tels que l'héparine (Menozzi *et al.*, 1994). L'interaction entre la FHA et l'héparine est d'ailleurs utilisée pour purifier la FHA par chromatographie d'affinité sur colonne d'héparine-Sépharose (Menozzi *et al.*, 1991). De même, les sucres sulfatés inhibent l'adhérence de *B. pertussis* aux cellules épithéliales (Brennan *et al.*, 1991; Menozzi *et et al.*, 1991).

Position dans la FHA	Récepteur	Cible	Fonction
442-863	Sucres sulfatés	Mucus, cellules épithéliales, matrice extracellulaire	Attachement
1097-1099	Intégrine CR3	Macrophages	Invasion
1141-1279	Lactosylcéramides	Macrophages, cellules épithéliales	Attachement
Indéterminée	Régulateur C4BP du complément		Protection contre le complément

.

Tableau 6. Activités d'adhérence de la FHA

al., 1994). Ceci indique que des glycoconjugués contenant des sucres sulfatés constituent des récepteurs pour *B. pertussis* à la surface des cellules. Par la suite, de tels glycoconjugués ont été identifiés. Ce sont des glycolipides sulfatés (Brennan *et al.*, 1991; Hannah *et al.*, 1994) et des protéoglycanes sulfatés des cellules épithéliales (Hannah *et al.*, 1994). Le domaine de liaison à l'héparine se situe dans la région N-terminale de la FHA, entre les résidus 442 et 863 (Hannah *et al.*, 1994).

Ces propriétés de liaison aux sucres sulfatés jouent probablement un rôle important dans l'adhérence de *B. pertussis* au mucus respiratoire et aux cellules épithéliales, ainsi qu'à la matrice extracellulaire après la destruction de l'épithélium par les toxines.

b) Liaison au lactosylcéramide des cellules ciliées et des macrophages

La FHA reconnaît des glycoconjugués contenant du galactose, ce qui lui permet de se lier au lactosylcéramide, un glycolipide contenant du lactose présent à la surface des cellules ciliées (Tuomanen *et al.*, 1988) et des macrophages (Relman *et al.*, 1990). Cette activité de type lectine est conférée à la FHA par un domaine de reconnaissance des sucres (CRD, pour "carbohydrate recognition domain") situé entre les résidus 1141 et 1279 (Prasad *et al.*, 1993). Un anticorps monoclonal dirigé contre cette région est capable d'inhiber l'adhérence de *B. pertussis* aux cellules ciliées *in vitro*. Pour les auteurs de ces travaux, le CRD de la FHA pourrait constituer un bon candidat pour la confection d'un vaccin acellulaire qui inhiberait la colonisation de l'épithélium cilié par *B. pertussis*.

c) Liaison à l'intégrine CR3 et entrée de *B. pertussis* dans les macrophages

La FHA possède un motif RGD (Arg-Gly-Asp), situé en position 1097-1099. Dans certains mécanismes d'adhérence cellulaire, le motif RGD d'une protéine interagit avec un récepteur de la famille des intégrines (D'Souza *et al.*, 1991). La séquence RGD de la FHA est impliquée dans la liaison à un récepteur des macrophages, l'intégrine CR3 (Relman *et al.*, 1990). Cette liaison est à la base de l'entrée de *B. pertussis* dans les macrophages, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Saukkonen *et al.*, 1991). L'entrée des pathogènes dans les cellules eucaryotes fait souvent intervenir des intégrines. Ceci est particulièrement vrai pour les parasites intracellulaires des macrophages, tels que les leishmanies (Russell et Wright, 1988).

Pour augmenter l'efficacité de son entrée par phagocytose dans les macrophages, il semble que *B. pertussis* utilise à son profit des mécanismes d'activation du récepteur CR3. La FHA se lierait *via* son motif RGD au complexe LRI/IAP (pour '<u>l</u>eukocyte-<u>r</u>esponse-<u>i</u>ntegrine/<u>i</u>ntegrin-<u>a</u>ssociated-<u>p</u>rotein''). Ce complexe, impliqué dans la transduction de signaux chez les monocytes, est capable d'activer le CR3 en réponse à différents signaux. *B. pertussis* utilise ainsi une voie de signalisation propre à la cellule pour augmenter sa liaison au CR3 (Ishibashi *et al.*, 1994).

B. pertussis bénéficierait en outre de la coopération des fimbriae et de la toxine pertussique avec la FHA. En effet, la sous-unité fimbriale FimD est capable d'interagir avec l'intégrine VLA-5 des monocytes. VLA-5 active alors le récepteur CR3, ce qui augmente la liaison de *B. pertussis* à la cellule par l'intermédiaire de la FHA (Hazenbos *et al.*, 1995b). L'oligomère B de la toxine pertussique active également l'intégrine CR3, en se liant à un récepteur glycosylé qui n'est pas encore identifié (Van't Wout *et al.*, 1992).

In vitro, B. pertussis est capable d'entrer dans des cellules épithéliales telles que les cellules Hela (Ewanowich *et al.,* 1989; Lee *et al.,* 1990). Ce processus d'invasion, indépendant de la séquence RGD de la FHA, implique la séquence RGD de la pertactine (Leininger *et al.,* 1992). Toutefois, la FHA contribuerait à un attachement efficace des bactéries avant leur entrée dans les cellules Hela grâce à ses activités d'adhérence vis à vis des sucres sulfatés et du lactosylcéramide. Cependant, l'entrée et la survie de *B. pertussis* dans les cellules épithéliales *in vivo* demeurent hypothétiques.

d) Liaison au régulateur C4BP du complément

La découverte récente de cette activité de liaison de *B. pertussis* au régulateur C4BP par l'intermédiaire de la FHA est encore peu documentée (Berggard *et al.*, 1997). La protéine plasmatique C4BP (pour "C4b-binding protein") fait partie des protéines régulatrices qui contrôlent l'activation du complément. Il faut préciser que les composants et les régulateurs du complément, bien que principalement plasmatiques, peuvent être exsudés à la surface de la muqueuse respiratoire en réponse à des signaux inflammatoires (Greiff *et al.*, 1993). D'autres exemples de liaison d'un microorganisme à un régulateur du complément sont connus. En particulier, le pathogène respiratoire *Streptococcus pyogenes* se lie également au régulateur C4BP (Thern *et al.*, 1995). Comme la fonction de ce régulateur est d'inhiber l'activation de la voie classique du complément, il a été proposé que *B. pertussis* et *S. pyogenes* utilisent le C4BP pour se protéger contre l'attaque du système du complément.

I. 2. Autoagglutination, piratage d'adhésine et mimétisme

B. pertussis se développe sous forme de petits aggrégats dans les poumons de souris infectées. La formation d'aggrégats est également observée lorsque *B. pertussis* est cultivée en milieu liquide. Ce phénomène d'autoagglutination impliquerait des interactions hydrophobes FHA-FHA et pourrait servir à la propagation de *B. pertussis* dans le tractus respiratoire. Des molécules de FHA sécrétée se fixeraient sur les cellules épithéliales voisines du site initial de l'infection, et serviraient de récepteurs en interagissant avec la FHA associée à la surface des bactéries (Menozzi *et al.*, 1994).

Le "piratage d'adhésine" fait référence à l'utilisation de la FHA par d'autres pathogènes, telles que *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, et *Haemophilus influenzae*, pour adhérer aux cellules ciliées du tractus respiratoire (Tuomanen, 1986). La forme sécrétée de la FHA peut en effet s'associer à la surface d'autres bactéries et accroître leur capacité à adhérer à l'épithélium respiratoire de l'hôte. Ceci expliquerait la fréquence des surinfections bactériennes chez les malades atteints de coqueluche.

Enfin, la notion de mimétisme est liée à la reconnaissance du récepteur CR3 par la FHA, qui pourrait donc imiter certaines propriétés des ligands naturels du CR3. Parmi ceux-ci, des molécules situées à la surface des cellules endothéliales sont importantes pour la transmigration des leucocytes à travers les barrières endothéliales. Or, certains anticorps monoclonaux anti-FHA présentent une réaction croisée avec l'endothélium vasculaire cérébral. Ils sont capables de bloquer le recrutement des leucocytes vers le liquide cérébrospinal dans un modèle de méningite, et d'augmenter la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (Tuomanen *et al.*, 1993). Ces observations suggèrent que la FHA présente des similarités de structure et de fonction avec des protéines endothéliales qui interagissent avec les lymphocytes. Ce mimétisme de la FHA avec des ligands naturels du CR3 pourrait avoir deux types de conséquences lors de l'infection par *B. pertussis*. Elle pourrait induire une immunotolérance, ou au contraire une réaction auto-immunitaire qui affaiblirait l'hôte. Cependant, ces hypothèses très spéculatives restent à démontrer expérimentalement.

I. 3. Importance de la FHA dans la pathogénicité

a) Comportement des mutants FHA chez l'animal

L'importance de la FHA dans la pathogénicité des infections à *B. pertussis* a été évaluée en utilisant différents modèles animaux. Chez la souris, des mutants FHA apparaissent aussi virulents qu'une souche sauvage lorsque l'on mesure la DL50 après une épreuve d'infection intranasale (Weiss *et al.*, 1984; Weiss et Goodwin, 1989). La persistance de ces mutants dans les poumons n'est pas affectée. Cependant, leur survie dans la trachée et le nasopharynx est diminuée (Kimura *et al.*, 1990; Mooi *et al.*, 1992). Ces résultats suggèrent que la FHA n'est pas essentielle pour la colonisation des poumons, mais qu'elle est importante pour l'étape initiale d'adhérence dans la trachée. La colonisation des poumons pourrait faire appel aux autres facteurs d'adhérence qui compenseraient l'absence de la FHA.

Chez le lapin, *B. pertussis* se répartit dans les poumons en 2 populations égales: une population extracellulaire et une population intracellulaire résidant dans les macrophages alvéolaires. Comme décrit plus haut, la perte de l'interaction FHA/CR3 diminue l'accumulation de bactéries viables dans les macrophages (Saukkonen, 1991). L'internalisation dans les macrophages alvéolaires permet vraisemblablement à *B. pertussis* d'échapper au système immunitaire. Ce réservoir intracellulaire pourrait aussi être à l'origine de l'infection de nouveaux hôtes.

b) Intérêt vaccinal de la FHA

En raison de son rôle dans la pathogenèse de *B. pertussis* et de sa capacité à susciter la production d'anticorps protecteurs chez l'animal (Kimura *et al.*, 1990), la FHA est incluse dans la plupart des vaccins acellulaires anti-coquelucheux, en plus de la toxine pertussique inactivée et éventuellement d'autres antigènes. Depuis 1981, des vaccins efficaces composés de toxine pertussique et de FHA purifiées sont disponibles au Japon (Sato *et al.*, 1984; Kimura et Kuno Sakai, 1990). Dans les essais cliniques récents réalisés en Italie et en Suède, tous les vaccins acellulaires testés se sont révélés efficaces, mais à des niveaux différents suivant leur composition, les protocoles d'immunisation et la définition des cas de coqueluche (de 58 à 86 % d'efficacité). Un point essentiel est qu'ils ont provoqué moins de réactions secondaires que les vaccins cellulaires (Greco *et al.*, 1996; Gustafsson *et al.*, 1996). D'autres essais, en Allemagne et au Sénégal, vont dans le même sens (Corbel et Xing, 1997; Fine, 1997).

Actuellement, les vaccins anti-coquelucheux sont administrés par voie parentérale et induisent principalement une immunité humorale. Or, une stratégie vaccinale plus efficace contre la coqueluche devrait éventuellement aussi viser l'induction d'une immunité mucosale au niveau du tractus respiratoire, afin de neutraliser *B. pertussis* dès son entrée dans l'organisme.

La FHA est un bon candidat pour la confection d'un vaccin mucosal contre la coqueluche. En effet, elle induit une immunité mucosale forte et de longue durée lors d'une infection naturelle par *B. pertussis* (Thomas *et al.*, 1989; Long *et al.*, 1990) ou lors d'une infection expérimentale chez la souris (Amsbaugh *et al.*, 1993). Plusieurs études ont montré qu'une administration intranasale de la FHA induit chez la souris une importante production d'anticorps IgG et IgA anti-FHA dans les poumons et une protection lors d'une épreuve ultérieure d'infection intranasale par *B. pertussis* (Cahill *et al.*, 1993; Roberts *et al.*, 1993; Shahin *et al.*, 1992; Shahin *et al.*, 1995). La possibilité d'une vaccination orale a également été testée chez la souris: l'administration de liposomes recouverts de FHA, d'une souche de *S. typhimurium* atténuée exprimant la FHA, ou d'une souche d'*E. coli* invasive exprimant la FHA, suscite la production dans les poumons d'IgG et d'IgA anti-FHA (Guzman *et al.*, 1991; Guzman *et al.*, 1993).

Les propriétés immunologiques de la FHA et son exportation efficace ont encouragé le développement de souches de *B. pertussis* exprimant des antigènes hétérologues en fusion avec la FHA dans le but de créer des vaccins vivants mucosaux administrables par voie nasale. Une telle souche, exprimant une fusion génétique de la FHA avec un antigène de *Schistosoma mansoni*, a donné des résultats prometteurs en terme de protection contre la schistosomiase chez la souris (Mielcarek *et al.*, 1998).

II. Biogenèse et sécrétion de la FHA

La biogenèse de la FHA comporte plusieurs étapes dont certaines sont encore mal connues. Le gène de structure de la FHA, *fhaB*, a été cloné et séquencé (Relman *et al.*, 1989; Domenighini *et al.*, 1990; Delisse-Gathoye *et al.*, 1990). Il s'étend sur plus de 10 kb et code un grand précurseur de 367 kDa, FhaB, dont le tiers C-terminal est clivé pour donner la FHA mature de 220 kDa (Arico *et al.*, 1993). Malgré sa grande taille, la FHA est sécrétée efficacement à la surface et dans le milieu de culture de *B. pertussis*, par un mécanisme faisant intervenir une protéine auxiliaire de la membrane externe, FhaC.

II. 1. Structure primaire du précurseur FhaB

a) Région N-terminale de FhaB (résidus 1 à 205)

La région N-terminale de FhaB présente plusieurs caractéristiques intéressantes (figure 14). Au début de notre travail, les limites de la séquence-signal n'avaient pas encore été établies expérimentalement. Les seules données disponibles étaient basées sur l'analyse de la séquence et prédisaient une séquence-signal particulièrement longue (71 résidus), avec une extension N-terminale de 22 résidus précédant une séquence avec les caractéristiques d'un peptide-signal classique. Une autre particularité est la présence d'une modification covalente du résidu N-terminal de la FHA mature. Enfin, la partie N-terminale de la FHA mature partage avec une famille d'hémolysines bactériennes un domaine très conservé long d'une centaine de résidus, la "boîte de sécrétion" (résidus 91 à 205). Ces différents points seront détaillés plus loin.

b) Partie centrale de FhaB (du résidu 206 au site de maturation C-terminale)

La partie centrale de FhaB possède plusieurs régions remarquables (figure 14). Une région répétée, appelée R1 (Makhov *et al.*, 1994) s'étend des résidus 344 à 1065. Elle contient 38 répétitions imparfaites d'une séquence de 19 résidus. Une seconde région répétée, R2 (résidus 1438 à 1688), contient 13 répétitions d'une autre séquence de 19 résidus. En position 1069-1073, une séquence riche en arginine (RRARR), qui s'apparente au site de clivage protéolytique par la trypsine, expliquerait la formation de certains produits de dégradation de la FHA détectés par SDS-PAGE (Domenighini *et al.*, 1990). Le rôle du motif RGD (position 1097-1099) dans la liaison au récepteur CR3 des macrophages a été décrit plus haut. Le site de maturation de FhaB se situerait environ à 1000 résidus en aval du motif RGD, mais le site exact et le mode de clivage sont inconnus.



Figure 14. Représentation schématique de la structure de FhaB. R1 et R2: régions répétées, RRARR: région riche en arginine, RGD: séquence arginine-glycine-aspartate, (PK)5: répétition proline-lysine

200 aa

<u>c) Région C-terminale de FhaB (du site de maturation C-terminale au résidu</u> 3591)

La région C-terminale de FhaB n'est pas présente dans la FHA mature (figure 14). Elle possède un motif RGD en position 2600. Les 350 derniers résidus sont particulièrement riches en proline, avec notamment un segment (PK)₅.

II. 2. Structure tertiaire de la FHA

Un modèle de la FHA basé sur des images de microscopie électronique à haute résolution, des analyses de la séquence primaire, et des mesures de dichroïsme circulaire, décrit une molécule filamenteuse monomérique de 50 nm de long repliée en épingle à cheveux (Makhov *et al.*, 1994). Sa forme serait celle d'un bâtonnet de 4 nm de large, surmonté d'une tête globulaire formée par les extrémités N- et C-terminales de la protéine (figure 15). Les régions répétées R1 et R2 auraient une structure en feuillets β amphipathiques hyperallongés, accolés par leur face hydrophobe pour former le bâtonnet. Dans ces feuillets, les motifs répétés de 19 résidus adopteraient une structure de courts brins β reliés par des coudes β . Le motif RGD se trouverait à la pointe de la molécule.

II. 3. Régulation de l'expression de la FHA

Les gènes *bvg*, *fha*, et *fim* sont groupés sur le chromosome et constituent 3 unités transcriptionnelles distinctes (figure 16). Comme la plupart des gènes de virulence de *B. pertussis*, *fhaB* est régulé de façon positive par le locus *bvg*. Le transfert des gènes *bvg* et *fhaB* chez *E. coli* a permis de montrer que le promoteur de *fhaB* est directement activé par le système BvgA/S codé par les gènes *bvg* (Miller *et al.*, 1989; Roy *et al.*, 1989). Le mécanisme d'activation implique la phosphorylation de BvgA et sa fixation sur des séquences cibles. En effet, des expériences de retard sur gel et de protection à la DNase I ont montré que BvgA est capable de se lier à la région promotrice de *fhaB* (Roy et Falkow, 1991; Boucher *et al.*, 1994). De plus, la phosphorylation de BvgA stimule considérablement la transcription de *fhaB in vitro* (Steffen *et al.*, 1996). Cette stimulation pourrait résulter d'une augmentation d'affinité pour le promoteur (Boucher *et al.*, 1994), mais BvgA phosphorylé pourrait aussi activer la transcription en positionnant correctement l'ARN polymérase (Boucher *et al.*, 1997).

Après un changement de température de 22 à 37°C, les gènes régulés par *bvg* sont activés séquentiellement (Scarlato *et al.*, 1991). Les gènes *fhaB* et *fim* sont activés en quelques minutes, tandis que les gènes codant pour la toxine pertussique et l'adénylate cyclase sont transcrits au bout de plusieurs heures. L'activation précoce



Figure 15. Modèle de structure de la FHA. D'après Makhov et al., 1994. Les régions R1 et R2 contiennent des répétitions imparfaites de séquences de 19 résidus.Le motif RGD est impliqué dans la liaison au récepteur CR3 des macrophages. Nt et Ct: extrémités Nterminale et C-terminale.

Partie globulaire



Figure 16. Organisation du locus *bvg/fha/fim*. Les flèches indiquent le sens et le site d'initiation de la transcription des différents gènes.

des gènes *fhaB* et *fim* renforce l'idée d'un rôle de la FHA et des fimbriae dans les étapes initiales de l'infection et d'une coopération possible entre ces 2 adhésines.

II. 4. Sécrétion de la FHA

a) Séquence-signal et transport à travers la membrane cytoplasmique

La région 5' du gène *fhaB* contient 3 codons ATG en phase susceptibles de constituer le codon d'initiation de la traduction, mais aucun d'eux n'est précédé par une séquence consensus de Shine-Dalgarno (AGGAGG), contrairement à ce qui est observé pour d'autres gènes de *B. pertussis*, comme celui de la porine (Li *et al.*, 1991) ou ceux des sous-unités de la toxine pertussique (Locht et Keith, 1986).

Si l'on considère le 1er ATG comme étant le codon initiateur, le précurseur de la FHA serait synthétisé avec une séquence-signal non orthodoxe (figure 17). Longue de 71 résidus, elle contient les 3 cystéines que compte FhaB et se décompose en 2 parties. La première est homologue à l'extrémité N-terminale des précurseurs d'autres protéines bactériennes. Cette séquence a été baptisée "extension Nterminale" (Benjelloun-Touimi et al., 1995). On connaît actuellement 7 protéines sécrétées possédant à leur extrémité une extension N-terminale précédant la séquence-signal (figure 18). SepA est une protéine sécrétée par Shigella flexneri et impliquée dans la virulence (Benjelloun-Touimi et al., 1995). L'hémagglutinine Tsh est produite par une souche d'E. coli pathogène aviaire (Provence et Curtiss, 1994). L'adhésine AIDA-I est responsable du phénotype d'adhésion diffuse chez certaines souches d'*E. coli* entéropathogéniques du groupe DAEC (pour "<u>d</u>iffusely <u>a</u>dhering <u>E</u>. coli") (Benz et Schmidt, 1992). HMW1A, HMW2A, et Hia sont des adhésines de Haemophilus influenzae non-typable (Barenkamp et Leininger, 1992; Barenkamp et St. Geme, 1996). Hsf est une protéine homologue à Hia mise en évidence chez H. *influenzae* de type b (St. Geme *et al.*, 1996). Enfin, EspC est une protéine sécrétée par les E. coli du groupe EPEC (pour "enteropathogenic <u>E</u>. coli") (Stein et al., 1996). La séquence de l'extension N-terminale est fortement conservée parmi toutes ces protéines, mais sa fonction n'est pas connue.

L'extension N-terminale de la FHA est suivie d'une séquence possédant les caractéristiques d'un peptide-signal. Ceci suggère que la FHA serait transportée à travers la membrane cytoplasmique par le système Sec. On distingue une région chargée positivement (résidus 33 à 43), un long segment hydrophobe (résidus 44 à 65), et un site de clivage après l'alanine 71. Ce site de clivage remplit la règle (-3, -1) caractéristique des séquences-signal clivées par la signal-peptidase LepB (von Heijne, 1984). Cependant, le clivage des 71 résidus N-terminaux du précurseur de la FHA reste hypothétique, car la FHA mature est réfractaire au séquençage N-terminal (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990; Domenighini *et al.*, 1990). Ceci indique que le premier résidu de la FHA mature, encore non identifié, est bloqué par une modification post-traductionnelle.





Figure 17. Séquence N-terminale du précurseur de la FHA. Les résidus de l'extension Nterminale sont en caractères gras. Les signes (+) et (-) symbolisent les résidus chargés positivement et négativement, respectivement. La région hydrophobe est entourée d'un rectangle. La flèche indique le site de clivage.

<u>b) Sécrétion à travers la membrane externe: la protéine auxiliaire FhaC et le domaine de sécrétion de la FHA</u>

En aval du gène *fhaB* se trouvent 4 gènes formant un opéron polycistronique (figure 16). Les gènes *fimB*, *fimC*, et *fimD* sont impliqués dans la biogenèse des fimbriae (Willems *et al.*, 1992; Locht *et al.*, 1992). Le gène *fhaC* code la protéine auxiliaire FhaC essentielle pour la sécrétion de la FHA (Willems *et al.*, 1994). Comme *fhaB*, cet opéron est régulé positivement par le système BvgA/S. Un couplage traductionnel de *fimC*, *fimD* et *fhaC* a été proposé (Willems *et al.*, 1994).

FhaC est homologue aux protéines ShIB de Serratia marcescens et HpmB de Proteus mirabilis (Willems et al., 1994). Ces deux protéines sont situées dans la membrane externe, et impliquées dans la sécrétion et l'activation des hémolysines ShlA et HpmA, respectivement (Poole et al., 1988; Uphoff et Welch, 1990). Le gène *fhaC* a été inactivé dans *B. pertussis* par insertion d'un gène de résistance à la kanamycine (Willems et al., 1994). Dans cette souche, la sécrétion de la FHA est abolie mais la FHA n'est pas détectée dans les extraits bactériens, suggérant une dégradation protéolytique intracellulaire de la FHA lorsqu'elle n'est pas sécrétée. Contrairement à la FHA, ShlA s'accumule dans l'espace périplasmique en absence de ShlB, sous une forme inactive incapable de lyser les érythrocytes, ShlA* (Schiebel et al., 1989). ShlB est donc nécessaire pour sécréter ShlA et pour convertir ShlA* en ShlA active. La même observation a été faite pour HpmA lorsque HpmB n'est pas exprimé (Uphoff et Welch, 1990). La nature moléculaire de l'activation de ShIA par ShIB a récemment été découverte. Il s'agit de la liaison non-covalente à ShlA de plusieurs molécules de phosphatidyléthanolamine (PE), le phospholipide majoritaire dans la membrane externe (Hertle, 1997).

La taille prédite des protéines FhaC, ShlB et HpmB est d'environ 60 kDa. Elles sont synthétisées avec une séquence-signal putative, indiquant qu'il s'agit de protéines exportées. D'autre part, leur résidu C-terminal est une phénylalanine, une caractéristique des protéines de membrane externe (Struyve *et al.*, 1991). Les programmes de prédiction de structure spécifiques des protéines de membrane externe suggèrent la présence dans FhaC de 16 à 20 brins β amphipathiques transmembranaires, mais sa topologie ainsi que son état d'oligomérisation restent à étudier.

La FHA, ShlA, et HpmA partagent une région d'homologie N-terminale longue d'une centaine de résidus (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990). L'homologie entre la FHA et HpmA est à souligner car le contenu en G+C de *B. pertussis* (67%), s'il est proche de celui de *S. marcescens* (65%), est très différent de celui de *P. mirabilis* (38%). Sur cette région conservée de 115 résidus, les identités de séquence en acides aminés de 48% entre la FHA et ShlA et de 47% entre la FHA et HpmA, sont donc hautement significatives.

Cette région d'homologie, que nous appellerons "boîte de sécrétion", est essentielle pour la sécrétion de la FHA. En effet, la délétion de la séquence

SepA M N K I Y Y L K Y C H I T K S L I A V S E L A R Tsh M N R I Y S L R Y S A V A R G F I A V S E F A R AIDA-I M N K A Y S I I W S H S R Q A W I V A S E L A R Hia **M N** K I F N V I W N V V T Q T W V V V **S E** L T R Hsf **M N** K I F N V I W N V M T Q T W V V V **S E** L T R **M N** K I Y A L K Y C H A T G G L I A V **S E** L A S EspC FHA M NTNLYR[`]LVFSHVRGMLVPV**SE**HCT HMW1A M N K I Y R L K F S K R L N A L V A V S E L A R HMW2A M N K I Y R L K F S K R L N A L V A V S E L A R Consensus **М N** К I Y - L - - S - - - - - V A V **S E** L A R

Figure 18. Alignement des extensions N-terminales de SepA, Tsh, AIDA-I, Hia, Hsf, EspC, FHA, HMW1A, et HMW2A. Les acides aminés invariants sont en caractères gras. Le consensus correspond aux acides aminés présents dans au moins 5 des 9 protéines.

Organisme	Protéine auxiliaire	Protéine sécrétée	Motifs	conservés
		<u>Hémolysines</u>		
Serratia marcescens	ShlB	ShIA	ANPNL	ANPNGI
Proteus mirabilis	HpmB	HpmA	ANSNL	SNPNGI
Haemophilus ducreyi	HhdB	HhdA	ANPHL	VNPNGM
Edwardsiella tarda	EthB	EthA	ANPNL	ANPNGI
		Adhésines		
Bordetella pertussis	FhaC	FHA	KNPNL	ANPNGI
Haemophilus influenzae	HMW1B	HMW1A		INPNGI
Haemophilus influenzae	HMW2B	HMW2A		INPNGI
		<u>Fixation de</u> <u>l'hème</u>		
Haemophilus influenzae	HxuB	HxuA		ANPNGV

Tableau 7. Famille des protéines sécrétées par des homologues de FhaC

correspondante dans le gène *fhaB* abolit la sécrétion de la FHA dans le surnageant de culture (Willems *et al.*, 1994). La quantité de FHA associée aux extraits cellulaires est alors très faible, tout comme dans la souche FhaC⁻. D'autre part, un dérivé N-terminal de la FHA possédant toujours la boîte de sécrétion est efficacement sécrété chez *B. pertussis* (Renauld-Mongénie *et al.*, 1996). La boîte de sécrétion contient en particulier des motifs AN(P/S)NL et NPNGI. Dans le cas de ShlA, les asparagines situées au début de ces motifs (N69 et N109) sont cruciales pour la sécrétion de l'activation de ShlA par ShlB (Schönherr *et al.*, 1993). De plus, le signal de sécrétion de ShlA. Sur la base de tous ces résultats, il a été proposé que le domaine N-terminal conservé de la FHA et de ShlA interagissent au cours de la sécrétion avec les protéines auxiliaires FhaC et ShlB, respectivement.

Par la suite, d'autres protéines sécrétées par une protéine auxiliaire homologue à FhaC ont été découvertes (tableau 7). L'hémolysine HhdA de *Haemophilus ducreyi* (Palmer et Munson, 1995) et l'hémolysine EthA d'*Edwardsiella tarda* (Hirono *et al.*, 1997) sont homologues à ShlA et HpmA. Les adhésines HMWIA et HMW2A de *H. influenzae* non-typable contiennent un motif NPNGI, mais les similarités de séquence avec la famille des hémolysines sont restreintes (Barenkamp et Leininger, 1992). HMW1A et HMW2A présentent la particularité d'être reconnues par un anticorps monoclonal dirigé contre la FHA. Enfin, HxuA est une protéine nécessaire à l'utilisation de l'hème par *H. influenzae* type b et *H. influenzae* nontypable. Elle possède un motif NPNG (Cope *et al.*, 1994).

c) Importance du domaine C-terminal du précurseur FhaB

Plusieurs fonctions possibles ont été proposées pour le domaine C-terminal clivé du précurseur FhaB. D'une part, sa région riche en prolines pourrait jouer un rôle dans l'ancrage de FhaB à la surface bactérienne (Domenighini et al., 1990). D'autre part, ce domaine semble être important pour la sécrétion. Des délétions à partir de l'extrémité 3' du gène *fhaB* ont montré qu'une grande partie du domaine Cterminal du précurseur FhaB est nécessaire pour la sécrétion de la FHA mature (220 kDa) (Renauld-Mongénie et al., 1996a). Par contre, il n'est pas nécessaire pour la sécrétion par FhaC de dérivés N-terminaux plus courts tels que la Fha44 (environ 80 kDa) ou la Fha412 (environ 41 kDa). Une hypothèse est que le domaine C-terminal de FhaB pourrait exercer une activité de chaperone intramoléculaire. Elle empêcherait la FHA d'acquérir dans le périplasme sa structure en épingle à cheveux, ce qui permettrait une interaction efficace entre le domaine de sécrétion N-terminal et FhaC. En absence de la chaperone, la FHA se replierait prématurément et son domaine de sécrétion serait masqué. Par contre, la Fha44 ne présente probablement pas la même structure que la FHA et son domaine de sécrétion pourrait librement interagir avec FhaC sans faire appel à la chaperone. Cette hypothèse est compatible avec des études d'antigénicité montrant que des anticorps dirigés contre la Fha44 réagissent

faiblement avec la FHA (Renauld-Mongénie *et al.,* 1996a). Les épitopes reconnus dans la Fha44 seraient donc masqués dans la FHA.

Objectifs du travail

B. pertussis possède plusieurs systèmes différents pour sécréter ses facteurs de virulence. L'adénylate cyclase-hémolysine appartient à la famille des protéines sécrétées par le mécanisme de type I décrit pour l'hémolysine HlyA de *E. coli*. Deux voies du système de type II sont représentées: celle de la chaperone et du placeur pour l'assemblage des fimbriae, et la voie d'autosécrétion pour la pertactine, le facteur de colonisation trachéale (Tcf) et peut-être BrkA. La toxine pertussique est libérée dans le milieu par un mécanisme de type IV. Enfin, un système de sécrétion de type III a récemment été découvert chez *B. bronchiseptica*, mais les protéines qui l'utilisent sont encore inconnues.

L'hémagglutinine filamenteuse (FHA) de *B. pertussis* est sécrétée de façon très efficace, selon un mécanisme encore mal défini mais distinct de ceux décrits cidessus. Le système de sécrétion de la FHA est remarquable à plusieurs égards. Tout d'abord, en dépit de sa taille élevée, la FHA est sécrétée dans le milieu extracellulaire en grande quantité (plusieurs dizaines de milligrammes par litre). Il s'agit de la protéine extracellulaire majeure de *B. pertussis*. Au cours de sa sécrétion, la FHA subit diverses maturations protéolytiques et une modification N-terminale covalente. Une seule protéine auxiliaire spécifique, FhaC, a pu être mise en évidence. Elle est similaire à des protéines de membrane externe nécessaires pour la sécrétion d'hémolysines et d'adhésines chez d'autres bactéries à Gram négatif. L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la sécrétion de la FHA contribue donc à la compréhension d'une voie de sécrétion originale présente chez plusieurs pathogènes.

De plus, cette étude pourrait contribuer au développement de systèmes de production de protéines d'intérêt biotechnologique. Ces protéines seraient fusionnées à la FHA et pourraient être sécrétées en grande quantité chez *B. pertussis, E. coli*, ou d'autres bactéries à Gram négatif. En plus de la grande efficacité de son système de sécrétion, la FHA est un immunogène puissant capable d'induire une immunité à la fois systémique et mucosale. Actuellement, une approche en recherche vaccinale consiste à induire contre des antigènes d'intérêt des réponses immunitaires mucosale et systémique suite à une vaccination par la voie mucosale. La FHA est un bon candidat pour la confection de tels vaccins en raison de ses propriétés d'adjuvant. Par exemple, une souche de *B. pertussis* qui sécrète une fusion entre la FHA et un antigène de *S. mansoni* (appelé Sm28GST), administrée par voie intranasale à des souris, induit la production d'IgA anti-Sm28GST dans le tractus respiratoire, d'IgG et d'IgA sériques, et une protection contre la bilharziose (Renauld-Mongénie *et al.*, 1996); Mielcarek *et al.*, 1997; Mielcarek *et al.*, 1998). Les fusions entre la FHA et des

antigènes hétérologues pourraient également être exprimées chez d'autres vecteurs vivants administrables par voie mucosale, tels que *Vibrio cholerae* ou *Salmonella*.

L'objectif de notre travail a consisté à caractériser les différents signaux de sécrétion de la FHA. Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre en évidence une maturation N-terminale du précurseur de la FHA, une caractéristique partagée par un grand nombre de protéines sécrétées chez les bactéries à Gramnégatif. Nous avons également mis au point un système d'expression de la Fha44 et de FhaC chez *E. coli*, afin de faciliter certaines études ultérieures, telles que les essais de complémentation avec les systèmes de sécrétion des hémolysines. Ces expériences nous ont permis de montrer qu'une seule protéine auxiliaire, FhaC, était nécessaire pour reconstituer le système de sécrétion de la Fha44 chez *E. coli*. Ceci indique que si d'autres facteurs interviennent, ils sont présents chez *E. coli* et ont un caractère relativement universel.

La caractérisation de la région N-terminale de la FHA constituait le second objectif de notre travail. Tout d'abord, il a été nécessaire de déterminer le codon d'initiation de *fhaB* ainsi que le site exact de la maturation N-terminale du précurseur FhaB. Nous nous sommes ensuite intéressés à la séquence-signal de ce précurseur, car elle présente plusieurs caractéristiques originales. Longue de 71 résidus, elle comporte deux parties. La partie C-terminale présente les caractéristiques classiques d'un peptide-signal avec un domaine chargé positivement, suivi d'un segment hydrophobe et d'une région de clivage. La partie N-terminale, longue de 22 résidus, appelée "extension N-terminale", est conservée parmi plusieurs protéines sécrétées par d'autres bactéries à Gram négatif. Le rôle de l'extension N-terminale étant inconnu chez ces protéines, nous avons voulu évaluer l'importance de cette séquence pour la sécrétion de la FHA. D'autre part, parmi les 3591 résidus que compte FhaB, on trouve seulement 3 cystéines, toutes situées dans la séquence-signal de FhaB. Cette particularité nous a incité à analyser le rôle de ces cystéines par mutagenèse dirigée. Enfin, le résidu N-terminal de la FHA présente une modification dont nous avons entrepris d'établir la nature et la fonction.

La famille de FhaC comprend en particulier les protéines auxiliaires ShlB et HpmB, impliquées dans la sécrétion et l'activation des hémolysines ShlA et HpmA chez *S. marcescens* et *P. mirabilis*, respectivement. D'autre part, la FHA partage avec ces hémolysines une boîte d'homologie amino-proximale d'une centaine de résidus essentielle pour la sécrétion. Le reste de la séquence de la FHA ne présente aucune autre homologie avec celles des hémolysines. Le second objectif de ce travail a été de déterminer le degré de similitude fonctionnelle entre les systèmes de sécrétion de la FHA et des hémolysines en réalisant des expériences de complémentation. Nous avons également étudié l'importance dans la sécrétion de la FHA de 2 résidus conservés de la boîte d'homologie essentiels pour la sécrétion de ShlA. Article 1. Maturation N-terminale de la FHA de B. pertussis

Au cours de sa maturation, le précurseur de la FHA (FhaB) subit un clivage Cterminal qui lui retire un tiers de sa séquence. Le domaine C-terminal clivé est important pour la sécrétion de la partie mature de la FHA (Renauld-Mongénie *et al.*, 1996a), mais son rôle exact n'est pas connu. Des dérivés tronqués de la FHA (Fha44 et Fha412), qui possèdent toujours la boîte de sécrétion N-terminale, sont efficacement sécrétés chez *B. pertussis*. Leur sécrétion reste dépendante de la protéine auxiliaire de la membrane externe FhaC, mais ne requiert pas la présence du domaine C-terminal de FhaB.

Dans l'article 1, nous montrons que les tailles de la Fha44 et de la Fha412 sécrétées dans les surnageants de culture de *B. pertussis* sont inférieures de 8-9 kDa par rapport aux tailles prédites de leurs précurseurs respectifs. En fusionnant un épitope à l'extrémité C-terminale de la Fha44, nous avons démontré que cette maturation de 8-9 kDa se produit à l'extrémité N-terminale de la Fha44. En plus de sa maturation C-terminale, le précurseur FhaB subit donc chez *B. pertussis* une maturation N-terminale, qui pourrait correspondre au clivage d'une séquence-signal.

Cependant, l'examen de la séquence N-terminale prédite de FhaB montre que celle-ci est différente d'un peptide-signal classique. Afin de savoir si cette région est capable de conduire à l'exportation de protéines à travers la membrane cytoplasmique de *E. coli*, nous l'avons fusionnée avec la β-galactosidase d'une part, et la phosphatase alcaline d'autre part. Pour être actives, la β-galactosidase doit rester cytoplasmique, et la phosphatase alcaline doit être exportée dans le périplasme. Les deux constructions, placées sous le contrôle du promoteur du gène fhaB, ont été introduites chez E. coli, en présence d'un plasmide codant BvgA, l'activateur transcriptionnel de *fhaB*. L'obtention d'activités phosphatase alcaline très faibles, et d'activités β-galactosidase significatives, nous ont suggéré que la région N-terminale de FhaB ne fonctionnait pas comme séquence-signal chez E. coli. Cependant, des expériences ultérieures nous ont conduit à proposer une autre hypothèse. En effet, nous avons essayé de coexprimer fhaC et fha44 chez E. coli, mais nous n'avons pas réussi à produire la Fha44 dans ces conditions. La traduction de *fhaB* ne semble pas être efficace chez E. coli, ce qui expliquerait les activités phosphatase alcaline faibles obtenues ci-dessus.

Par contre, nous avons obtenu une bonne sécrétion en fusionnant les signaux de traduction et le peptide-signal de OmpA à l'extrémité N-terminale de la Fha44. Il s'agit du premier système de sécrétion efficace d'un dérivé de la FHA décrit chez *E*.

coli. La taille apparente de la Fha44 sécrétée par *E. coli* est identique à celle sécrétée par *B. pertussis*, suggérant que la maturation N-terminale subie dans les 2 systèmes a lieu en des sites identiques ou très proches. Contrairement à ce qui est observé chez *B. pertussis*, l'extrémité N-terminale de la Fha44 sécrétée chez *E. coli* n'est pas modifiée. Le premier résidu de la Fha44 mature chez *E. coli* est la glutamine en position 72 par rapport à la première méthionine initiatrice possible. Ce site correspond au site de clivage par une signal-peptidase de type LepB, prédit lors de l'examen de la séquence N-terminale de FhaB.

Amino-terminal maturation of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin

Françoise Jacob-Dubuisson,¹ Corinne Buisine,¹ Nathalie Mielcarek,² Eve Clément,¹ Franco D. Menozzi¹ and Camille Locht^{1*}

¹Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire, INSERM CJF9109, and ²Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, INSERM U167, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Prof Calmette, F-59019 Lille Cedex, France.

Summary

The 220 kDa filamentous haemagglutinin (FHA) is a major adhesin of Bordetella pertussis and is produced from a large precursor designated FhaB. Although partly surface associated, it is also very efficiently secreted into the extracellular milieu. Its secretion depends on the outer membrane accessory protein FhaC. An 80 kDa N-terminal derivative of FHA, named Fha44, can also be very efficiently secreted in a FhaCdependent manner, indicating that all necessary secretion signals are localized in the N-terminal region of FhaB. A comparison of predicted and apparent sizes of FHA derivatives, in addition to immunoblot analyses of cell-associated and secreted FHA polypeptides, indicated that FhaB undergoes N-terminal maturation by the cleavage of an 8-9kDa segment. However, phenotypic analyses of translational lacZ and phoA fusions showed that this segment does not function as a typical signal peptide. Co-expression of the Fha44-encoding gene with fhaC also did not allow for secretion of Fha44 in Escherichia coli. High levels of secretion could, however, be observed when the OmpA signal peptide was fused to the N-terminal end of Fha44. Regardless of the OmpA signal peptide-Fha44 fusion point, the E. coli-secreted Fha44 had the same M, as that secreted by B. pertussis, indicating that the N-terminal proteolytic maturation does not require a B. pertussis-specific factor. Similar to FHA, the B. pertussis-secreted Fha44 contains an as yet uncharacterized modification at its N-terminus. This modification did not occur in E. coli and is therefore not required for secretion. The N-terminus of Fha44 secreted by E. coli was determined and found to correspond to the 72nd residue after the first in-frame methionine of FhaB. The N-terminal modification was also found not to be required for haemagglutination or interaction with sulphated glycoconjugates.

Introduction

All cells rely on specialised machineries to target their macromolecules to the appropriate compartments. The secretion of proteins requires the crossing of one or more biological membranes. Gram-negative bacteria must guide their secreted and outer-surface proteins across two membranes, the cytoplasmic membrane and the outer membrane. In these organisms, most secreted proteins transit through the General Secretory Pathway (GSP) and cross each membrane separately using two distinct machineries called the Sec apparatus and the terminal branch of the GSP, respectively (for an extensive review see Pugsley, 1993). Alternative, Sec-independent, pathways have also been described, as exemplified by the secretion of the Escherichia coli haemolysin A (Koronakis and Hughes, 1993) or that of the Yop proteins of Yersinia species (Forsberg et al., 1994).

Pathogenic microorganisms are particularly valuable models with which to study protein secretion because they often secrete enzymes, toxins, adhesins, and invasins that are necessary for the expression of their virulence. Accordingly, *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, secretes several virulence factors including pertussis toxin, adenylate cyclase/haemolysin, filamentous haemagglutinin (FHA), and fimbriae (Weiss and Hewlett, 1986). Among them, the 220 kDa FHA, the main adhesin of *B. pertussis*, is the major secreted polypeptide product (Locht *et al.*, 1993).

The structural gene of FHA, *fhaB*, has a coding potential for a 367 kDa protein (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990; Domenighini *et al.*, 1990), referred to as FhaB. The mature form of the protein corresponds to the N-terminal region of the precursor and has been proposed to fold into a rigid hairpin (Makhov *et al.*, 1994). Although the C-terminal domain of FhaB is cleaved off during the maturation of FHA, it plays an important role in FHA secretion (Renauld *et al.*, 1996). However, it is not required for the secretion of truncated, up to 80 kDa, derivatives that correspond to the N-terminal region of FHA (Renauld *et al.*, 1996). These derivatives contain a 115-residue-long domain homologous to ShIA and HpmA, which are the Ca⁺⁺-independent haemolysins of *Serratia marcescens* and *Proteus mirabilis*, respectively (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990), found to be essential

Received 4 July, 1995; revised 15 August, 1995; accepted 23 August, 1995. *For correspondence. Tel. 20 87 77 28; Fax 20 87 79 06.

66 F. Jacob-Dubuisson et al.

for the secretion of the corresponding proteins (Schönherr et al., 1993, Willems et al., 1994). In addition, the secretion of the three polypeptides depends on homologous outer membrane accessory proteins called FhaC, ShIB and HpmB in B. pertussis, S. marcescens and P. mirabilis, respectively (Willems et al., 1994; Uphoff et al., 1990; Poole et al., 1988). It has been proposed that the secretion of FHA, ShIA and HpmA involves interactions between their N-terminal homologous region and the respective accessory proteins. This suggests similarities in their secretion mechanisms and the existence of a novel branch of the GSP. However, the N-terminus of FHA was found to be blocked (Domenighini et al., 1990; Jacob et al., 1988), whereas N-terminal sequence determination of ShIA indicated that the first residue of the mature protein immediately follows the predicted signal-peptide cleavage site (Poole et al., 1988). Furthermore, the deduced amino acid sequence of FhaB predicts, at best, an atypical signal peptide containing an unusually long polar domain followed by a hydrophobic domain (Delisse-Gathoye et al., 1990). These observations suggest important differences between the secretion mechanism of FHA and those of ShIA and HpmA.

In this work, the N-terminal maturation of FhaB was investigated using an 80 kDa C-terminally truncated FHA polypeptide, named Fha44 (Renauld *et al.*, 1996). It was found that the first 71 residues are removed during FHA biogenesis, but that this region does not function as a typical signal peptide in *E. coli*. The addition of the OmpA signal peptide allowed high levels of FhaC-dependent Fha44 secretion in *E. coli*. As for Fha44 secreted by *B. pertussis*, the N-terminal maturation beyond this signal-peptide cleavage site was also found in *E. coli*. In contrast to that of *B. pertussis*, however, Fha44 secreted by *E. coli* had no N-terminal modification. This modification was apparently not required for FHA secretion, haemagglutination, or interaction with sulphated carbohydrates.

Results

The apparent M_r of truncated N-terminal FHA polypeptides are smaller than expected

The initiation codon of FhaB has not been identified with certainty among three possible in-frame AUG codons, and FhaB does not possess a typical signal-peptide sequence. In addition, the N-terminus of the mature protein could not be determined by Edman degradation, suggesting that the first residue of FHA is modified (Domenighini *et al.*, 1990; Jacob *et al.*, 1988). To facilitate the study on the role of the N-terminal region of FHA in its secretion, we used truncated FHA derivatives produced by *B. pertussis* strains containing 3' deletions in *fhaB*. These polypeptides are efficiently secreted in a FhaC-dependent manner



Fig. 1. SDS-PAGE analysis of truncated FHA polypeptides. FHA (lane 1), Fha44 (lane 2), and Fha412 (lane 3) were affinity purified from culture supernatants of *B. pertussis* BPSM, BPGR4(pBG4), and BPGR4(pBG12), respectively, and analysed by 12% SDS-PAGE. Each lane contained $5 \mu g$ of purified protein. The gel was stained with Coomassie brilliant blue. The M_r of the markers are given in kDa in the left margin.

(Renauld *et al.*, 1996). The plasmid-borne truncated genes containing the 5' 2.5 kb (pBG4) or 1.3 kb (pBG12) of *fhaB*, were introduced into BPGR4, a *B. pertussis* strain in which chromosomal *fhaB* was deleted (Locht *et al.*, 1992). The FHA polypeptides in the culture supernatant of the transformed strains were purified by heparin–Sepharose chromatography. The sizes of the purified proteins, designated Fha44 and Fha412, were estimated by SDS–PAGE (Fig. 1). The largest FHA-related polypeptides were found in each case to be significantly (approximately 8–9 kDa) smaller than expected from their amino acid sequences, if one considers the first in-frame AUG as being the start codon (Table 1). This observation suggested that these polypeptides either migrated abnormally during SDS– PAGE or were subjected to proteolytic processing. In

Table 1. Mr of FHA and FHA derivatives.

	Calculated <i>M</i> r (kDa)	Estimated <i>M</i> _r (kDa) of the largest FHA polypeptide		
Strain		secreted	cell-associated	
B. pertussis				
BPSM	ND ^a	219		
BPGR4(pBG12)	49.1	41	ND	
BPGR4(pBG4)	89.5	80	89	
E. coli				
UT5600(pFJD11)	88.5 (86.4 ^b)	80	89	
UT5600(pFJD12)	84.9 (82.9 ^b)	80	84.5	
UT5600(pFJD13)	81.2 (79.2 ^b)	80	80	

a. Not determined because the C-terminal end of mature FHA is unknown.

b. Size calculated after cleavage of the OmpA signal peptide.

© 1996 Blackwell Science Ltd, Molecular Microbiology, 19, 65-78


Fig. 2. Immunoblot analysis of the cell-associated Fha44. Whole cell extracts of liquid cultures of *B. pertussis* BPGR4 (lane 1) and BPGR4(pBG4) (lane 3) were analysed by 12 % SDS–PAGE and immunoblotting using the rat anti-Fha44 polyclonal antiserum. Equivalent amounts of total proteins corresponding to 100 μ l of bacteria grown to an A_{600} of 5 were loaded in lanes 1 and 3. Lane 2 contains 100 μ l of unconcentrated culture supernatant from *B. pertussis* BPGR4(pBG4). The *M*_r of the markers are given in kDa in the right margin.

addition to the largest polypeptide, one or several other polypeptides of smaller sizes were present in the purified preparations. In particular, two major protein bands were usually detected in the Fha44 fraction. These are probably proteolytic cleavage products from the larger forms, because it has been documented that FHA is highly susceptible to proteolysis (Domenighini *et al.*, 1990).

When whole cell extracts of B. pertussis BPGR4(pBG4) were analysed by immunoblotting using anti-Fha44 antiserum, two major proteins of sizes similar to those of the extracellular Fha44 polypeptides were detected. In addition, a larger protein, absent in the culture supernatant, was detected in whole cell extracts (Fig. 2, lane 3; Table 1). Neither of these polypeptides were found in cell extracts of untransformed B. pertussis BPGR4 (Fig. 2, lane 1), confirming that they are FHA-related. Higher resolution SDS-PAGE indicated that the M_r of the additional cell-associated protein was approximately 8-9 kDa larger than that of the largest extracellular product. The 89kDa size of this cell-associated polypeptide is in accordance with the calculated M_r (Table 1), and it therefore probably represents a precursor of the secreted forms. This suggests that the secreted forms had undergone proteolytic maturation.

N-terminal maturation of Fha44

To determine whether the maturation of Fha44 occurred at the N-terminal or at the C-terminal end of its precursor, a short nucleotide sequence coding for an immunodominant epitope of the *Schistosoma mansoni* glutathione-Stransferase (Sm28GST, peptide 190–211) was fused to the 3' end of *fha44*. The resulting plasmid, named pNJ1

N-terminal maturation of FHA 67

and encoding a Fha44-Sm28GST chimera, was introduced into *B. pertussis* BPGR4, and the culture supernatant of the transformed strain was analysed by SDS-PAGE and immunoblotting using anti-Sm28GST antibodies. As shown in Fig. 3, lane 4, these antibodies strongly recognized the Fha44-Sm28GST chimera. Only the largest secreted polypeptide was recognized by the antibodies. This hybrid protein was slightly larger than the largest Fha44 polypeptide secreted by BPGR4(pBG4), but was still significantly smaller than expected from the amino acid sequence (not shown), indicating that its proteolytic maturation had occurred at the N-terminal end. In addition, the smaller M_r forms, having lost the Sm28GST epitope, must have been processed at their C-terminal end (Fig. 3, lane 2).

These results, together with the presence of a cellassociated precursor, indicate that the larger secreted form of Fha44 (Figs 1 and 2 and Table 1) results from an N-terminal proteolytic maturation of the precursor by the removal of a 8–9 kDa fragment. The smaller secreted forms probably result from additional cleavages at the Cterminal end of Fha44.

Poor FhaC-dependent secretion of Fha44 in E. coli

To facilitate further investigations on the N-terminal maturation of Fha44, attempts were made to secrete this protein in *E. coli*. As secretion of Fha44 requires the expression of *fhaC* (Renauld *et al.*, 1996), we first needed to express this accessory gene in *E. coli*. To develop specific antibodies for the detection of FhaC, the major portion of *fhaC* was expressed as a hybrid protein with an N-terminal His-6 tag. High levels of expression were readily achieved upon induction with isopropyl-1-thio- β -D-galactoside (IPTG), and the recombinant protein was purified by Ni-nitrilotriacetic acid agarose chromatography (data not shown). The purified protein was then used for the production of anti-FhaC





68 F. Jacob-Dubuisson et al.



Fig. 4. Immunoblot detection of FhaC. Outer membrane preparations of *B. pertussis* BPSM (lane 1), *B. pertussis* B177 (lane 2), *E. coli* XL1-Blue(pQE32) (lane 3), and *E. coli* XL1-Blue(pFJD6) (lane 4) were analysed by immunoblotting using the anti-FhaC polyclonal antiserum. Equivalent amounts of total proteins were loaded in all lanes. The M_r of the markers are given in kDa in the right margin.

antibodies. As shown in Fig. 4, the anti-FhaC antibodies reacted with an approximately 60 kDa protein in outer membrane preparations of *B. pertussis* BPSM (FhaB⁺ FhaC⁺). This is the expected size of FhaC. In contrast, no anti-FhaC reactive protein was detected in outer membrane preparations of *B. pertussis* B177, a strain containing a kanamycin-resistance gene insertion in *fhaC* (Willems *et al.*, 1994).

To express full-length *fhaC* in *E. coli*, pFJD6 was constructed, in which *fhaC* was cloned under the control of an inducible promoter. The recombinant plasmid was introduced into *E. coli* XL1-Blue, and outer membrane fractions of the transformed cells were prepared and analysed by immunoblotting using the anti-FhaC antibodies. As shown in Fig. 4, a protein of the same size as the *B. pertussis* FhaC was detected in the outer membrane fractions of *E. coli* XL1-Blue(pFJD6), whereas no immunoreactive protein was detected in outer membrane fractions of *E. coli* XL1-Blue transformed with the vector lacking *fhaC*.

The co-expression of *fhaC* and *fha44* was then attempted in *E. coli* using pFJD6 together with pFJD9, which is a pFJD6-compatible pMMB91 derivative containing the *fha44* gene under the control of the *tac* promoter. No Fha44 was detected by immunoblotting of culture supernatants or whole cell extracts of IPTG-induced *E. coli* XL1-Blue(pFJD6, pFJD9). Identical results were obtained using *E. coli* UT5600, a strain deficient for the production of the outer membrane protease OmpT. This latter strain was chosen for use in further experiments.

To test whether the *fhaC* gene construction under the

control of the IPTG-inducible promoter was able to provide a functional product, we used pFJD8 to complement the *fhaC* mutation in *B. pertussis* B177. This plasmid is a pMMB67-derivative that can autonomously replicate in *Bordetella*. Transformation of *B. pertussis* B177 with pFJD8 was able to restore the secretion of FHA (not shown), indicating that functional expression of *fhaC* was achievable from such a construct.

Lack of protein export in E. coli using the N-terminal region of FhaB

The lack of Fha44 secretion in E. coli described above suggests that the N-terminal sequence of FhaB might not function as an efficient export signal in E. coli. This hypothesis was tested using translational gene fusions between the 5' end of *fhaB* (252 bp of the coding region) and the lacZ gene or the part of the phoA gene encoding the mature protein. The constructions gave rise to protein chimeras fusing the first 84 amino acid residues of FhaB to β -galactosidase (FHA β Gal) or alkaline phosphatase (FHAPhoA) as depicted in Fig. 5. The corresponding plasmids, pFHAßgal and pFHAphoA, were introduced into E. coli XL1-Blue and CC118, respectively, either alone or in trans with pQHB, a compatible plasmid containing bvgA (Boucher et al., 1994), the product of which is required for transcriptional activation of *fhaB*. As the *bvgA* gene in this plasmid was under the control of an IPTG-inducible promoter, this combination allowed for transcription of the chimeric genes from the promoter of fhaB upon induction with IPTG. When plated onto Luria-Bertani (LB) agar containing Xgal and IPTG, the E. coli XL1-Blue(pFHAßgal) colonies were light blue and the E. coli XL1-Blue(pQHB, pFHA β gal) were dark blue, indicating that active β -galactosidase was produced, and, therefore, that the chimeric protein must be located in the cytoplasm or on the cytoplasmic side of the inner membrane. No apparent toxicity of this construct was observed in E. coli, suggesting that the N-terminal part of FhaB did not direct the β -galactosidase to the export machinery (Bieker and Silhavy, 1989). These results were confirmed by liquid cultures. After induction of *bvgA* expression, the β galactosidase activity in E. coli XL1-Blue(pFHAßgal, pQHB) was found to be of the same order of magnitude as that of positive control E. coli XL1-Blue(pBBR1MCS, pQHB), and over 10-fold higher than that of E. coli XL1-Blue(pFHAßgal), whereas almost no activity was detected in untransformed cell extracts (Fig. 6).

The opposite phenotype was observed with the FHA-PhoA hybrid. No significant alkaline-phosphatase activity was found in *E. coli* CC118(pFHAphoA) regardless of the presence of pQHB within the same cell, although high levels of PhoA activity were found in the positive-control strain *E. coli* CC118 transformed with pEL1, encoding



Fig. 5. Schematic representation of the various translational chimeras. The top line represents the N-terminal sequence of FhaB starting with the first of three possible in-frame methionines. The second line depicts the translational fusions between the N-terminal region of FhaB and either β -galactosidase (β -Gal in oval) or alkaline phosphatase (PhoA in oval). The third, fourth and fifth lines depict the translational fusions between the OmpA signal peptide (OmpA SP in white box) and the various FhaB peptides. The '+' designates positively charged residues, and the hydrophobic segment is boxed in dark grey. The arrow in the fourth line indicates the cleavage site generating the N-terminus of Fha44 secreted by *E. coli.*

the complete *phoA* gene (Fig. 6). The absence of PhoA activity and the presence of β -galactosidase activity indicate that the 84 N-terminal residues of FhaB do not function as an efficient signal peptide in *E. coli*.

When the plasmids containing the hybrid genes were introduced into B. pertussis, pFHAßgal yielded extremely low transformation rates. None of the few chloramphenicol-resistant clones that could be grown in liquid medium had measurable β -galactosidase activity, and, in all cases, the reisolated plasmid differed from the original construct, indicating that genetic rearrangements had occurred (not shown). These observations suggest that the product of the chimeric fhaB-lacZ gene was toxic to B. pertussis, possibly by jamming of the translocase, since β -galactosidase is incompatible with export (Bieker and Silhavy, 1989). In contrast, pFHAphoA could easily be introduced into B. pertussis. PhoA activity could be detected in B. pertussis BPSM(pFHAphoA), but no activity was detected when pFHAphoA was introduced into B. pertussis BP347, an avirulent strain containing a Tn5 insertion in the bvgA gene (Weiss et al., 1983). This indicates that the PhoA activity detected in BPSM(pFHAphoA) was under the control of the BvgA transactivator, as expected for the fhaB promoter. However, even in BPSM(pFHAphoA), the PhoA activity was weak compared to that detected in B. pertussis SK39, a strain containing a TnphoA insertion in the pertussis-toxin operon (Knapp and Mekalanos, 1988) (not shown). This suggests that the first 84 residues of

© 1996 Blackwell Science Ltd, Molecular Microbiology, 19, 65-78

FhaB constitute a weak or incomplete export signal in *B. pertussis.*

Efficient FhaC-dependent Fha44 secretion in E. coli by the addition of the OmpA signal peptide

As the N-terminal domain of FhaB did not appear to function as an efficient export signal, we reasoned that this could be one of the reasons for poor secretion in E. coli. Therefore, the E. coli OmpA signal peptide was fused to the Fha44 sequence. Three different translational gene fusions were constructed and cloned into pMMB91 under the control of the tac promoter to yield pFJD11, pFJD12, and pFJD13. These plasmids gave rise to hybrid proteins in which, respectively, the first 2, 33 or 70 N-terminal residues of FhaB were replaced by the 21 residues corresponding to the OmpA signal peptide (Fig. 5). These plasmids were introduced into E. coli UT5600 either alone or in trans with the compatible pFJD6 containing fhaC. The recombinant cells were grown in liquid medium and expression was induced by the addition of IPTG. The culture supernatants were separated from the cells and analysed by immunoblotting using anti-Fha44 antibodies. Polypeptides recognised by anti-Fha44 antibodies were detected in the supernatants of the strains co-expressing *fhaC* and either one of the three ompAfha44 fusions (Fig. 7A, lanes 6-8). There were, however, significant guantitative differences between the three



Fig. 6. Relative β -galactosidase and alkaline-phosphatase activities of the hybrid proteins in *E. coli*. The β -galactosidase (grey bars) and alkaline phosphatase (striped bars) activities in *E. coli* cell extracts of the indicated strains were determined as described in the *Experimental procedures*. The activities are displayed as the per cent of residual activities relative to the positive controls, *E. coli* XL1-Blue(pBBR1MCS, pQHB) and *E. coli* CC118(pEL1), respectively. The experiments were performed 3–5 times with variations in the absolute values, but not in the relative values.

constructs. The hybrid protein encoded by pFJD12 reproducibly yielded 8-10-fold more secreted Fha44 than the hybrid proteins encoded by pFJD11 and pFJD13, as determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (not shown). The yield of Fha44 from this construction was typically about 20% of that of B. pertussis-produced Fha44. Remarkably, all three extracellular Fha44 proteins produced in E. coli had the same apparent Mr as the major secreted form of Fha44 in B. pertussis (see below and Table 1). This was unexpected, as the cleavage of the OmpA signal peptide should have resulted in different sizes of proteins for the three constructs. This finding suggests that the Fha44 polypeptides had undergone proteolytic maturation in addition to the removal of the OmpA signal peptide. The Fha44 secretion was, in all three cases, dependent on the presence of fhaC (Fig. 7A, compare lanes 2-4 with lanes 6-8). Very small amounts of Fha44 were occasionally detected in the supernatant of E. coli UT5600(pFJD12) in the absence of FhaC, suggesting, perhaps, partial cell lysis or a weak leakage through the outer membrane (Fig. 7A, lane 3). In this case, the Fha44 produced had the same size as that produced by

B. pertussis, indicating that the proteolytic maturation beyond the removal of the signal peptide did not depend on FhaC.

Anti-Fha44-reactive proteins of the same size as those found in the culture supernatants were detected in whole cell extracts of the various *E. coli* strains. Interestingly, larger cell-associated immunoreactive proteins were also present in some of these strains (Fig. 7B, lanes 3–5; Table 1). They were particularly abundant in cell extracts of *E. coli* UT5600(pFJD11) regardless of the presence of FhaC (Fig. 7B, lanes 3 and 4). These proteins probably correspond to precursor forms of the secreted proteins.

All three Fha44 proteins secreted by *E. coli* UT5600 (pFJD6) containing pFJD11, pFJD12, or pFJD13, could be purified by heparin–Sepharose chromatography (Fig. 7C). Similar to the *B. pertussis* Fha44, the *E. coli* Fha44 was able to agglutinate rabbit red blood cells, albeit with a somewhat lower titre than Fha44 produced by *B. pertussis*, possibly because of the presence of abundant degradation fragments contaminating the *E. coli* purified preparation (Fig. 7C). Both *B. pertussis* and *E. coli* proteins readily lost their haemagglutination titres upon storage, which was not observed with full-length FHA.

Attempts were made to introduce pFJD11, pFJD12 and pFJD13 into B. pertussis BPSM, BPGR4 and BPMC. BPMC lacks fhaB and is also defective for the production of FhaC (Locht et al., 1992). In spite of repeated attempts, pFJD13 could not be introduced into B. pertussis. In the other cases, most transformants grew very poorly on solid medium. B. pertussis BPMC(pFJD11) and BPMC (pFJD12), the only ones able to grow in liquid culture, were then retransformed with pFJD16, which is a compatible plasmid encoding FhaC. Approximately 1% of these double transformants were recognized by the anti-Fha44 antiserum in colony immunoblots. Fha44 detected in the supernatant of these clones was of the same size as Fha44 from B. pertussis BPGR4(pBG4), as estimated by SDS-PAGE and immunoblot analyses (not shown). Again, the apparent M_r of the secreted polypeptides did not depend on the site of the OmpA signal peptide fusion.

Attempts to determine the N-terminal sequences of the Fha44 proteins from the various sources suggested that Fha44 produced by *B. pertussis* is modified, as was previously found for full-length FHA. In contrast, the four N-terminal residues of the *E. coli*-produced Fha44 from strain UT5600(pFJD6, pFJD12) were unambiguously determined as Gln–Gly–Leu–Val. This sequence can be found at positions 72–75 of the FhaB sequence (Fig. 5). The apparent M_r of Fha44 estimated by SDS–PAGE analysis is compatible with a mature protein starting at position 72.

Discussion

For most secreted proteins of Gram-negative bacteria, the

N-terminal maturation of FHA 71





Fig. 7. Immunoblot analyses of Fha44 produced by E. coli.

A. Culture supernatants of *E. coli* UT5600(pFJD9) (lane 1), UT5600(pFJD11) (lane 2), UT5600(pFJD12) (lane 3), UT5600(pFJD13) (lane 4), UT5600(pFJD6, pFJD9) (lane 5), UT5600(pFJD6, pFJD11) (lane 6), UT5600(pFJD6, pFJD12) (lane 7), and UT5600(pFJD6, pFJD13) (lane 8) were analysed by immunoblotting using the anti-Fha44 polyclonal antibodies. Lane 9 contains 15 µl of culture supernatant of *B. pertussis* BPGR4(pBG4) as a positive control. Lanes 6–8 contain 15 µl of unconcentrated culture supernatant, whereas in lanes 1–4, the culture supernatants were concentrated 20-fold by precipitation. The *M*_r of the markers are given in kDa in the left margin. B. Cell-associated Fha44 was detected by immunoblotting of whole cell extracts of *E. coli* UT5600(pFJD11) (lane 3), UT5600(pFJD6, pFJD11)

(lane 4), UT5600(pFJD12) (lane 5), and UT5600(pFJD13) (lane 6). Equivalent amounts of total proteins were loaded in lanes 3–6. Lanes 1 and 2, respectively, contain 2 μ g and 500 ng of Fha44 purified from *B. pertussis* BPGR4(pBG4) and *E. coli* UT5600(pFJD6, pFJD12), respectively. The *M*_r of the markers are given in kDa in the left margin.

C. Approximately 500 ng of affinity-purified Fha44 from *E. coli* UT5600(pFJD6, pFJD12) (lane 2), UT5600(pFJD6, pFJD11) (lane 3), and UT5600(pFJD6, pFJD13) (lane 4) were analysed by immunoblotting using the anti-Fha44 polyclonal antiserum. Unconcentrated culture supernatant (5 µl) of *B. pertussis* BPGR4(pBG4) (lane 1) was used as a control. The *M*_r of the markers are given in kDa in the right margin.

secretion mechanism comprises two distinct steps, termed the GSP (Pugsley, 1993). The first step allows the protein to be transported through the inner membrane and it normally depends on the presence of a cleavable N-terminal signal peptide and the Sec apparatus (Pugsley, 1993), and has been studied extensively. The details of the second step, responsible for the transport through the outer membrane, are much less well characterized. The mechanisms of protein secretion across the outer membrane fall within a small number of categories (Lory, 1992; Salmond and Reeves, 1993), requiring between zero to over a dozen accessory proteins. These accessory proteins may express their assistance in secretion with more or less specificity for their cognate substrates. Secretory intermediates between the first and second steps may sometimes be detected in the periplasmic space following cleavage of the signal peptide. Besides the GSP, some Gram-negative microorganisms also use totally different, Sec-independent secretion mechanisms, without a periplasmic intermediate (Van Gijsegem et al., 1993; Wandersman, 1992).

sequence did not allow export of PhoA through the cytoplasmic membrane of *E. coli*, but allowed low levels of PhoA export in *B. pertussis*. However, this export in *B. pertussis* was much less efficient than that observed for PhoA fused to a typical signal peptide, such as that of the S1 subunit of pertussis toxin. This contrasts with the highly efficient secretion of FHA by *B. pertussis* and suggests, therefore, that additional signals may be important for FHA translocation, even through the inner membrane. Unlike classical signal peptides, these additional signals are probably located downstream of the first 80 residues of FHA. In contrast to the first FHA residues, other *B. pertussis*

signal peptides, such as those of the pertussis-toxin subunits, allow for efficient Sec-dependent export of proteins into the *E. coli* periplasm (Burnette *et al.*, 1988),

The B. pertussis FhaB possesses an unusual N-terminal

sequence. As shown in Fig. 5, this sequence contains a

43 residue-long hydrophilic segment with many charged

amino acid residues, followed by a 28 residue-long

hydrophobic segment. Unlike typical signal peptides, this

72 F. Jacob-Dubuisson et al.

suggesting that B. pertussis also contains a Sec-like secretion pathway. With the native N-terminal region of Fha44, only very low secretion levels were achieved in E. coli. However, the addition of a canonical E. coli signal peptide allowed efficient Fha44 secretion into the E. coli culture supernatant in a FhaC-dependent manner. For one of the constructs, the secretion level approached the order of magnitude found in B. pertussis. Interestingly, the highest level of secretion in E. coli was obtained when the FHA N-terminal hydrophobic region was maintained in addition to the hydrophobic region of the OmpA signal peptide. Furthermore, the final proteolytic processing of that protein in E. coli was shown to take place immediately behind the hydrophobic segment of Fha44 rather than behind that of the OmpA signal peptide (Fig. 5). At present, it is unknown whether this processing takes place in several consecutive steps. The lack of the hydrophobic segment in the shorter construct was detrimental to secretion both in E. coli and in B. pertussis. Together these results suggest that the export/secretion of FHA either represents a novel pathway which remains to be characterized or, alternatively, that FHA is exported in a Sec-dependent manner but has additional, untypical features and possibly additional targeting factors.

As expected, efficient extracellular secretion of Fha44, even when fused to the OmpA signal peptide, requires the presence of FhaC, the outer membrane protein homologous to the S. marcescens and P. mirabilis haemolysin accessory proteins. However, in contrast to what has been observed for ShIA, secretory intermediates of Fha44 have not been isolated yet and do not seem to accumulate in the periplasm in the absence of FhaC (F. Jacob-Dubuisson, unpublished data). This suggests that FHA export through the cytoplasmic membrane and secretion through the outer membrane may be coupled. Recently, a new member of the FhaC-like outer membrane protein family has been identified in Haemophilus influenzae (Barenkamp and St Geme, 1994). This protein, named HMWB, is required for the secretion of HMWA, an adhesin that shares some homology with FHA and is recognized by at least one anti-FHA monoclonal antibody (Barenkamp and Leininger, 1992). FHA, HMWA, ShIA and HpmA all share the five-amino acid motif Asn-Pro-Asn-Gly-Ile which is probably involved in interactions with their respective outer membrane accessory proteins (Locht et al., 1993). FHA and HMWA share additional homology over 22 residues at the N-terminus of their precursors, which is not found in ShIA and HpmA. Furthermore, the regions that follow this N-terminal homology show strikingly similar hydrophilicity profiles, composed of a long, positively charged segment preceding a long hydrophobic domain. This is also not found in ShIA and HpmA. These observations suggest that FHA and HMWA form a sub-family within the family of proteins secreted via FhaC-like outer

membrane proteins. Interestingly, secretion of the H. influenzae adhesin was demonstrated to require the accessory protein HMWC in addition to the FhaC-homologue HMWB (Barenkamp and St Geme, 1994). Although the subcellular location of HMWC has not been determined yet, it is probably located within the cytosol since it does not possess a signal peptide. HMWC has been hypothesized either to act as a transcriptional activator, or to stabilize HMW mRNA or HMWA itself (Barenkamp and St Geme, 1994). Alternatively, such a subcellular location would be compatible with a role played in the first, transcytoplasmic membrane step of secretion. In that case, a protein homologous to HMWC might be involved in the first step of secretion of FHA in B. pertussis. This accessory protein would not be required when a Sec-dependent signal peptide is fused to FHA. It could recognize the export signals of FHA and pilot it to the translocator, reminiscent of the function of the Yop-specific Syc chaperones (Wattiau et al., 1994).

Regardless of the presence of the OmpA signal peptide, and regardless of its location in the N-terminal domain of Fha44, the extracellular Fha44 peptides all had the same apparent M_r in both E. coli and B. pertussis. The presence of anti-Fha44-reactive cell-associated proteins with apparent M_r corresponding to the size expected from the respective protein sequences indicates that Fha44 is produced as a precursor and undergoes an extensive Nterminal proteolytic maturation beyond the OmpA signal peptide cleavage. This maturation occurs in E. coli as well as in B. pertussis and appears to be independent of FhaC. Therefore, it is probably catalysed by ubiquitous envelope proteases, or perhaps by autoproteolysis, albeit no protease activity has yet been associated with FHA. When the OmpA signal peptide was fused to the Nterminus of the Fha44 precursor, the processing in E. coli UT5600(pFJD6, pFJD11) was less efficient and the secretion was impaired compared with that in E. coli UT5600(pFJD6, pFJD12) (see Fig. 7, A and B), indicating that the N-terminal maturation of FHA is intimately linked to its secretion. Interestingly, the N-terminal sequence of the E. coli-secreted Fha44 corresponds to the residues immediately following the 28-residue-long hydrophobic domain (Fig. 5), and this processing site matches the signalpeptide cleavage site predicted by Delisse-Gathoye et al. (1990). Although the N-terminus of the B. pertussis Fha44 could not be determined, it is likely that its N-terminal processing takes place at the same position as that in E. coli Fha44, or very close to it, since the size of the B. pertussis Fha44 is indistinguishable from that of E. coli Fha44 within the resolution of SDS-PAGE analysis.

The inaccessibility of FHA and Fha44 purified from *B. pertussis* to N-terminal sequencing suggests a covalent modification of the N-terminal residue of the mature protein. This modification remains, as yet, uncharacterized.



Fig. 8. Working model for FHA secretion in *B. pertussis*. FhaB would be synthesized with an N-terminal region comprising a 22-residue segment homologous to that of HMWA, as represented by the black triangle; a positively charged segment, as represented by the '+' sign; a hydrophobic segment, as represented by the black box; and a 115-residue-long region homologous to ShIA and HpmA, as represented by the dotted box. Some, or all, of these segments form part of the secretion signals of FhaB. The N-terminus would be recognised by a cytoplasmic pilot protein (P) and targeted to a translocase (T) located in the cytoplasmic membrane. During or after translocation, the N-terminal region of FHA is proteolytically cleaved and the resulting N-terminal residue is modified (indicated by the asterisk) by a 'modifying enzyme' (M). The 115-residue segment homologous to ShIA and HpmA interacts with FhaC to allow secretion of the protein across the outer membrane. The 150 kDa C-terminal portion of FhaB is removed and the mature FHA is released in the extracellular milieu.

Although N-terminal proteolytic maturation may be required for FHA secretion, this modification is not essential for extracellular secretion, at least in *E. coli*. It is also not essential for the haemagglutination activity, or for FHA adherence to sulphated carbohydrates, the binding-site of which has recently been assigned to the N-terminal region of FHA (Hannah *et al.*, 1994). In addition to its nature, the function of this modification remains to be investigated. It could conceivably be involved in the stability of the protein, its interaction with other molecules or the membranes of *B. pertussis*, folding of full-length FHA, or binding activities other than the interaction with sulphated carbohydrates.

In addition to its N-terminal maturation, FHA is also subjected to an extensive C-terminal maturation, in which the approximately 150 kDa C-terminal domain is removed from the 367 kDa FhaB. This 150 kDa domain may perhaps act as an intramolecular chaperone, maintaining FHA in a secretion-competent state. In our current working model depicted in Fig. 8, FhaB, devoid of a typical signal peptide, is first targeted to the inner membrane with the help of a cytoplasmic factor (pilot, 'P') that has yet to be identified. This step is followed by translocation across the inner membrane and N-terminal processing. In *B. pertussis*, a covalent modification of the N-terminus of the mature protein then occurs either directly after Nterminal proteolytic maturation or after interaction with FhaC. FhaB interacts with FhaC allowing it to be translocated through the outer membrane. During or after translocation, the C-terminal 150 kDa domain of FhaB is cleaved off, allowing the mature FHA molecule to fold as a hairpin rod, as described by Makhov *et al.* (1994).

FHA is one of the major antigens used in the new acellular vaccines against whooping cough (Sato *et al.*, 1984). Various attempts have been described to express FHA in heterologous hosts for the purpose of developing recombinant vaccines containing FHA (Brown and Parker, 1987; Molina and Parker, 1990; Guzman *et al.*, 1991). In all cases, FHA could be produced in a recombinant form, but remained intracellular. Efficient secretion of FHA in heterologous hosts, as described here, will considerably simplify the purification of this antigen free of other, toxic *B. pertussis* compounds. Moreover, FHA has also been produced in attenuated *Salmonella* strains to develop live mucosal vectors delivering this antigen for the production of a mucosal immune response (Guzman *et al.*, 1991). Since *Salmonella* is phylogenetically very close to *E. coli*,

74 F. Jacob-Dubuisson et al.

it is likely that the fusion of the OmpA signal peptide to FHA, together with the co-expression of *fhaC*, will result in high levels of secretion in this organism. This might be of considerable advantage for the induction of high levels of mucosal immune responses against FHA. Finally, we are currently exploring the possibility of using the FHA secretion mechanism for the extracellular secretion of biotechnologically valuable, heterologous proteins in *B. pertussis, E. coli* and other Gram-negative organisms.

Experimental procedures

Strains, plasmids and culture conditions

The B. pertussis and E. coli strains as well as the plasmids used in this study are listed in Table 2. Transformations of B. pertussis were performed by electroporation (R. Antoine and C. Locht, manuscript in preparation). Growth conditions for B. pertussis were described previously (Locht et al., 1992). Liquid cultures were typically grown for 48-60 h prior to analysis. When relevant, antibiotics were added at a final concentration of $100\,\mu g\,m l^{-1}$ for streptomycin, and $20\,\mu g\,m l^{-1}$ for ampicillin, kanamycin or chloramphenicol. E. coli strains producing Fha44 were grown in liquid LB medium (Sambrook et al., 1989) supplemented with 0.1% dimethyl-β-cyclodextrin (Teijin Ltd.). The production of recombinant Fha44 was achieved by the addition of IPTG (Promega) to a final concentration of 1 mM after the cultures had reached an optical density of 1-1.2 at 600 nm. The IPTG-treated cultures were then incubated under agitation for an additional three hours prior to analysis.

Plasmid constructions

Standard procedures described by Sambrook *et al.* (1989) were used for cloning. pFHAβgal was constructed as follows. A 500 bp *Eco*RI–*Pst*I fragment containing the promoter region and the 5' end of *fhaB* was isolated from pRIT13122 (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990) and cloned into the corresponding sites of pNM482 (Minton, 1984) to create a *fhaB*–*lacZ* translational fusion. The resulting plasmid was named pFHA2. The 5.5 kb *Eco*RI–*Stul* fragment of pFHA2 containing the *fhaB*–*lacZ* fusion was then cloned into *Eco*RI/*Smal*-digested pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1994). The resulting plasmid was named pFHAβgal.

To construct pFHAphoA, the 500 bp EcoRI-PstI fragment isolated from pRIT13122 was first cloned into pUC8 to create pFHA1. The 500 bp EcoRI-HindIII fragment from pFHA1 containing the promoter region, and the 5' end of *fhaB* was cloned into the corresponding sites of the polylinker of pBBR1MCS. The resulting plasmid was named pFHA4. The signal peptideless *E. coli phoA* gene was obtained as a 4.4 kb *SmaI* fragment from pEL1 (Kremer *et al.*, 1994) and cloned into the *SmaI* site of pUC19 to yield pPhoA19. This fragment was then recovered as a *SaII-Asp*718 fragment and cloned inframe with the 5' end of *fhaB* into the corresponding sites of pFHA4 to yield pFHAphoA.

pQE9::*Pst*I codes for a protein composed of most of FhaC fused to a 6-histidine residue motif at its N-terminus. It was obtained by cloning a 2.2 kb *Pst*I fragment from pRIT12990

(Delisse-Gathoye *et al.*, 1990) into the same site of pQE9 (Diagen).

pFJD6 and pFJD16 contain the entire *fhaC* gene under the control of IPTG-inducible promoters in two different vectors. *fhaC* was obtained as a 2.3 kbp *Bc*/I fragment from pRIT12990 and cloned into the *Bam*HI site of pQE32 (Diagen) such that the 3' end of the *fimD* gene, which precedes *fhaC*, formed a translational fusion with the polyhistidine motif of the vector. This resulted in pFJD6. To construct pFJD16, the same *Bc*/I fragment was cloned into the *Bam*HI site of pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1994) and its orientation was verified by restriction endonuclease digestion.

pFJD8, which encodes *fhaC* under the control of the *tac* promoter in the broad-host-range, low-copy-number vector pMMB67EH (Fürste *et al.*, 1986), was obtained as follows. During the construction of pFJD6, one additional plasmid (pFJD2) was isolated that contained two *fhaC* inserts in tandem. The 2.3 kb *Eco*RI-*Bcl*I fragment encoding *fhaC* was isolated from pFJD2 and cloned into *Eco*RI/*Bam*HI-restricted pMMB67EH.

pFJD9, which contains the promoter region and the 5' 2.5 kb of *fhaB* up to the first *Bam*HI site downstream of the vector *tac* promoter, was constructed by cloning the 2.8 kb *Eco*RI–*Bam*HI of pBG4 (Renauld *et al.*, submitted) into the same sites of pMMB91.

pNJ1 was constructed as follows. The synthetic oligonucleotides TAGGATCCGGGCCGGGGCCCGAAAATCTGT-AGCC containing a BamHI site (underlined) and TAAGATCT-CCCGGGCCCCGGGAAGGGAGTTGCAGG containing a Bg/II site (underlined) were used for polymerase chain reaction (PCR) amplification from plasmid pEV28, kindly provided by R. Pierce (Institut Pasteur de Lille). This plasmid is a pBR322-derivative containing the cDNA encoding the S. mansoni gluthatione-S-transferase (Sm28GST) (Balloul et al., 1987). The amplified DNA corresponded to the region of the Sm28GST gene encoding peptide 190-211 flanked by short linker sequences composed of prolines and glycines. Forty cycles of denaturation (1 min at 94°C), annealing (1 min at 60°C) and extension (1 min at 72°C) were performed. The PCR product was purified, digested by BamHI and Bg/II and cloned into the BamHI site of pBG4. Altogether, 29 residues were introduced in-frame at the C-terminal end of Fha44.

pEC1 was obtained by cloning the 100 bp Xbal-BamHI fragment of pIN-OmpAIII-Hind (Rentier-Delrue et al., 1988) into the corresponding sites of pACYC184. This fragment codes for the E. coli OmpA signal peptide followed by a short polylinker with a unique HindIII site. pEC11 was constructed as follows. A 615 bp fragment containing the 5' end of fhaB was amplified from plasmid pRIT13130 (Delisse-Gathoye et al., 1990) by PCR using the oligonucleotides TTTAACCGATGCGGCCGCCGTTG, which contains a NotI (underlined) site, and TATAAGCTTCGAACCTGTACAGGC-GGTC, containing a HindIII site (underlined). Next, 35 cycles of denaturation (1 min at 94°C), annealing (1 min at 58°C) and DNA polymerization (1 min at 72°C) were performed. The PCR product was purified, digested with Notl and HindIII and used in a three-way ligation with HindIII/BamHI-digested pEC1 and the 2 kb NotI-BamHI fragment isolated from pRIT13197 (Delisse-Gathoye et al., 1990). The resulting plasmid encodes a translational fusion in which the OmpA signal peptide was substituted for the first two residues of Fha44

N-terminal maturation of FHA 75

Table 2 Strains and plasmids used in this study

Table 2. Strains	Table 2. Continued.			
Strain/Plasmid	Relevant characteristics	Reference/Source	Strain/Plasmid	Re
<u>Strain</u>			pEL1	ph
BPSM	Sm ^R Nal ^R Tohama I derivative	Menozzi <i>et al.</i> (1994)	pEV28	pВ
BPGR4	BPSM derivative with a chromosomal deletion of	Locht <i>et al.</i> (1992)		:
BPMC	BPSM derivative with a chromosomal deletion of	Locht <i>et al.</i> (1992)	pFHA1	0.5
B177	fhaB and fimA B112 derivative fhaC::kan	Willems <i>et al.</i> (1994)	pFHA2	Tra
SK39	18323 derivative <i>pt</i> x::Tn <i>PhoA</i>	Knapp and Mekalanos (1988)	pFHA4	0.5
BP347	<i>bvg</i> ::Tn <i>5</i> Vir ⁻ Tohama I derivative	Weiss <i>ét al.</i> (1983)	pFHAβgal	ו ! Tra
E. coli				t
XL1-Blue	$F'(proAB^+ ac ^q acZ\Delta M15$	Stratagene		
UT5600	ΔompT	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center (Yale	pFHAphoA	Tra
CC118	Δ lac Δ phoA	University) Manoil and Declarith (1995)	pFJD2	Τw
Plasmid		Beckwith (1985)	pFJD6 pFJD8	fha fha
Cloning vectors			heana	ITE
pBBR1MCS	Broad-host-range cloning vector derived from pBBB122	Kovach <i>et al</i> . (1994)	pFJD11	Tra
pIN-III-OmpA- Hind	Vector for translational fusions with OmpA signal	Rentier-Delrue <i>et</i> <i>al.</i> (1988)	pFJD12	Tra
pMMB67EH	Broad-host-range vector containing the tac	Fürste <i>et al.</i> (1986)	- 5 1040	-
pMMB91	Broad-host-range vector containing the tac	Fürste <i>et al.</i> (1986)	pFJU13	
pQE9, pQE32	Expression vectors containing the T5 promoter and <i>lac</i> operator sequences	Diagen	pFJD16 pNJ1	fhá Tra
Constructs			pNM482	Ve
pBG4	2.8 kb <i>Eco</i> RI- <i>Bam</i> HI fragment containing the 5'	Renauld <i>et al.</i> (1996)	pPHOA19	Się
pBG10	pBBR122	Penculd at al	pQE9::Pstl	Tra
pbdiz	containing the 5' end of	(1996)	pQHB	bv
pEC1	fragment of pIN-III-OmpA-	This work	pRIT13122	2.3
pEC11	Translational fusion encoding OmpA signal peptide plus Fha44 (residues 3–862) in	This work	pRIT13130	1.5
pEC12	pEC1 Translational fusion encoding	This work	pRIT13197	6.3
	Fha44 (residues 34–862) in pEC1		pRIT12990	fin
pEC13	Translational fusion encoding OmpA signal peptide plus Fha44 (residues 71–862) in pEC1	This work	Amp ^R , ampicilli galactosidase.	n re

Strain/Plasmid	Relevant characteristics	Reference/Source
pEL1	phoA in E. coli- mycobacteria shuttle	Kremer <i>et al.</i> (1995)
pEV28	pBR322 derivative containing the Sm28GST-coding sequence (Balloul <i>et al.</i> , 1987)	R. Pierce, Institut Pasteur de Lille
pFHA1	0.5 kb <i>Eco</i> RI- <i>Pst</i> I fragment containing the 5' end of <i>fbaB</i> in pLIC8	This work
pFHA2	Translational fusion encoding the first 84 residues of FhaB plus β-gal in pNM482	This work
pFHA4	0.5 kb <i>Ecc</i> RI- <i>Hin</i> dIII fragment of pFHA1 in pBBR1MCS	This work
pFHAβgał	Translational fusion encoding the first 84 residues of FHAB plus β-gal in pBBR1MCS	This work
pFHAphoA	Translational fusion encoding the first 84 residues of FhaB plus PhoA in pBBR1MCS	This work
pFJD2	Two <i>fhaC</i> inserts in tandem in pQE32	This work
pFJD6	fhaC in pQE32	This work
pFJD8	fhaC in pMMB67EH	This work
pFJD9	fha44 in pMMB91 under the control of Ptac	This work
pFJD11	Translational fusion encoding OmpA signal peptide plus Fha44 (residues 3–862) in pMMB91	This work
pFJD12	Translational fusion encoding OmpA signal peptide plus Fha44 (residues 34–862) in pMMB91	This work
pFJD13	Translational fusion encoding OmpA signal peptide plus Fha44 (residues 71–862) in pMMB91	This work
pFJD16	fhaC in pBBR1MCS	This work
pNJ1	Translational fusion encoding Fha44 plus Sm28GST (residues 190–211) in pBBR122	This work
pNM482	Vector for <i>lacZ</i> translational fusion	Minton (1984)
pPHOA19	Signal peptide-less phoA in pUC19	This work
pQE9::Pstl	Translational fusion His-6- FhaC in pQE9	This work
pQHB	bvgA cloned in pQE9	Boucher <i>et al.</i> (1994)
pRIT13122	2.3 kb <i>Eco</i> RI- <i>Pst</i> 1 fragment containing the 5' end of <i>fhaB</i> in pUC18	Delisse-Gathoye et al. (1990)
pRIT13130	1.5 kb <i>Eco</i> RI– <i>Sal</i> I fragment containing 5' end of <i>fhaB</i> in pUC8	Delisse-Gathoye et al. (1990)
p RIT 13197	6.3 kb <i>Eco</i> RI- <i>Bg</i> /II fragment containing the 5' end of <i>fpaB</i> in nUC8	Delisse-Gathoye et al. (1990)
pRIT12990	fimB fimC fimD fhaC in pBR327	Delisse-Gathoye et al. (1990)

picillin resistant; Km^R, kanamycin resistant; β-gal, βgalactosidase.

76 F. Jacob-Dubuisson et al.

(Fig. 5). The entire *Not*I–*Hin*dIII PCR fragment was sequenced using the sequencing kit of Pharmacia to ensure that no mutation had occurred. pEC11 was digested with *Xba*I, the site was filled in using Klenow and the linearized plasmid was redigested with *Bam*HI. The 2.9kb fragment containing the fusion was cloned into the *Eco*RI (blunted) and *Bam*HI sites of pMMB91, placing the chimeric gene under the control of the *tac* promoter. Because of the absence of a translational stop in the *Bam*HI site of *fhaB*, 18 amino acid residues encoded by vector DNA were added at the C-terminal end of Fha44.

pEC12 and pEC13, pFJD12 and pFJD13 were constructed in a similar fashion to pEC11 and pFJD11, respectively, except that the *Hind*III primers used with the *Not*I primer to amplify the 5' end of *fhaB* were TCA<u>AAGCTTCGCGTGGT-</u> AAGCGCGAAG for pEC12 (yielding a PCR product of 520 bp) and ATT<u>AAGCTTCCCAGGGCTTGGTTCCTCAG</u> for pEC13 (yielding a PCR product of 410 bp). pEC12 and pFJD12 encode a translational fusion in which the OmpA signal peptide is substituted for the first 33 residues of Fha44, whereas pEC13 and pFJD13 encode a translational fusion in which the OmpA signal peptide is substituted for the first 70 residues of Fha44 (Fig. 5).

Cell fractionation

To obtain cellular extracts enriched in outer membrane proteins, liquid B. pertussis cultures were centrifuged after reaching an optical density of approximately 2 at 600 nm. Cells were washed in 50 mM Hepes (pH 7.4), resuspended in a small volume (1/10 of the original culture volume) of the same buffer and lysed by sonication on ice. A 15 min centrifugation at 8000 \times g was performed at 4°C to pellet the cell debris. The supernatant was then centrifuged at $100\,000 \times g$ for 60 min at 15°C, and the resulting membrane pellet was frozen, thawed and resuspended in the same volume of 50 mM Hepes (pH 7.4) buffer containing 1% sarkosyl. After a 30 min incubation at 20°C, the suspension was centrifuged at 100000 $\times g$ for 60 min at 15°C. The resulting pellet was enriched in outer membrane proteins, as shown by the presence of a strong porin band upon analysis of the preparation by SDS-PAGE. A similar procedure was used to prepare outer membrane extracts of E. coli strains containing fhaC after the cultures had been treated for 2-3h with IPTG (Promega).

Protein analyses

Where stated, proteins of *E. coli* supernatants were concentrated by precipitation using 6% trichloroacetic acid and 20 mM deoxycholate prior to SDS–PAGE analysis. They were resuspended in a small volume of 100 mM Tris-HCl (pH8) and electrophoresis buffer according to Laemmli (1971).

Proteins were separated by SDS-PAGE using 12% polyacrylamide gels, unless otherwise stated, and stained with Coomassie brilliant blue. Alternatively, proteins were electrotransferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) for immunoblotting. The blots were developed using rat anti-Fha44 (Renauld *et al.*, submitted) or anti-FhaC antisera diluted 500fold in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.1% Tween and 1% BSA, followed by alkaline-phosphatase conjugated goat anti-rat immunoglobulin G. Colony immunoblots were developed as described above except that colonies were lifted onto nitrocellulose sheets directly from agar plates containing 10 μ M IPTG in addition to the required antibiotics.

Purification of Fha44

The purification of FHA and Fha44 was performed by affinity chromatography as described by Menozzi *et al.* (1991). Briefly, culture supernatants of *B. pertussis* or of IPTG-treated *E. coli* were collected, filtered on $0.45 \,\mu$ m membranes and loaded onto a 3 ml heparin–Sepharose column equilibrated in PBS. The columns were washed extensively in PBS, and the bound proteins were eluted by 500 mM NaCl in PBS. The fractions corresponding to the elution peak were collected and analysed by SDS–PAGE and immunoblotting.

N-terminal sequencing

After SDS-PAGE using a 12% acrylamide gel, liquid electrotransfer of Fha44 onto PVDF was performed in 50 mM Tris, 50 mM boric acid at 18° C overnight. The membranes were then stained with H₂O:methanol:acetic acid (45:45:10) containing 0.003% Amido Black, and destained in distilled water. N-terminal sequence determinations were performed at the Laboratoire de Microséquençage des Protéines, Institut Pasteur à Paris, using an Applied Biosystems 476 sequencer.

Production of anti-FhaC antibodies

E. coli TG1(pQE9::Pst) was grown in LB until the optical density at 600 nm reached 0.6. IPTG was then added to a final concentration of 2 mM, and incubation was continued for an additional 5 h. The cells were then harvested by centrifugation and frozen to -20° C, thawed and resuspended in 6 M quanidinium chloride, 100 mM sodium phosphate, 10 mM Tris-HCl (pH 8) (lysis buffer). After stirring for 1 h at room temperature, the cell lysate was centrifuged, and the supernatant was slowly loaded onto a Ni-nitrilotriacetic acid agarose column previously equilibrated in lysis buffer. The column was washed with 10 vol. of lysis buffer; 5 vol. of 8 M urea, 100 mM sodium phosphate, 10 mM Tris-HCl (pH8) (urea buffer); and several volumes of urea buffer at pH6.3. Elution of the recombinant protein was performed by urea buffer at pH5.9. The eluted fractions were analysed by SDS-PAGE and Coomassiebrilliant-blue staining. The fraction containing the highest amount of purified protein was extensively dialysed against 0.9% NaCl and used to immunize 3 male Fischer rats (50 µg per rat). A booster injection was performed after 6 weeks, and serum was taken 5 weeks after boosting. The antisera of the immunized animals were found to react with the recombinant His-6--FhaC protein in contrast to those of nonimmunized animals, as determined by immunoblotting.

Other immunological techniques

ELISA was performed according to standard procedures (Harlow and Lane, 1988) using 96-well Immunoplates (Nunc). The Fha44 samples were analysed in serial two-fold dilutions by directly coating $50 \,\mu$ I of unconcentrated culture supernatant per well. The anti-Fha44 antiserum was used at a 500-fold

dilution and the goat anti-rat alkaline-phosphatase conjugated immunoglobulin G at a 5000-fold dilution.

Haemagglutination assays

A 1% suspension of rabbit red blood cells in PBS was distributed in the rounded-bottom well microtitre plates, and serial two-fold dilutions of Fha44 in PBS were added. The titre was determined as the maximal dilution at which positive haemagglutination was detected.

Determination of enzymatic activities

The β-galactosidase phenotype of *E. coli* was detected on LB agar plates supplemented with 0.5 mM IPTG and 50 μ g mI⁻¹ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (Xgal, Promega). The PhoA phenotype of E. coli was assayed on LB agar plates containing 0.5 mM IPTG and 40 µg ml⁻¹ 5-bromo-4chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP, Promega). The procedure used to measure β-galactosidase activity in liquid cultures was adapted from Miller (1972). E. coli cells were grown in LB. The expression of bvgA was induced using 1 mM IPTG for 2-3h and the cells were harvested by centrifugation. The cell pellet was resuspended in 1/5 vol. of 100 mM sodium phosphate (pH7) containing 10 mM KCI, 1 mM MgSO₄ and 50 mM β -mercaptoethanol, and sonicated. Aliquots of the clarified sonicates were incubated with orthonitrophenyl-β-p-galactoside (Sigma) at 30°C. The enzymatic reaction was followed spectrophotometrically at A420 and the initial velocity was calculated using the linear portion of the kinetic curve.

Alkaline-phosphatase activity was measured as described by Manoil (1991). Liquid cultures of B. pertussis or IPTGtreated E. coli were centrifuged, the cell pellet was resuspended in 1/10 vol. of 1 M Tris-HCl (pH 8). Cells were sonicated and clarified sonicates used for the enzymatic reaction. Paranitrophenyl phosphate was added to a final concentration of 2.5 mM and the enzymatic reaction was followed at spectrophotometrically at A₄₂₀. Initial velocities were determined as above. The enzymatic activities were standardized by the determination of protein concentrations using the Bio-Rad protein assay kit. When applicable, the determination of the plasmid-borne chloramphenicol-transferase activity ensured approximately equal plasmid copy numbers in the different strains. This assay was performed as described by Shaw (1975). Briefly, aliguots of the cell extracts were diluted in 100 mM Tris-HCI (pH 7.8) and mixed with 0.1 mM acetylcoenzyme A (Sigma), 0.4 mg ml⁻¹ 5,5' dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (Sigma) and 0.1 mM chloramphenicol (final concentrations). The reaction was followed at A_{412} .

Acknowledgements

We wish to thank V. Germain and J. Cornette for the production of anti-FhaC antibodies; N. P. Minton, M. Kovach, M. Bagdasarian, J. Martial, and R. Pierce for plasmids; C. Manoil for *E. coli* CC118; J. J. Mekalanos for *B. pertussis* SK39; A. Weiss and S. Falkow for *B. pertussis* BP347; E. Fort for photography; and E. Pradel for critical reading of the manuscript. Dimethyl- β -cyclodextrin was kindly provided by H. Ikeda (Teijin Ltd.). C.B. and N.M. hold fellowships of the Region Nord-Pas de Calais, and F. J.-D. holds an INSERM post-doctoral fellowship. The work was supported by a European Community Biotechnology grant, by INSERM, Institut Pasteur de Lille, and Région-Nord-Pas de Calais.

References

- Balloul, J.M., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J.M., Pierce, R.J., Carvallo, D., Lecocq, J.P., and Capron, A. (1987) Molecular cloning of a protective antigen of Schistosomes. *Nature* **326**: 149–153.
- Barenkamp, S., 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, III, J.W. (1994) Genes encoding high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* are part of gene clusters. *Infect Immun* 62: 3320–3328.
- Bieker, K.L., and Silhavy, T.J. (1989) PrIA is important for the translocation of exported proteins across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* USA 86: 968–972.
- Boucher, P.E., Menozzi, F.D., and Locht, C. (1994) The modular architecture of bacterial response regulator. Insight into the activation mechanism of the BvgA transactivator of *Bordetella pertussis. J Mol Biol* 241: 363–367.
- Brown, D.R., and Parker, C.D. (1987) Cloning of the filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis* and its expression in *Escherichia coli*. Infect Immun **55**: 154–161.
- Burnette, W.N., Mar, V.L., Cieplak, W., Morris, C.F., Kaljot, K.T., Marchitto, K.S., Sachdev, R.K., Locht, C., and Keith, J.M. (1988) Direct expression of *Bordetella pertussis* toxin subunits to high levels in *Escherichia coli. Biotechnology* 6: 699–706.
- Delisse-Gathoye, A.-M., Locht, C., Jacob, F., Raaschou-Nielsen, M., Heron, I., Ruelle, J.-L., De Wilde, M., and Cabezon, T. (1990) Cloning, partial sequence, expression and antigenic analysis of the filamentous hemagglutinin gene of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 58: 2895–2905.
- Domenighini, M., Relman, D., Capiau, C., Falkow, S., Prugnola, A., Scarlato, V., and Rappuoli, R. (1990) Genetic characterization of *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. *Mol Microbiol* 4: 787–800.
- Forsberg, A., Rosqvist, R., and Wolf-Watz, H. (1994) Regulation and polarized transfer of the *Yersinia* outer proteins (Yops) involved in antiphagocytosis. *Trends Microbiol* **2**: 14–19.
- Fürste, J.P., Pansegrau, W., Frank, R., Blöcker, H., Scholz, P., Bagdasarian, M., and Lanka, E. (1986) Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-hostrange *tacP* expression vector. *Gene* **48**: 119–131.
- Guzman, C.A., Brownlie, R.M., Kadurugamuwa, J., Walker, M.J., and Timmis, K.N. (1991) Antibody responses in the lungs of mice following oral immunization with *Salmonella typhimurium aroA* and invasive *Escherichia coli* strains expressing the filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis. Infect Immun* **59**: 4391–4397.
- Hannah, J.H., Menozzi, F.D., Renauld, G., Locht, C., and Brennan, M.J. (1994) Sulfated glycoconjugate receptors for

78 F. Jacob-Dubuisson et al.

the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. *Infect Immun* **62:** 5010–5019.

- Harlow, E., and Lane, D. (1988) Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Jacob F., Capiau, C., Gathoye, A.-M., Locht, C., and Cabezon, T. (1988) Molecular cloning of the filamentous hemagglutinin structural gene from *Bordetella pertussis* in *Escherichia coli*. In *FEMS Symposium on pertussis*. Mebel, S., Stompe, H., Drescher, M., and Rustenbach, S. (eds). Berlin: Society of Microbiology and Epidemiology of the GDR, pp. 62–68.

Knapp, S., and Mekalanos, J.J. (1988) Two *trans*-acting regulatory genes (*vir* and *mod*) control antigenic modulation in *Bordetella pertussis*. J Bacteriol **170**: 5059–5066.

- Koronakis, V., and Hughes, C. (1993) Bacterial signal-peptide independent protein export: HlyB-directed secretion of hemolysin. *Seminars Cell Biol* **4**: 7–15.
- Kovach, M.E., Phillips, R.W., Elzer, P.H., Roop, R.M.I., and Peterson, K.M. (1994) pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Bio/Techniques* 16: 800–802.
- Kremer, L., Baulard, A., Estaquier, J., Content, J., Capron, A., and Locht, C. (1995) Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* 85A antigen promoter region. *J Bacteriol* **177:** 642–653.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Locht, C., Geoffroy, M.C., and Renauld, G. (1992) Common accessory genes for the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the *papC* and *papD* gene families. *EMBO J* **11**: 3175– 3183.
- Locht, C., Bertin, P., Menozzi, F.D., and Renauld, G. (1993) The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesin produced by virulent *Bordetella* spp. *Mol Microbiol* **9**: 653–660.
- Lory, S. (1992) Determinants of extracellular protein secretion in Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **174**: 3423–3428.
- Makhov, A.M., Hannah, J.H., Brennan, M.J., Trus, B.L., Kocsis, E., Conway, J.F., Wingfield, P.T., Simon, M.N., and Steven, A.C. (1994) Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: a bacterial adhesin formed as a 50 nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in β-strands and turns. *J Mol Biol* 241: 110–124.
- Manoil, C. (1991) Analysis of membrane protein topology using alkaline phosphatase and β-galactosidase gene fusions. *Meth Cell Biol* **34**: 61–75.
- Manoil, C., and Beckwith, J. (1985) Tn*phoA*: a transposon probe for protein export signals. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 8129–8133.
- Menozzi, F.D., Gantiez, C., and Locht, C. (1991) Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with heparin. *FEMS Microbiol Lett* **78:** 59–64.
- Menozzi, F.D., Mutombo, R., Renauld, G., Gantiez, C., Hannah, J., Leininger, E., Brennan, M., and Locht, C. (1994) Heparininhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis. Infect Immun* **62:** 769–778.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics.* Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Minton, N.P. (1984) Improved plasmid vectors for the isolation of translational *lac* gene fusions. *Gene* **31**: 269–273.
- Molina, C., and Parker, C.D. (1990) Murine antibody response to oral infection with live *aro*A recombinant *Salmonella dublin* vaccine strains expressing filamentous hemagglutinin antigen form *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 58: 2523–2528.
- Poole, K., Schiebel, E., and Braun, V. (1988) Molecular characterization of the hemolysin determinant of *Serratia marcescens. J Bacteriol* **170**: 3177–3188.
- Pugsley, A.P. (1993) The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* 57: 50–108.
- Renauld-Mongénie, G., Cornette, J., Mielcarek, N., Menozzi, F.D., and Locht, C. (1996) Distinct roles of the N-terminal and C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. J Bacteriol, in press.
- Rentier-Delrue, F., Swennen, D., and Martial, J. (1988) pIN-III-ompA secretion vectors: modification of the ompA signal peptide sequence for easier insert cloning. Nucl Acids Res 16: 8726.
- Salmond, G.P.C., and Reeves, P.J. (1993) Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Biochem Sci* **18**: 7–12.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sato, Y., Kimura, M., and Fukumi, H. (1984) Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet* i: 124–126.
- Schönherr, R., Tsolis, R., Focareta, T., and Braun, V. (1993) Amino acid replacements in the *Serratia marcescens* haemolysin ShIA define sites involved in activation and secretion. *Mol Microbiol* **9:** 1229–1237.
- Shaw, W.V. (1975) Chloramphenicol acetyl transferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Meth Enzymol* 43: 737–755.
- 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.
- Van Gijsegem, F., Genin, S., and Boucher, C. (1993) Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. *Trends Microbiol* 1: 175–180.
- Wandersman, C. (1992) Secretion across the bacterial outer membrane. *Trends Genet* 8: 317–322.
- Wattiau, P., Bernier, P., Deslée, P., Michiels, T., and Cornelis, G.R. (1994) Individual chaperones required for Yop secretion by Yersinia. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10493–10497.
- Weiss, A.A., and Hewlett, E.L. (1986) Virulence factors of Bordetella pertussis. Annu Rev Microbiol 40: 661-686.
- Weiss, A.A., Hewlett, E.L., Myers, G.A., and Falkow, S. (1983) Tn5-induced mutations affecting virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **42**: 33–41.
- Willems, R.J.L., Geuijen, C., van der Heide, H.G.J., Renauld, G., Bertin, P., van der Akker, W.M.R., Locht, C., and Mooi, F.R. (1994) Mutational analysis of the *Bordetella pertussis fim/fha* gene cluster: identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA. *Mol Microbiol* **11**: 337–347.

© 1996 Blackwell Science Ltd, Molecular Microbiology, 19, 65-78

Article 2. Caractérisation de la région N-terminale de la FHA de B. pertussis

Depuis la publication en 1990 de la séquence du gène *fhaB*, plusieurs questions concernant la région N-terminale du précurseur de la FHA (FhaB) restaient à résoudre. En premier lieu, l'extrémité 5' de *fhaB* contient 3 codons ATG en phase, mais aucun d'eux n'est précédé par une séquence consensus de Shine-Dalgarno susceptible de nous renseigner sur la position du codon d'initiation de la traduction de *fhaB*. Nous avons converti chacun des trois ATG de *fhaB* en CTG par mutagenèse dirigée. Le remplacement de la première méthionine par une leucine a eu pour effet une réduction considérable de la production de la Fha44 chez *B. pertussis*. Par contre, le remplacement des 2 autres méthionines n'affecte pas la production de la Fha44. Ceci indique que la traduction de *fhaB* est initiée au premier ATG.

Dans l'article 1, nous avons montré que le précurseur de la FHA (FhaB) subit une maturation N-terminale de 8-9 kDa. Cependant, le site exact de cette maturation n'était pas connu. En effet, la FHA sécrétée chez B. pertussis est réfractaire au séquençage N-terminal, en raison d'une modification covalente de son premier résidu. Par contre, dans le même article, et en raison de l'absence de cette modification chez E. coli, nous avons pu déterminer le premier résidu de la Fha44 sécrétée chez cette bactérie: il s'agit de la glutamine en position 72 par rapport à la méthionine initiatrice. Cette glutamine se situe immédiatement après un site de clivage potentiel par une signal-peptidase de type LepB. Nous avons donc changé la glutamine 72 en leucine par mutagenèse dirigée. Le choix de la leucine reposait sur les propriétés de ce résidu, qui possède une chaîne latérale peu réactive et donc peu favorable à une modification. De plus, une leucine en position +1 par rapport au site de clivage de la séquence-signal est compatible avec la maturation par la signalpeptidase. La mutation a été introduite par recombinaison homologue chez B. pertussis dans le gène fhaB chromosomique. La protéine mutée FHA-Q72L a ensuite été purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne d'héparine et soumise à un séquençage N-terminal. La séquence N-terminale obtenue (LGLVP) suggérait fortement que le premier résidu de la FHA produite chez B. pertussis est aussi la glutamine 72.

Les glutamines situées en position N-terminale d'une protéine ou d'un peptide sont capables de se cycliser pour former un pyroglutamate qui bloque le séquençage N-terminal (figure 19). Un enzyme disponible commercialement, la pyroglutamate aminopeptidase, clive spécifiquement de tels résidus pyroglutamates. La séquence N-terminale commence alors par le second résidu de la protéine ou du peptide. La FHA purifiée a donc été traitée par la pyroglutamate aminopeptidase. Suite à ce traitement, nous avons obtenu la séquence N-terminale GLVP, ce qui démontre que le premier résidu de la FHA sécrétée chez *B. pertussis* est un pyroglutamate. Puisque cette modification n'a pas lieu chez *E. coli*, elle pourrait impliquer des facteurs spécifiques de *B. pertussis*.

La détermination du codon d'initiation de *fhaB* et du résidu N-terminal de la FHA mature indique que FhaB est synthétisé avec une séquence-signal anormalement longue de 71 résidus. Les 22 premiers résidus de FhaB sont homologues aux extrémités N-terminales des précurseurs de 8 autres protéines connues à l'heure actuelle, et sécrétées par différentes bactéries à Gram négatif. Cette séquence conservée a été baptisée "extension N-terminale" (Benjelloun-Touimi *et al.*, 1995). Afin d'étudier le rôle de l'extension N-terminale de la FHA, nous avons délété la séquence correspondante par mutagenèse dirigée. Cependant, nous n'avons observé aucun effet de cette délétion sur la sécrétion de la FHA chez *B. pertussis*. D'autre part, nous avons étudié l'influence possible de l'extension N-terminale sur l'exportation d'une protéine possédant un peptide-signal classique. Pour cela, nous l'avons fusionnée à l'extrémité N-terminale du précurseur de la sous-unité B de la toxine du choléra (CtxB). Curieusement, l'exportation de CtxB à travers la membrane cytoplasmique de *E. coli* et le clivage de son peptide-signal ne sont pas affectés par la présence de l'extension N-terminale de FhaB.

Les 22 premiers résidus de FhaB ne sont donc pas cruciaux pour la production et la sécrétion de la FHA. Par contre, une délétion plus longue correspondant aux 32 premiers résidus de FhaB entraîne une absence de production de la FHA. Nous avons détecté en aval de l'ATG initiateur de *fhaB* trois courtes séquences complémentaires à la région 3' de l'ARN ribosomal 16S de *B. pertussis*. Des séquences de ce type, appelées "downstream boxes" sont nécessaires pour l'expression de certains gènes de *E. coli* et de bactériophages. Nous proposons que l'initiation de la traduction de *fhaB* ne dépend pas d'une séquence de Shine-Dalgarno, mais de "downstream boxes". Ces séquences sont éliminées dans notre délétion longue, ce qui expliquerait l'absence de production de la FHA.

Nous nous sommes également intéressés aux 3 seules cystéines de FhaB, qui sont toutes situées dans la séquence-signal clivée. Ces 3 cystéines ont été individuellement changées en sérine par mutagenèse dirigée. Ces mutations n'ont pas affecté la sécrétion de la Fha44. Par contre, les extrémités N-terminales des protéines mutées ne sont pas modifiées, suggérant que les cystéines de FhaB pourraient influencer la cyclisation de la glutamine située à l'extrémité N-terminale de la FHA mature.

L'article décrivant l'ensemble de ces résultats a été accepté pour publication dans *Molecular Microbiology*.



Figure 19. Réaction de cyclisation de la glutamine en pyroglutamate

N-terminal characterization of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin

Corinne Lambert-Buisine, Eve Willery, Camille Locht and Françoise Jacob-Dubuisson*

INSERM U447, IBL, Institut Pasteur de Lille, rue du Prof Calmette, 59019 Lille Cedex, France.

Summary

The major adhesin of Bordetella pertussis, filamentous haemagglutinin (FHA), is produced and secreted at high levels by the bacterium. Mature FHA derives from a large precursor, FhaB, that undergoes several post-translational maturations. In this work, we demonstrate by site-directed mutagenesis that the N-terminal signal peptide of FHA is composed of 71 amino acids. including a 22-residue-long 'N-terminal extension' sequence. This sequence, although highly conserved in various other secretory proteins, does not appear to play an essential part in FHA secretion, as shown by deletion mutagenesis. The entire N-terminal signal region of FhaB is removed in the course of secretion by proteolytic cleavage at a site that corresponds to a Lep signal peptidase recognition sequence. After this maturation, the N-terminal glutamine residue is modified to a pyroglutamate residue. This modification is not crucial for heparin binding, haemagglutination or secretion. Interestingly, however, the modification is absent from Escherichia coli secreted FHA derivatives. In addition, it is dependent in B. pertussis on the presence of all three cysteines contained in the signal peptide of FhaB. These observations suggest that it does not occur spontaneously but perhaps requires a specific enzymatic machinery.

Introduction

Adherence of microbial pathogens is considered an early and necessary step in host colonization. Two main types of bacterial adhesins can be distinguished: pili or fimbriae and non-pilus or afimbrial adhesins (Hultgren *et al.*, 1993). Afimbrial adhesins are often large, abundant and sometimes multiadhesive surface proteins (Westerlund and Korhonen, 1993). *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, synthesizes at least five different

Received 17 December, 1997; revised 17 March, 1998; accepted 23 March, 1998. *For correspondence. E-mail francoise.jacob@pasteurlille.fr; Tel. (3) 20 87 11 55; Fax (3) 20 87 11 58. adhesive factors (Rappuoli, 1994). The main adhesin of *B. pertussis*, filamentous haemagglutinin (FHA), is a 220 kDa protein with no fewer than four recognized adhesive activities and a complex biogenesis pathway (Berggard *et al.*, 1997; Locht *et al.*, 1993). In addition to its importance in bacterial adherence, FHA is one of the best secreted proteins of Gram-negative organisms, a property that can be exploited for secretion or surface display of passenger proteins (Renauld-Mongénie *et al.*, 1996a). Its secretion depends on a single specific accessory protein, FhaC, located in the outer membrane (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1996; Willems *et al.*, 1994). Despite these interesting properties, the N-terminus of FHA has so far remained poorly characterized.

Mature FHA derives from a much longer, 367 kDa precursor named FhaB (Delisse-Gathoye et al., 1990; Domenighini et al., 1990). FhaB undergoes an extensive proteolytic maturation of its C-terminal third in the course of secretion (Arico et al., 1993; Domenighini et al., 1990) and the removal of an 8-9kDa N-terminal segment (Jacob-Dubuisson et al., 1996). The precise site of this latter proteolytic cleavage has not been determined because mature FHA is refractory to N-terminal sequencing, most probably because of a post-translational modification (Delisse-Gathoye et al., 1990; Domenighini et al., 1990). The molecular nature of this N-terminal modification has also remained elusive. Likewise, the N-terminal signal peptide of FHA is poorly characterized. In particular, the start codon of *fhaB* has not yet been defined because of the lack of typical translational initiation signals 5' of the three potential initiation codons present in that region (Delisse-Gathoye et al., 1990).

In this study, we demonstrate that FhaB is synthesized with a 71-amino-acid-long signal peptide comprising a 22-residue-long N-terminal extension highly similar to the N-terminal extremity of several other bacterial protein precursors, such as SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri* (Benjelloun Touimi *et al.*, 1995). In spite of its high degree of conservation among various protein precursors, this sequence does not appear to be essential for FHA production and secretion. We determined the N-terminal residue of mature FHA and characterized the molecular nature of its post-translational modification as a pyroglutamate cyclization. This modification, performed only in *B. pertussis* and not in *Escherichia coli*, is dependent on the presence of all three cysteines in the signal peptide of FHA.

Results

Identification of the initiation codon of fhaB

The 5' region of the *fhaB* gene possesses three potential ATG initiation codons, none of which is preceded by a sequence resembling the Shine–Dalgarno consensus. To identify the *fhaB* initiation codon, each of the three ATG codons was individually converted into CTG by site-directed mutagenesis. Each mutant DNA fragment was substituted for the wild-type sequence in pFJD9, which encodes Fha-44, an 80 kDa N-terminal derivative of FHA (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1996). Like FHA, Fha-44 is efficiently secreted by *B. pertussis* in the presence of FhaC (Renauld-Mongénie *et al.*, 1996b). The resulting plasmids, pFJD9-M1→L, pFJD9-M2→L, and pFJD9-M3→L, were introduced into *B. pertussis* BPGR4, a strain with a chromosomal deletion of *fhaB*.

Replacement of the first methionine by leucine (see Fig. 1A) resulted in considerable reduction in the quantity

of Fha-44 detected in culture supernatants (Fig. 2) and in cellular extracts (not shown) of *B. pertussis*. In contrast, the levels of Fha-44 in the supernatants of cells harbouring pFJD9-M2 \rightarrow L or pFJD9-M3 \rightarrow L were similar to that of wild-type (WT) Fha-44 produced by BPGR4(pFJD9) (Fig. 2), indicating that the *fhaB* open reading frame (ORF) most likely starts at the first ATG.

The residual amount of Fha-44 produced in strain BPGR4(pFJD9-M1 \rightarrow L) could be due to the use of either the second or the third ATG as an alternative initiation codon, translational initiation at the mutated CTG codon or initiation at another site such as an in-frame GTG codon. To distinguish between these possibilities, we constructed the double mutants pFJD9-M1 \rightarrow L/M2 \rightarrow L and pFJD9-M1 \rightarrow L/M3 \rightarrow L. These additional substitutions did not further decrease the level of Fha-44 production (Fig. 2), indicating that the second or third in-frame ATG is probably not used as the initiation codon.



Fig. 1. A. Schematic representation of the mutations introduced in the N-terminal sequence of FhaB. The + and - symbolize positively and negatively charged residues, respectively; the hydrophobic segment is boxed and followed by the predicted signal peptide cleavage site (large arrow). Residues of the N-terminal extension are bold-faced.

B. Sequence alignment of the N-terminal extensions found in various bacterial secretory proteins: *S. flexneri* SepA (line 1); *E. coli* Tsh (line 2) and AIDA-I (line 3); *B. pertussis* FHA (line 4); *H. influenzae* HMWA (line 5), Hsf (line 6) and Hia (line 7). Residues conserved or with similar physical properties in at least four sequences are bold-faced.



Fig. 2. Effect of methionine replacements on Fha-44 production. Culture supernatants of *B. pertussis* BPGR4(pFJD9-M1→L/ M2→L), BPGR4(pFJD9-M1→L/M3→L), BPGR4(pFJD9-M1→L), BPGR4(pFJD9-M2→L), and BPGR4(pFJD9-M3→L) were analysed by immunoblotting using an anti-Fha-44 rat antiserum. The positive control (WT) was a BPGR4(pFJD9) culture supernatant. Equal volumes of unconcentrated supernatants from liquid cultures whose optical density at 600 nm was about 5 were loaded in all lanes. The gel was overloaded and the blot was overdeveloped in order to visualize residual amounts of Fha-44 secreted by the M1→L mutants. The position of Fha-44 is indicated in the right margin. As previously observed (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1997), several proteolytic cleavage products of Fha-44 were present in all samples. The sizes of the molecular weight markers (in kDa) are given in the left margin.

Identification of the N-terminal residue of mature FHA

Previous attempts to identify the N-terminal residue of mature FHA have failed because it is refractory to Edman degradation, most probably because of a post-translational modification (Delisse-Gathoye et al., 1990; Domenighini et al., 1990). However, Gln-72 has been predicted to be the first residue of FHA because it is situated immediately after a typical Lep signal peptidase cleavage site (Delisse-Gathoye et al., 1990). To determine if Gln-72 may be the modified N-terminal residue of mature FHA, this residue was changed to leucine by site-directed mutagenesis. The mutation was introduced into the chromosomal fhaB gene using the FHA-deficient B. pertussis strain BPCB and pCB5-Q72→L, a non-replicative plasmid containing the mutant fha44 gene and a 3' flanking sequence for homologous recombination. Mutant FHA was found in B. pertussis culture supernatants in similar amounts as in the wild-type protein (not shown). The mutant protein FHA-Q72→L was purified from the culture supernatant of BPCB(pCB5-Q72→L) using affinity chromatography on heparin-sepharose and subjected to N-terminal sequencing. The N-terminal sequence of FHA-Q72→L was LGLVP, strongly suggesting that modified GIn-72 is the N-terminal residue of wild-type FHA.

N-terminal glutamines are known to sometimes form cyclic pyroglutamyl residues (pGlu), which render such proteins refractory to Edman degradation (Hirano *et al.*, 1993). Pyroglutamate aminopeptidase (PAP) is able to specifically remove N-terminally located pGlu, permitting

N-terminus of FHA 1285

the Edman degradation of the rest of the protein (Hirano *et al.*, 1993). To investigate the possibility that the N-terminal residue of FHA may be pGlu, purified FHA was treated with PAP before N-terminal sequencing. After PAP treatment, the N-terminal sequence of FHA was GLVP, indicating that PAP had removed the pGlu and thereby confirming that the N-terminal residue of mature FHA is pGlu.

To test whether this N-terminal modification plays a role in FHA-mediated haemagglutination, culture supernatants of BPCB(pCB5-Q72 \rightarrow L) were compared with those of wild-type *B. pertussis.* Mutant FHA-Q72 \rightarrow L and wild-type FHA did not notably differ in terms of their haemagglutination activities (not shown).

Analysis of the N-terminal extension

Determination of the *fhaB* initiation codon and of the N-terminal residue of mature FHA demonstrates that the FHA signal peptide is unusually long with 71 amino acid residues. Interestingly, the first 22 residues of this signal peptide present strong sequence similarities with the N-terminal extremities of the precursors of several other large proteins secreted by various other Gram-negative pathogens. This sequence has been termed N-terminal extension (Benjelloun Touimi *et al.*, 1995) (Fig. 1B).

To investigate whether the N-terminal extension plays a role in FHA export, we deleted the corresponding DNA sequence by site-directed mutagenesis, giving rise to pFJD9- Δ ext2 (Fig. 1A). This construct corresponds to the Asn-2/Glu-22 deletion. In addition, pFJD9- Δ ext1 was constructed to provide Fha-44 with a seemingly classical signal peptide. It contains the Asn-2/Gly-32 deletion. These plasmids were then introduced into BPGR4.



Fig. 3. Effect of N-terminal deletions on Fha-44 secretion. Culture supernatants of *B. pertussis* BPGR4(pFJD9- Δ ext1) and BPGR4(pFJD9- Δ ext2) were analysed by immunoblotting using anti-Fha-44 IgY. The same volumes of unconcentrated supernatants from liquid cultures whose optical density at 600 nm was about 4.5 were loaded in all lanes. The negative and positive (WT) controls were culture supernatants of BPGR4 and BPGR4(pFJD9), respectively. The sizes of the molecular weight markers (in kDa) are given in the left margin, and the position of Fha-44 is given in the right margin.

1286 C. Lambert-Buisine, E. Willery, C. Locht and F. Jacob-Dubuisson



Fig. 4. Pulse labelling in *B. pertussis.* BPSM (lanes 1–3), BPGR4 (lanes 4–6) and BPCB(pCB5- Δ ext1) (lanes 7–9) were pulse-labelled for 20 min and chased for the indicated times. The proteins were precipitated and analysed by SDS–PAGE and autoradiography. The portion of the gel containing FHA is shown. pFHA, position of the FhaB precursor, mFHA, position of mature FHA.

Hardly any Fha-44 was detected in culture supernatants (Fig. 3) and cellular extracts (not shown) of BPGR4(pFJD9- Δ ext1), suggesting that the first 32 amino acids of the signal peptide are important for Fha-44 production and/or secretion. In contrast, the shorter Δ ext2 deletion did not affect Fha-44 production/secretion (Fig. 3). We then placed these mutations in the context of full-length FHA using *B. pertussis* BPCB and pCB5- Δ ext2 or pCB5- Δ ext1. SDS–PAGE analysis of culture supernatants showed that BPCB(pCB5- Δ ext2) secreted the same quantity of FHA as the positive control BPCB(pCB5-W), bearing a wild-type *fhaB* copy in the BPCB chromosome (not shown). These results demonstrate that the 22 residue N-terminal

Δ

extension of FhaB is not crucial for FHA production and secretion. In contrast, the deletion encompassing the larger Asn-2/Gly-32 segment [in BPCB(pCB5- Δ ext1)] resulted in the absence of secreted FHA (not shown). In addition, no FHA was found to be cell associated (not shown). To distinguish between a lack of synthesis or a defect in secretion, a pulse-labelling experiment was performed. Labelled FHA and its high-*M*_r FhaB precursor were clearly detected in FHA-producing *B. pertussis* BPSM, whereas no such proteins were present in BCPB(pCB5- Δ ext1) or in *B. pertussis* BPGR4 (Δ fhaB) (Fig. 4). These results provide support to the notion that FHA bearing the 32 residue deletion was either not synthesized or synthesized at extremely low levels, rather than being unstable or secretion incompetent.

Fusion of the FhaB N-terminal extension to CtxB

To test the effect of the N-terminal extension on export and processing of a protein with a typical signal peptide, we used the cholera toxin B subunit (CtxB) as a model system. Three different plasmids were constructed (Fig. 5A). pFJD56 contains ctxB with its own signal sequence coding region. In pFJD57, the fragment encoding the first 22 amino acids of FhaB replaces the initiation ATG of ctxB. In pFJD62, the sequence fused to ctxB encodes the first

MIKLKFGVFFTVLLSSAYAHG - mCtxB

MNTNLYRLVFSHVRGMLVPVSELKLKFGVFFTVLLSSAYAHG - mCtxB

MNTNLYRLVFSHVRGMLVPVSEHCTVGNTFCGRELKLKFGVFFTVLLSSAYAHG - mCtxB



Fig. 5. A. Schematic representation of the fusions between FhaB and CtxB using the single-letter code. The first line shows CtxB with its own signal peptide, as encoded in pFJD56. The second line represents the translational fusion between the first 22 residues of FhaB (bold letters) and CtxB, as encoded in pFJD57. In the third construct, pFJD62, the first 33 amino acids of FhaB are fused to CtxB. Underlined residues have been introduced because of cloning procedures, and mCtxB represents mature CtxB. B. Immunoblot analysis of CtxB hybrids produced in *E. coli*. Cell extracts of *E. coli* M15(pREP4) (lane 1), M15(pREP4, pFJD56) (lane 2), M15(pREP4, pFJD57) (lane 3) and M15(pREP4, pFJD62) (lane 4) were analysed by immunobloting using an anti-CtxB polyclonal antiserum. Similar amounts of total proteins from clarified sonicates were loaded in lanes 1–4. The position of mature CtxB (mCtxB) is indicated in the right margin, and arrowheads show the CtxB precursor forms corresponding to the three constructs. The sizes of the molecular weight markers (in kDa) are given in the left margin.

© 1998 Blackwell Science Ltd, Molecular Microbiology, 28, 1283-1293

33 amino acids of FhaB. For each construct, a classical Shine–Dalgarno sequence is present 5' of the initiation codon. These plasmids were introduced into *E. coli* M15(pREP4), and the recombinant strains were analysed by immunoblotting using an anti-CtxB antiserum. Precursor forms of the expected sizes for the three recombinant CtxB were detected in cellular extracts of the three strains, as well as a 12 kDa protein most likely corresponding to mature CtxB (Fig. 5B). No immunoreactive proteins of sizes intermediary between the precursor and mature forms were apparent, and the amounts of mature CtxB were equivalent in the three strains. These observations argue that the addition of the FHA N-terminal extension to the CtxB precursor does not affect signal peptide processing or export of the protein in *E. coli*.

Mutagenesis of FHA cysteines

The signal peptide of FHA contains three cysteines, two of which, Cys-24 and Cys-31, are located in the region between residues 22 and 32 found to be important for FHA production and/or secretion (Fig. 1A). To test their role in FHA biogenesis, they were individually converted to serines by site-directed mutagenesis. The pFJD9 derivatives pEC14, pEC15 and pEC16, harbouring the mutations C24 \rightarrow S, C31 \rightarrow S or C62 \rightarrow S respectively, were constructed and introduced into BPGR4. Fha-44 was detected in the culture supernatants of BPGR4 containing either plasmid, arguing that none of the mutations affected Fha-44 production or secretion (Fig. 6). The mutant Fha-44s were purified from culture supernatants by affinity chromatography, and submitted to N-terminal sequencing. Surprisingly, all three proteins were amenable to N-terminal sequencing, in contrast to wild-type Fha-44 (Jacob-Dubuisson et al., 1996). The N-terminal sequence of the



Fig. 6. Effect of cysteine mutations on Fha-44 secretion. Culture supernatants of *B. pertussis* BPGR4(pFJD9-C24→S), BPGR4(pFJD9-C31→S) and BPGR4(pFJD9-C62→S) were analysed by immunoblotting using anti-Fha-44 IgY. The negative and positive (WT) controls were culture supernatants of BPGR4 and BPGR4(pFJD9), respectively. The same volumes of unconcentrated supernatants from liquid cultures whose optical density at 600 nm was about 3.5 were loaded in all lanes. The sizes of the molecular weight markers (in kDa) are given in the left margin, and the position of Fha-44 is given in the right margin.

© 1998 Blackwell Science Ltd, Molecular Microbiology, 28, 1283-1293

N-terminus of FHA 1287

three proteins was QGLV, indicating that the same signal peptide cleavage site had been used as for wild-type FHA, but that their N-terminal Gln had not undergone cyclization.

The effect of these mutations on the secretion of fulllength FHA was also tested. BPCB(pCB5-C24 \rightarrow S), BPCB(pCB5-C31 \rightarrow S) and BPCB(pCB5-C62 \rightarrow S) were analysed for production of extracellular FHA. No significant difference in the amount of secreted FHA was observed between the recombinant and the wild-type strains after SDS-PAGE and quantification using the haemagglutination assay (not shown).

Secretion of an N-terminal FHA derivative with its own signal peptide in E. coli

Secretion of Fha-44 in E. coli had been achieved previously by replacing the first 32 residues of the FHA signal peptide with the entire E. coli OmpA signal peptide (Jacob-Dubuisson et al., 1996). Interestingly, the N-terminal residue of this E. coli-secreted Fha-44 was unmodified Gln-72 (Jacob-Dubuisson et al., 1996). The lack of N-terminal GIn cyclization might be accounted for by the absence of Cys-24 and Cys-31 in the hybrid OmpA-FhaB signal peptide. Alternatively, the modification reaction might be specifically catalysed in *B. pertussis* by machinery that is absent from E. coli. To distinguish between these possibilities, we constructed an N-terminal FHA derivative with its own signal peptide for production and secretion in E. coli. Production was optimized by the use of the T7 promoter and by engineering a typical E. coli ribosome-binding site 5' of the sequence coding for Fha-412, a 41 kDa N-terminal FHA derivative (Renauld-Mongénie et al., 1996b). Like Fha-44, Fha-412 is secreted in an FhaC-dependent manner and undergoes the same N-terminal proteolytic maturation as FHA (Jacob-Dubuisson et al., 1996). The resulting plasmid, pCB7, was introduced in E. coli BL21(DE3) together with a compatible FhaC-encoding plasmid, pEC30. Fha-412 was affinity purified from culture supernatants of BL21(DE3) co-expresssing Fha-412 and FhaC. The N-terminal sequence of Fha-412 as determined by Edman degradation was QGL, corresponding to residues 72-74 of FhaB with unmodified Gln-72. This result argues that the presence of the complete FHA signal peptide is not sufficient for cyclization of the N-terminal GIn, and that B. pertussis-specific factors are most probably involved.

Discussion

In this work, we have determined the N-terminal residue and characterized the signal peptide of FHA. The start codon of *fhaB* was identified as the first of three potential ATG codons present in the 5' region of the *fhaB* gene and Gln-72 as the first residue of mature FHA. Interestingly, this residue undergoes cyclization into a pyroglutamate in *B. pertussis*. FhaB is thus synthesized with a 71-residue-long signal peptide that features several unusual characteristics. It is composed of a classical signal peptide domain, with a positively charged region (residues 33-43), a long hydrophobic segment (residues 44-65) and a cleavage site after Ala-71. This cleavage site fulfils the (-3, -1) rule pertaining to protein precursors processed by peptidases of the Lep type (von Heijne, 1986). Therefore, FhaB is probably exported via the signal peptide-dependent Sec pathway, although no Sec component or signal peptidase has so far been described in *B. pertussis*.

The classical signal peptide domain of FhaB is preceded by a 22-residue-long appendix, called the N-terminal extension, that is conserved in several other bacterial secretory protein precursors including S. flexneri SepA, E. coli Tsh and AIDA-I, and Haemophilus influenzae HMWA. Hia and Hsf (Barenkamp and Leininger, 1992; Benz and Schmidt, 1992; Provence and Curtiss, 1994; Benjelloun Touimi et al., 1995; Barenkamp and St Geme, 1996; St Geme et al., 1996). These proteins are all exported with otherwise typical signal peptides. Interestingly, deletion of this conserved sequence did not affect FHA secretion in B. pertussis. Furthermore, an in-frame fusion of this extension in N-terminal position of the CtxB signal peptide did not influence the steady-state levels of signal peptide processing or periplasmic export of CtxB in E. coli. Altogether, these results suggest that this extension plays no all-or-none function in export. Nevertheless, we do not exclude that it might be involved in a more subtle kinetic fashion in export and/or that it might interact with cytoplasmic factors that remain to be identified. Such functions would account for the high level of amino acid conservation in this region with otherwise FHA-unrelated proteins. It is nevertheless noteworthy that the N-terminal extension of FHA lacks the last three highly conserved residues, Leu-Ala-Arg, present in the other proteins (Fig. 1B). In addition, the third residue of the N-terminal extension is basic for all proteins except FhaB, in which it is replaced by a pair of neutral residues. Whether these changes imply a drift of function for the N-terminal extension of FhaB awaits the characterization of such N-terminal extensions in other proteins.

Mature FHA and N-terminal FHA derivatives produced in *B. pertussis* present a pyroglutamate residue at their N-terminus. The presence of an N-terminal pyroglutamate has already been described in extracellular peptides and proteins in eukaryotes. Formation of N-terminal pGlu may occur spontaneously, although in the case of some peptide hormones it is catalysed by a glutaminyl cyclase (Pohl *et al.*, 1991), and is required for biological activity (Vale and Rivier, 1975). This N-terminal modification has also been proposed to protect some proteins from proteolytic degradation (Strobl *et al.*, 1997). Very few pyroglutamyl proteins have been described in bacteria. Most of them are extracytoplasmic (Su *et al.*, 1996). The pyroglutamate residue present at N-terminus of *B. pertussis*-secreted FHA is not crucial for either heparin-binding, haemagglutination or secretion. However, it might increase the resistance of FHA to aminopeptidases *in vivo* and consequently contribute to the stability of FHA in the respiratory tract.

Nothing is known about the mechanism of N-terminal pGlu formation in bacteria. As cyclization involves both the side-chain and the free amino group of glutamine, it has to take place after signal peptide cleavage in the case of FHA, most probably outside the cytoplasm. Whether it implies the existence of a glutaminyl cyclase in *B. pertussis* remains a matter of speculation.

The only three cysteines of the entire *fhaB* ORF are located within the N-terminal signal region. Interestingly, none of them seems to be crucial for FHA production or secretion, although they appear to influence the N-terminal modification of FHA. This observation might argue for a catalysed modification, with the cysteines modulating cyclase activity. Alternatively, some sequence features of the N-terminal region of the precursor, including these cysteines, might influence the rates of processing and export, and hence pGlu formation.

FHA is produced in large quantities by B. pertussis, which calls for efficient transcription, translation and secretion processes. However, identification of the initiation codon of *fhaB* points to the lack of a typical purine-rich Shine-Dalgarno (SD) region upstream of this ATG. In contrast, several B. pertussis genes possess SD sequences that are rather similar to the E. coli consensus, 4-12 nucleotides 5' of the initiation codon (Li et al., 1991; Locht and Keith, 1986). In compensation, fhaB contains three sequence stretches downstream of the initiation codon that are complementary to a 3' region of Bordetella 16S RNA. Similar mRNA regions, called downstream boxes, were shown to be required for efficient expression of some E. coli and bacteriophage genes (Sprengart et al., 1996). At least one other *B. pertussis* gene devoid of a SD sequence has been proposed to make use of a downstream box for translation initiation (Fuchs et al., 1996). The three potential downstream boxes of *fhaB* are all located in the 5' portion of the coding sequence, and, interestingly, all three of them happen to be eliminated by the 32-codon-long deletion that abolishes FHA production. It can therefore not be ruled out that part of these sequences have evolved to contribute to efficient translation initiation of fhaB.

FHA has incorporated at least two blocks of sequences shared by other large secretory proteins and combined them with unique features to achieve high levels of production and secretion (Renauld-Mongénie *et al.*, 1996b; Jacob-Dubuisson *et al.*, 1997). Much remains to be learned about

the molecular principles that make the largest ORF of the prokaryotic world one of the most efficiently secreted bacterial proteins.

Experimental procedures

Bacterial strains and plasmids

The *E. coli* and *B. pertussis* strains as well as the plasmids used in this study are reported in Table 1. Culture conditions have been described previously (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1996).

The FHA-deficient strain BPCB was obtained by two successive events of homologous recombination using the system described previously (Stibitz, 1994), as follows (Fig. 7A). The 2.4 kb *Bam*HI fragment containing the region downstream of *fha44* was isolated from pRIT13202 and cloned into pIC20H to yield pIC-B. The 2.5 kb *Eco*RI fragment from pVir1 containing the *fha44* upstream region was then inserted into the *Eco*RI site of pIC-B, resulting in pIC-EB. The 4.9 kb *Hin*dIII fragment was then excised from pIC-EB and cloned into pSS1129. The resulting plasmid, called pSORT-EB, was



N-terminus of FHA 1289

introduced into *B. pertussis* BPSM by electroporation, and plasmid integration was selected on BG agar containing gentamicin. The Gen^R Sm^S clones were then streaked onto BG plates containing streptomycin to select for the second recombination event. FHA-negative colonies were detected by colony immunoblotting with an anti-FHA antiserum as described (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1996). To confirm the deletion of *fha44*, several FHA-negative clones were analysed by Southern blotting using the DIG DNA Labelling and Detection kit (Boehringer Mannheim) and a 1.0 kb *Eco*RI–*Stul* probe isolated from pVir1. One clone was selected and called BPCB.

To create the mutant *fhaB* genes, pCB5 was first constructed as follows (Fig. 7B). The 3.0 kb *Eco*RI-*Bam*HI fragment from pCB3 was cloned into pUC19 to give rise to pCB4. The 2.4 kb *Bam*HI fragment from pRIT13202 that corresponds to the sequence downstream of *fha44* was then inserted into the *Bam*HI site of pCB4, resulting in pCB5. pCB5 contains a 2.3 kb fragment of foreign DNA in place of the 2.1 kb 5' portion of *fha44* in order to facilitate the exchange with the relevant *fha44* fragments. To construct the different pCB5 derivatives, the 2.3 kb *Eco*RI-*Cla*I

Fig. 7. A. Schematic diagram of the chromosomal *fha44* deletion. The portion of the chromosome corresponding to the *fha* locus is represented in a linear fashion (BPSM). After introduction of pSORT-EB, two recombination events (X) take place between the homologous regions of the plasmid and the chromosome. The resulting chromoscmal deletion corresponding to BPCB is depicted at the bottom. A short sequence from the polylinker replaces *fha44*.

B. Schematic diagram of the introduction of a mutant copy of *fha44* (hatched box) into the *fhaB* locus of BPCB. After introduction of pCB5, a single recombination event takes place between the homologous fragment of the plasmid and the BPCB chromosome. E, *Eco*RI; B, *Bam*HI; C, *Cla*I. The lower-case letters attached to E and B denote non-unique restriction sites of the *fha* locus used in this work.

© 1998 Blackwell Science Ltd, Molecular Microbiology, 28, 1283-1293

1290 C. Lambert-Buisine, E. Willery, C. Locht and F. Jacob-Dubuisson

Table 1. Strains and plasmids.

Name	Relevant characteristics	Source or reference
Strains		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
B. pertussis		
BPSM	Sm ^R Nal ^R Tohamal derivative	Antoine and Locht (1990)
BPGR4	BPSM derivative with a chromosomal deletion of <i>fhaB</i>	Locht <i>et al.</i> (1992)
BPCB	BPSM derivative with a chromosomal deletion of fha44	This work
E. coli		
M15(pREP4)	lacl gene on pREP4	Qiagen, Courtaboeuf, France
BL21(DE3)	T7 polymerase under the control of a <i>lac UV5</i> promoter.	Novagen, Madison, WI, USA
Cloning vectors		
pQE30 and pQE32	Expression vectors containing the T5 promoter and <i>lac</i> operator sequences	Qiagen
pET22b	Expression vector containing the T7 promoter	Novagen
pIC20H	pUC derivative	Marsh et al. (1984)
pSS1129	Gm ^R Sm ^S suicide plasmid	Stibitz (1994)
Phages		
ΦĒC1	5' region of <i>fhaB</i> in M13mp19	Jacob-Dubuisson et al. (1997)
ΦFHA-M1→L	M1 \rightarrow L mutation in Φ EC1	This work
ΦFHA-M2→L	M16→L mutation in ΦEC1	This work
ΦFHA-M3→L	M59 \rightarrow L mutation in Φ EC1	This work
ΦFHA-M1→L/M2→L	M1 \rightarrow L mutation in Φ FHA-M16 \rightarrow L	This work
ΦFHA-M1→L/M3→L	M1 \rightarrow L mutation in Φ FHA-M59 \rightarrow L	This work
ΦFHA-Δext1	Δext1 mutation in ΦEC1	This work
ΦFHA-Δext2	Δ ext2 mutation in Φ EC1	This work
ΦEC2	C24 \rightarrow S mutation in Φ EC1	This work
ΦEC3	C31 \rightarrow S mutation in Φ EC1	This work
Φ EC4	C62 \rightarrow S mutation in Φ EC1	This work
ΦFHA-Q72→L	Q72 \rightarrow L mutation in Φ EC1	This work
Fha-44 expression plasm	nids	
pFJD9	fha44 in pMMB91	Jacob-Dubuisson et al. (1996)
pFJD9-M1→L	$M1 \rightarrow L$ mutation in pFJD9	This work
pFJD9-M2→L	M16→L mutation in pFJD9	This work
pFJD9-M3→L	M59→L mutation in pFJD9	This work
pFJD9-M1→L/M2→L	$M1 \rightarrow L/M16 \rightarrow L$ mutation in pFJD9	This work
pFJD9-M1→L/M3→L	M1 \rightarrow L/M59 \rightarrow L mutation in pFJD9	This work
pFJD9-∆ext1	Δext1 mutation in pFJD9	This work
pFJD9-∆ext2	∆ext2 mutation in pFJD9	This work
pFJD9-Q72→L	Q72→L mutation in pFJD9	This work
pEC14	C24→S mutation in pJD9	This work
pEC15	C31→S mutation in pFJD9	This work
pEC16	C62→S mutation in pFJD9	This work

fragment from pCB5 was replaced by the 2.1 kb *Eco*RI-*Cla*I segments from pFJD9, pFJD9- Δ ext1, pFJD9- Δ ext2, pEC14, pEC15, pEC16, or pFJD9-Q72→L. The resulting plasmids harbour a wild-type (pCB5-W) or a mutant (pCB5- Δ ext1, pCB5- Δ ext2, pCB5-C24→S, pCB5-C31→S, pCB5-C62→S, and pCB5-Q72→L) copy of *fha44*, followed by a segment directing the integration of the plasmid into the *fhaB* locus. They were electroporated into BPCB, and the cells were plated onto BG plates containing ampicillin. Colony hybridization with the anti-FHA antiserum showed that, in contrast to untransformed BPCB, the recombinant BPCB produced FHA except for BPCB(pCB5- Δ ext1). For the last strain, Southern blotting was performed to ascertain that the plasmid had integrated in the expected way.

Site-directed mutagenesis

Mutations in *fha44* were generated with the Sculptor *in vitro* mutagenesis system (Amersham RPN1526). The template for

the mutagenesis reactions was phage $\Phi\text{EC1}.$ The following oligonucleotides (with the mutagenic nucleotides underlined or the deleted nucleotides symbolized by Δ) 5'-CGTGTTCA-GATTCCGACCAG-3', 5'-GGAACAAGCAGGCCGCGAAA-C-3', 5'-CCAACAGCAGGGCCCAGG-3', 5'-CTTGACCAC-GCGTGCG∆CATATTCCGACCAGCGAAG-3', 5'-GTTTCC-GACGGTGCAATGACATATTCCGACCAGCGAAG-3', 5'-C-CGACGGTGGAATGCTCGCT-3', 5'-CGTGCGCCCAGAG-AAGGTGT-3', 5'-GAAGACCCGTAGACGCCAACATC-3', and 5'-CCAAGCCCAGGGCGTGC-3' were used to create Φ FHA-M1 \rightarrow L, Φ FHA-M2 \rightarrow L, Φ FHA-M3 \rightarrow L, Φ FHA- Δ ext1, Φ FHA- Δ ext2, Φ EC2, Φ EC3, Φ EC4 and Φ FHA-Q72 \rightarrow L respectively. To construct Φ FHA-M1 \rightarrow L/M2 \rightarrow L and Φ FHA-M1 \rightarrow L/M3→L, the 0.26 kb EcoRI-BsrGI fragment from ΦFHA-M1 \rightarrow L, containing the M1 \rightarrow L mutation, was substituted in Φ FHA-M2 \rightarrow L and Φ FHA-M3 \rightarrow L for the wild-type *Eco*RI-BsrGI fragment. All mutant fha44 segments were sequenced either with the T7 Sequencing kit (Pharmacia) or with the ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer). Mutant fha44

© 1998 Blackwell Science Ltd, Molecular Microbiology, 28, 1283-1293

N-terminus of FHA 1291

Table 1. Continued.

Name	Relevant characteristics	Source or reference
Expression of Fha-4	12 and Fha-44 in <i>E. coli</i>	
ФFHA-Nde	ΦEC1 with Ndel on fhaB initiation ATG	This work
pCB6	0.61 kb Ndel-NotI fragment of	This work
pCB7	<i>fha412</i> with its own signal sequence and an <i>E. coli</i> ribosome-binding site, under the control of the T7 promoter in pET-22b	This work
pEC30	Translational fusion of <i>E. coli</i> OmpA signal peptide and FhaC, under the control of the <i>B. pertussis</i> porin promoter, in pBBR1-MCS	E. W., unpublished
Integration of mutation	ons in <i>B. pertussis</i> chromosome	
pCB3	0.86 kb <i>Eco</i> RI- <i>Not</i> I fragment of pFJD9 replaced by a 1 kb <i>Eco</i> RI- <i>Not</i> I fragment of foreign DNA	Jacob-Dubuisson et al. (1997)
pRIT13202	fhaB in pUC8	Delisse-Gathoye et al. (1990)
pCB4	3.0 kb EcoRI-BamHI fragment of pCB3 in pUC19	This work
pCB5	2.4 kb BamHI fragment from pRIT13202 in pCB4	This work
pCB5-W	Wild-type fha44 sequence in pCB5	This work
pCB5-∆ext1	∆ext1 mutation in pCB5	This work
pCB5-∆ext2	∆ext2 mutation in pCB5	This work
pCB5-C24→S	C24 \rightarrow S mutation in pCB5	This work
pCB5-C31→S	C31→S mutation in pCB5	This work
pCB5-C62→S	C62 \rightarrow S mutation in pCB5	This work
pCB5-Q72→L	Q72→L mutation in pCB5	This work
BPCB construction		
pVir1	Complete bvgA/S operon and the beginning of <i>thaB</i> in pUC9	Boucher <i>et al.</i> (1994)
pIC-B	2.4 kb BamHI fragment from pRIT13202 in pIC20H	This work
pIC-EB	2.5 kb EcoRI fragment from pVir1 in pIC-B	This work
pSORT-EB	4.9 kb HindIII insert from pIC-EB in pSS1129	This work
CtxB fusions		
pTCT1	ctxA ctxB in pBR122	Glineur and Locht (1994)
pFJD56	ctxB in pQE32	This work
pFJD57	Translational fusion of residues 1-22 of FhaB and CtxB in pQE32	This work
pFJD62	Translational fusion of residues 1-33 of FhaB and CtxB in pQE32	This work

segments from double-stranded phage DNA were then cloned into pFJD9 in place of their wild-type counterparts to express the Fha-44 derivatives, as described before (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1997).

Construction of pCB7

To create an *Ndel* site overlapping the *fhaB* initiation codon, the adenine at position 250 in Φ EC1 was converted into cytidine by site-directed mutagenesis using the mutagenic oligonucleotide 5'-GTGTTCATATGCCGACCAG-3'. The resulting phage was called Φ FHA-Nde. The 0.61 kb *Ndel*-*Not*I fragment from Φ FHA-Nde was then cloned into pET-22b, yielding pCB6. The complete Fha-412 coding sequence was obtained by cloning the 0.71 kb *Not*I-*Sal*I fragment from pFJD9 into the *Not*I and *Xho*I sites of pCB6 to generate pCB7.

Construction of CtxB hybrids

pFJD56, pFJD57 and pFJD62 were constructed using polymerase chain reaction (PCR) as follows. The entire *ctxB* gene with its own ribosome binding site (RBS) was amplified by PCR using pTCT1 as a template (Glineur and Locht, 1994) and the oligonucleotides 5'-CG<u>GAATTC</u>AATCTGATATTGA-TACACATAA-3' and 5'-TGC<u>GTCGAC</u>TTAATTTGCCATAC-TAATTGC-3' (Ctx2), which introduce *Eco*RI and *SaI*I sites

© 1998 Blackwell Science Ltd, Molecular Microbiology, 28, 1283-1293

(underlined) at the 5' and 3' ends of ctxB respectively. The EcoRI- and Sall-digested PCR fragment was cloned into the corresponding sites of pQE32, yielding pFJD56. To construct pFJD57, the ctxB gene without its RBS and initiation codon was amplified by PCR using pTCT1 as a template and the oligonucleotides 5'-CCGAGCTCAAATTAAAATTT-GGTGTTTTTTTAC-3' and Ctx2, which introduce a Sacl site (underlined) and a Sal1 site at the 5' and 3' ends of ctxB respectively. The DNA region encompassing the first 22 codons of *fhaB* and the RBS present upstream from fhaB in pCB7 was amplified by PCR using the oligonucleotides 5'-AGAATTCGGAATTGTGAGCGGATAAC-3' (Ctx3) and 5'-ACGAGCTCGCTCACGGGAACA-3', which place an EcoRI and a SacI sites (underlined) at the 5' and 3' ends of this segment respectively. The ctxB-encoding Sall- and Saclrestricted PCR fragment and the fhaB-encoding EcoRI- and SacI-restricted PCR fragment were successively cloned into pQE32, resulting in an in-frame fusion between the first 22 residues of FhaB and CtxB. This plasmid was called pFJD57. pFJD62 is similar to pFJD57, except that the *fhaB* portion encompasses the first 33 codons of *fhaB*. This *fhaB* segment was obtained by PCR amplification using pCB7 as a template and the oligonucleotides Ctx3 and 5'-GTGAGCTCGCGCC-CACAGAAGGTG-3' as primers. All three plasmids were verified by sequencing using a primer hybridizing in the promoter region of pQE32.

Other DNA techniques

Genomic DNA was prepared according to Wilson (1990). Southern blot analysis was performed as described (Sambrook *et al.*, 1989).

Pulse labelling

For the pulse-labelling experiment, B. pertussis BPSM, BPGR4 and BPCB(pCB5-\Deltaext1) freshly streaked onto BG blood agar were grown in liquid culture in SS medium for 24 h. Cells were then washed in prewarmed casamino acid-deprived SS medium containing 50 μ g ml⁻¹ of each L amino acid except methionine, resuspended in the same medium and incubated for 15 min at 37°C. [35S]-methionine was then added at $200\,\mu\text{Ci}\,\text{m}\text{I}^{-1}$ final concentration, and the cultures were incubated for 20 min. Unlabelled methionine was then added at 5 mM final concentration, and 200 µl aliguots were withdrawn at increasing times after the chase. They were precipitated by the addition of ice-cold trichloroacetic acid (TCA) at 5%. The TCA pellets were resuspended in Laemmli buffer (Laemmli, 1970), heated at 95°C and analysed by SDS-PAGE using an 8% polyacrylamide gel. The gel was treated with methanol-acetic acid (45%/9%), rinsed with water and incubated in 16% sodium salicylate before drying and autoradiography.

Protein techniques

FHA and Fha-44 were purified from *B. pertussis* supernatants by heparin–sepharose affinity chromatography as described (Menozzi *et al.*, 1991).

Proteins from culture supernatants or sonicated cell extracts were analysed by SDS-PAGE (Laemmli, 1970) and immunoblotting as described (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1996). Polyclonal anti-Fha-44 chicken antibodies were prepared by Eurogentec (Liège, Belgium). The anti-Fha-44 chicken IgY were purified from egg yolk according to the method described by Polson *et al.* (1980) and modified by Sturmer *et al.* (1992). The anti-Fha-44 rat antiserum was used as described previously (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1996). The polyclonal anti-CtxB antiserum was provided by C. Glineur.

N-terminal sequencing was performed at the Laboratoire de Microséquençage des Protéines, Institut Pasteur, Paris, and at the CNRS URA 1309, Institut Pasteur de Lille. Sample preparation has been described previously (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1996).

The procedure for removal of pGlu was described by Hirano *et al.* (1993). After SDS-PAGE using a 8% acrylamide gel, purified FHA was electroblotted onto a PVDF membrane. The region of the membrane carrying the FHA band was excised and pretreated with 200 μ l of 0.5% (w/v) polyvinyl-pyrrolidone (."VP)-40 in 100 mM acetic acid for 30 min at 37°C to saturate the membrane. The membrane was then washed 10 times in H₂O and transferred into 100 μ l of 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) containing 5 mM dithiothreitol and 10 mM EDTA. Pyroglutamate aminopeptidase (5 μ g) was added, and the reaction mixture was incubated at 30°C for 24 h. The membrane was washed in H₂O, dried and applied onto an Applied Biosystems 476 sequencer.

Acknowledgements

We wish to thank P. Sautière and J. D'Alayer for helpful suggestions regarding the N-terminal pGlu modification, J. D'Alayer and H. Drobecq for N-terminal sequencing, E. Fort for photography, C. Glineur for the anti-CtxB antiserum, I. Coppens for construction of pIC-B and J. Dubuisson for critical reading of the manuscript. C. Lambert-Buisine was supported by a fellowship from the Region Nord-Pas de Calais and the Institut Pasteur de Lille and F. Jacob-Dubuisson is a chercheur of the CNRS. This work was supported by INSERM, Institut Pasteur de Lille, Région Nord-Pas de Calais and Ministère de la Recherche.

References

- Antoine, R., and Locht, C. (1990) Roles of the disulfide bond and the carboxy-terminal region of the S1 subunit in the assembly and biosynthesis of pertussis toxin. *Infect Immun* 58: 1518–1526.
- Arico, B., Nuti, S., Scarlato, V., and Rappuoli, R. (1993) Adhesion of *Bordetella pertussis* to eukaryotic cells requires a time-dependent export and maturation of filamentous hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 9204–9208.
- 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. III (1996) Identification of a second family of high-molecular-weight adhesion proteins expressed by non-typable *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* **19**: 1215–1223.
- Benjelloun Touimi, Z., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (1995) SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Mol Microbiol* **17**: 123–135.
- Benz, I., and Schmidt, M.A. (1992) AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol Microbiol* 6: 1539–1546.
- Berggard, K., Johnsson, E., Mooi, F.R., and Lindahl, G. (1997) *Bordetella pertussis* binds the human complement regulator C4BP: role of filamentous hemagglutir.in. *Infect Immun* **65:** 3638–3643.
- Boucher, P.E., Menozzi, F.D., and Locht, C. (1994) The modular architecture of bacterial response regulator. Insights into the activation mechanism of the BvgA transactivator of *Bordetella pertussis*. *J Mol Biol* **241**: 363–367.
- Delisse-Gathoye, A.-M., Locht, C., Jacob, F., Raaschou-Nielsen, M., Heron, I., Ruelle, J.-L., *et al.* (1990) Cloning, partial sequence, expression and antigenic analysis of the filamentous hemagglutinin gene of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 58: 2895–2905.
- Domenighini, M., Relman, D., Capiau, C., Falkow, S., Prugnola, A., Scarlato, V., and Rappuoli, R. (1990) Genetic characterization of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. *Mol Microbiol* 4: 787–800.
- Fuchs, T.M., Deppisch, H., Scarlato, V., and Gross, R. (1996) A new gene locus of *Bordetella pertussis* defines a novel

N-terminus of FHA 1293

family of prokaryotic transcriptional accessory proteins. *J* Bacteriol **178**: 4445–4452.

- Glineur, C., and Locht, C. (1994) Importance of ADP-ribosylation in the morphological changes of PC12 cells induced by cholera toxin. *Infect Immun* **62:** 4176–4185.
- Hirano, H., Komatsu, S., Kajiwara, H., Takagi, Y., and Tsunasawa, S. (1993) Microsequence analysis of the N-terminally blocked proteins immobilized on polyvinylidene difluoride membrane by western blotting. *Electrophoresis* 14: 839–46.
- Hultgren, S.J., Abraham, S., Caparon, M., Falk, P., St Geme, J.W. III, and Normark, S. (1993) Pilus and non-pilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell* **73**: 887–901.
- Jacob-Dubuisson, F., Buisine, C., Mielcarek, N., Clément, E., Menozzi, F.D., and Locht, C. (1996) Amino-terminal maturation of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin (FHA) upon secretion. *Mol Microbiol* **19:** 65–78.
- 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.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227:** 680–685.
- Li, Z.M., Hannah, J.H., Stibitz, S., Nguyen, N.Y., Manclark, C.R., and Brennan, M.J. (1991) Cloning and sequencing of the structural gene of the porin protein of *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol* **5**: 1649–1656.
- Locht, C., and Keith, J.M. (1986) Pertussis toxin gene: nucleotide sequence and genetic organization. *Science* **232**: 1258– 1264.
- Locht, C., Geoffroy, M.-C., and Renauld, G. (1992) Common accessory genes for the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the *papC* and *papD* gene families. *EMBO J* **11**: 3175–3183.
- 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.
- Marsh, J.L., Erfle, M., and Wykes, E.J. (1984) The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene* **32**: 481–485.
- Menozzi, F.D., Gantiez, C., and Locht, C. (1991) Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with heparin. *FEMS Microbiol Lett* **78**: 59–64.
- Pohl, T., Zimmer, M., Mugele, K., and Spiess, J. (1991) Primary structure and functional expression of a glutaminyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10059–10063.
- Polson, A., von Wechmar, M.B., and van Regenmortel, M.H. (1980) Isolation of viral IgY antibodies from egg yolks of immunized hens. *Immunol Commun* 9: 475–493.
- Provence, D., and Curtiss, R. (1994) Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* **62:** 1369– 1380.
- Rappuoli, R. (1994) Pathogenicity mechanisms of *Bordetella*. *Curr Top Microbiol Immunol* **192:** 319–336.

- Renauld-Mongénie, G., Mielcarek, N., Cornette, J., Schacht, A.-M., Capron, A., Riveau, G., and Locht, C. (1996a) Induction of mucosal immune responses against a heterologous antigen fused to filamentous hemagglutinin after intranasal immunization with recombinant *Bordetella pertussis. Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 7944–7949.
- Renauld-Mongénie, G., Cornette, J., Mielcarek, N., Menozzi, F.D., and Locht, C. (1996b) 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sprengart, M.L., Fuchs, E., and Porter, A.G. (1996) The downstream box: an efficient and independent translation initiation signal in *Escherichia coli. EMBO J* 15: 665–674.
- St Geme, J.W. III, Cutter, D., and Barenkamp, S.J. (1996) Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils. *J Bacteriol* **178**: 6281–87.
- Stibitz, S. (1994) Use of conditionally counterselectable suicide vectors for allelic exchange. *Methods Enzymol* 235: 458–465.
- Strobl, S., Gomis-Rüth, F.-X., Maskos, K., Frank, G., Huber, R., and Glockshuber, R. (1997) The α -amylase from the yellow meal worm: complete primary structure, crystallization and preliminary X-ray analysis. *FEBS Lett* **409**: 109–114.
- Sturmer, A.M., Driscoll, D.P., and Jackson-Matthews, E.J. (1992) A quantitative immunoassay using chicken antibodies for detection of native and recombinant α-amidating enzyme. *J Immunol Methods* **146**: 105–110.
- Su, H., Blain, F., Musil, R.A., Zimmermann, J.J.F., Gu, K., and Bennett, D.C. (1996) Isolation and expression in *Escherichia coli* of *hepB* and *hepC*, genes coding for the glycosaminoglycan-degrading enzymes heparinase II and heparinase III, respectively, from *Flavobacterium heparinum. Appl Environ Microbiol* **62**: 2723–2734.
- Vale, W., and Rivier, C. (1975) Hypothalamic hypophysiotropic hormones. In *Handbook of Psychopharmacology*,
 5. Iverson, L.L., Iverson, S.D., and Snyder, S.H. (eds). New York: Plenum, pp. 195–238.
- von Heijne, G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res* **14:** 4683–4690.
- Westerlund, B., and Korhonen, T.K. (1993) Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. *Mol Microbiol* **9:** 687–94.
- Willems, R.J.C., Geuijen, C., van der Heide, H.G.J., Renauld, G., Bertin, P., van den Akker, W.M.R., et al. (1994) Mutational analysis of the Bordetella pertussis fim/fha gene cluster: identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA. Mol Microbiol 11: 337–347.
- Wilson, K. (1990) Current Protocols in Molecular Biology. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (eds.). New York: Greene Publishing and Wiley-Interscience.

Article 3. Les machineries de sécrétion de la FHA de B. pertussis et de l'hémolysine HpmA de Proteus mirabilis ne sont pas interchangeables La protéine auxiliaire FhaC appartient à une famille de protéines de membrane externe impliquées dans la sécrétion de facteurs de virulence chez plusieurs bactéries à Gram négatif. Cette famille s'agrandit continuellement. Elle comprend en particulier ShIB de *S. marcescens* et HpmB de *P. mirabilis*, impliquées dans la sécrétion des hémolysines ShIA et HpmA, respectivement. FhaC, ShIB, et HpmB présentent des similitudes de séquence et de taille (environ 60 kDa). Elles possèdent un peptide signal à leur extrémité N-terminale et un résidu phénylalanine à leur extrémité C-terminale, une caractéristique importante des protéines localisées dans la membrane externe.

D'autre part, la FHA et les hémolysines ShlA et HpmA contiennent un domaine homologue d'une centaine de résidus dans leur région aminoproximale, appelé la boîte de sécrétion. L'hypothèse d'une interaction entre la boîte de sécrétion et la protéine auxiliaire a été avancée à la suite de plusieurs observations. Une délétion de cette région abolit la sécrétion de la FHA (Willems *et al.*, 1994). De plus, des dérivés N-terminaux de la FHA ayant conservé la boîte de sécrétion (Fha44 et Fha412) sont efficacement sécrétés chez *B. pertussis* (Renauld-Mongénie *et al.*, 1996). Dans le cas de ShlA, l'introduction de petites délétions ou de certaines mutations ponctuelles dans cette région se traduit par une diminution du taux de sécrétion de l'hémolysine (Schönherr *et al.*, 1993). Les asparagine en position 69 et 109 sont particulièrement importantes car leur changement en isoleucine abolit complètement la sécrétion de ShlA.

Cependant, d'importantes différences existent entre les hémolysines et la FHA. Les précurseurs de ShlA et HpmA possèdent des séquences-signal classiques. Les séquences N-terminales des hémolysines matures correspondent clairement au clivage de séquences signal de 30 et 29 résidus, respectivement (Poole *et al.*, 1988; Uphoff et Welch, 1990). Par contre, le précurseur de la FHA est synthétisé avec une séquence-signal non orthodoxe de 71 résidus, et le résidu N-terminal de la FHA mature est bloqué par une modification covalente. En plus du clivage de sa séquence-signal, le précurseur de la FHA subit un clivage protéolytique C-terminal au cours de sa maturation. D'autre part, la FHA et les hémolysines se comportent différemment en l'absence de leurs protéines auxiliaires respectives. Lorsque la protéine auxiliaire FhaC est absente, la FHA subit une dégradation protéolytique rapide chez *B. pertussis* (Willems *et al.*, 1994). Chez *E. coli* en absence de ShlB, une forme inactive de ShlA (appelée ShlA*) s'accumule dans le périplasme (Schiebel *et al.*, 1989). La même observation a été faite pour HpmA (Uphoff et Welch, 1990). Cependant, le sort de ShlA et HpmA

en absence de leurs protéines auxiliaires respectives dans leurs hôtes naturels n'a pas été étudié. Enfin, en plus de leur fonction pour la sécrétion des hémolysines, ShlB et HpmB sont nécessaires pour conférer à ShlA et HpmA leur activité hémolytique. Par contre, une activation de la FHA par FhaC n'a pas été mise en évidence jusqu'à présent.

Sur la base de tous ces éléments, nous avons voulu déterminer le degré de similitude fonctionnelle entre les systèmes de sécrétion de la FHA et des hémolysines. Pour cela, des expériences de complémentation entre le système Fha44/FhaC et le système HpmA/HpmB ont été effectuées. Elles nous ont montré que HpmB est incapable de sécréter la Fha44 chez E. coli. La boîte de sécrétion de la Fha44 a alors été remplacée par la région homologue de HpmA, pour former une chimère Fha44-HpmA dont la boîte de sécrétion serait reconnue plus efficacement par HpmB. Cependant, cette chimère n'est pas non plus sécrétée chez E. coli, que ce soit en présence de HpmB, ou en présence de FhaC. Réciproquement, HpmA n'est pas sécrétée dans une souche de E. coli coexprimant fhaC et hpmA, et cette souche n'est pas hémolytique. Les systèmes de sécrétion de la FHA et de HpmA ne sont donc pas interchangeables, bien qu'ils fassent appel à des protéines auxiliaires homologues et à des boîtes de sécrétion conservées. En contraste, nous avons pu obtenir la sécrétion et l'activation de HpmA par ShlB chez E. coli, ce qui indique que les protéines auxiliaires sont interchangeables au sein de la sous-famille des hémolysines. Dans le cas de ShIA, 2 asparagines de la boîte de sécrétion sont essentielles pour sa sécrétion. Nous avons donc changé les asparagines correspondantes de la FHA en isoleucine par mutagenèse dirigée (mutations N137I et N176I). La mutation N137I abolit complètement la production extracellulaire de Fha44 chez B. pertussis, tandis que la mutation N176I réduit le taux de sécrétion de 80% environ. Dans les 2 cas, la quantité de Fha44 associée aux cellules est très faible. Cependant, les dérivés mutés de la Fha44 ne sont pas instables, car ils sont détectés dans des extraits cellulaires de E. coli les exprimant. Nous pensons que chez B. pertussis, les formes de la FHA incompétentes pour la sécrétion sont rapidement protéolysées dans les bactéries.

Lack of Functional Complementation between Bordetella pertussis Filamentous Hemagglutinin and Proteus mirabilis HpmA Hemolysin Secretion Machineries

FRANÇOISE JACOB-DUBUISSON,¹* CORINNE BUISINE,¹ EVE WILLERY,¹ GENEVIÈVE RENAULD-MONGÉNIE,²† and CAMILLE LOCHT¹

> INSERM U447¹ and INSERM U167,² Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille Cédex, France

> > Received 1 July 1996/Accepted 14 November 1996

The gram-negative bacterium *Bordetella pertussis* has adapted specific secretion machineries for each of its major secretory proteins. In particular, the highly efficient secretion of filamentous hemagglutinin (FHA) is mediated by the accessory protein FhaC. FhaC belongs to a family of outer membrane proteins which are involved in the secretion of large adhesins or in the activation and secretion of Ca²⁺-independent hemolysins by several gram-negative bacteria. FHA shares with these hemolysins a 115-residue-long amino-proximal region essential for its secretion. To compare the secretory pathways of these hemolysins and FHA, we attempted functional transcomplementation between FhaC and the *Proteus mirabilis* hemolysin accessory protein HpmB. HpmB could not promote the secretor of FHA derivatives. Likewise, FhaC proved to be unable to mediate secretion and activation of HpmA, the cognate secretory partner of HpmB. In contrast, ShIB, the accessory protein of the closely related *Serratia marcescens* hemolysin, was able to activate and secrete HpmA. Two invariant asparagine residues lying in the region of homology shared by secretory proteins and shown to be essential for these residues indicated that both are involved in, but only the first one is crucial to, FHA secretion. This slight discrepancy together with the lack of functional complementation demonstrates major differences between the hemolysins and FHA secretion machineries.

The whooping cough agent Bordetella pertussis secretes several virulence factors into the extracellular milieu. Among them, the 220-kDa filamentous hemagglutinin (FHA) is the major extracellular protein, secreted in a highly efficient manner (19). At least one accessory protein, named FhaC, is known to be required for FHA secretion (35). FhaC belongs to a growing family of similar accessory proteins involved in the secretion of virulence factors of various gram-negative organisms (Table 1). In addition to FhaC, this family comprises HpmB, ShlB, and HhdB, accessory proteins required for the secretion and the activation of their cognate Ca2+ independent hemolysins HpmA, ShlA, and HhdA produced by Proteus mirabilis, Serratia marcescens, and Haemophilus ducreyi, respectively (24, 25, 32, 33). In addition, this family includes Haemophilus influenzae HMW1B and -2B, involved in the secretion of the HMW1A and -2A adhesins (3).

These approximately 60-kDa accessory proteins are predicted to be composed of a number of amphipathic β -strands, a feature shared with most outer membrane proteins (3–5). In agreement with the proposed outer membrane location of these proteins, FhaC was recently shown to be found at least in part in Sarkosyl-insoluble extracts (15).

Interestingly, the three closely related HpmA, ShlA, and HhdA hemolysins possess in their amino-proximal regions a 115-residue-long domain homologous to FHA (9). This highly conserved segment is hypothesized to interact with the cognate accessory protein. In agreement with this proposal, the deletion of this region totally abolishes the secretion of FHA (35), whereas several truncated forms of FHA which retain this region are secreted very efficiently in a FhaC-dependent manner (28). Small in-frame deletions as well as certain point mutations within this segment of ShlA affected both its secretion and activation (31). In particular, replacements of Asn-69 or Asn-109 in ShlA abolished its secretion and activation by ShlB, whereas alterations of other residues had much less drastic effects.

These two asparagine residues are among the strictly conserved residues of the three hemolysins and FHA, and they are contained within N(S/P)(N/H)L and NPNG(I/M) motifs (Table 1). The NPNGI sequence is also found in the HMWA adhesins. Except for the conservation of this short motif, the HMWAs are only distantly related to the other four proteins, even though an anti-FHA monoclonal antibody was found to cross-react with these adhesins (2).

In spite of the similarities shared by the secretion systems of the three hemolysins, FHA, and HMWA, they also show important differences. The hemolysins are most likely secreted with the help of classical signal peptides, whereas the N-terminal segments of FHA (15) and HMWA (3) do not function as typical signal peptides although they are proteolytically removed upon biogenesis. This N-terminal maturation appears to be much more extensive for HMWA than for FHA. In addition and unlike that of the hemolysins, the secretion of FHA involves extensive C-terminal processing of a large precursor (10, 27, 28). Finally, the hemolysins acquire hemolytic activity via activation by their cognate accessory proteins, whereas the adhesins are unlikely to require activation.

In view of these similarities and differences between the secretion systems of FHA and the hemolysins, we attempted cross-complementations between the FHA-FhaC and the

^{*} Corresponding author. Mailing address: INSERM U447, Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, 59019 Lille Cédex, France. Phone: (33) 3 20 87 77 28. Fax: (33) 3 20 87 79 06.

[†] Present address: Pasteur Mérieux S.V., 69280 Marcy l'Etoile, France.

TABLE	1.	Family	of	secretory	proteins
-------	----	--------	----	-----------	----------

Organism	Secretory protein	Accessory protein(s)	Conserved motif(s)	
Proteus mirabilis	Hemolysin HpmA	HpmB	ANSNL SNPNGT	
Serratia marcescens	Hemolysin ShlA	ShIB	ANPNI, ANPNGI	
Haemophilus ducreyi	Hemolysin HhdA	HhdB	ANPHI, VNPNGM	
Haemophilus influenzae	Adhesin HMW1A	HMW1B: HMW1C	TNPNGT	
	Adhesin HMW2A	HMW2B: HMW2C	INPNGI	
Bordetella pertussis	Adhesin FHA	FhaC	KNPNL ANPNGI	

HpmA-HpmB secretion systems and report here the lack of functional complementation between them, although one of the conserved asparagines appeared to be essential for FHA secretion.

MATERIALS AND METHODS

Strains and plasmids. The relevant features of the *B. pertussis* and *Escherichia coli* strains and of the plasmids used in this study are shown in Table 2, and culture conditions were described previously (15).

Plasmids pBG4, pFJD6, pFJD8, pFJD9, pFJD11, and pFJD12 were described previously, as indicated in Table 2. pBG10 was constructed as follows. A 471-bp fragment of *hpmA* encoding the region of homology between HpmA and FHA was amplified by PCR with pWPM100 (34) as a template and the following oligonucleotides as primers: 5' TACTGCAGGTTATTGGTGGTACGCAA GTC 3' and 5' TACTGCAGAATACGAGGAGCAATTAAGTC 3', each containing a PstI site (underlined). Following amplification, the PCR product was restricted by PstI and cloned into the PstI site of pUC18-4 (28), resulting in pUC18-4P. The 1.26-kb Sall-BamHI fragment isolated from pRIT13197 (9) was then inserted into the corresponding site of pUC18-4P to create pUC18-5P, and the 2.1-kb SphI-BamHI fragment from pUC18-5P was exchanged for its wild-type counterpart in pBG4 (28). To construct pEC11B, a 2.5-kb MluI-BamHI fragment from pBG10 was cloned into the corresponding sites of pEC11 (15). pEC11B was then digested with XbaI, treated with Klenow enzyme, and then redigested with BamHI. The resulting 2.8-kb fragment containing a translational fusion between the OmpA signal peptide coding sequence and the chimeric hpmA-fha44 gene was cloned into pMMB91 (13), which had been digested with EcoRI, treated with Klenow enzyme, and redigested with BamHI, so that the chimeric gene was brought under the control of the tac promoter. The resulting plasmid was called pFJD21. pFJD20 was obtained by digesting pWPM100 with *Eco*NI, treating it with Klenow enzyme, and redigesting it with *Xba*I. The resulting 3.9-kb hpmA-containing fragment was then cloned into the HincII and XbaI sites of pBBR1MCS (16), placing hpmA under the control of the lac promoter. pFJD23 was constructed by digesting pWPM100 with Sau96I, treating it with Klenow enzyme, and redigesting it with PstI. The resulting hpmB-containing 1.85-kb fragment of pWPM100 was cloned into pMMB67HE, which had been digested with XbaI, treated with Klenow enzyme, and then redigested with PstI, placing hpmB under the control of the tac promoter. pFJD30 was obtained by cloning the same fragment into pQE32, which had been digested with *Hind*III, treated it with Klenow enzyme, and redigested it with *Pst*I, placing *hpmB* under the control of the *tac* promoter. pFJD18 was obtained by digesting pFJD2 (15) with EcoRI, filling the site with Klenow enzyme, and redigesting with BcI. The resulting 2.2-kb fhaC-containing fragment from pFJD2 was cloned into pET22B (Novagen, Madison, Wis.), which had been digested with NdeI, treated with Klenow enzyme, and redigested with BamHI, placing fhaC under the control of the T7 promoter. pFJD33 was constructed by cloning the 3.2-kb SalI-XbaI fragment containing shlB from pMH1 into the corresponding sites of pET22B, placing *shlB* under the control of the T7 promoter. Oligonucleotide-directed mutagenesis. The Sculptor in vitro mutagenesis sys-

Oligonucleotide-directed mutagenesis. The Sculptor in vitro mutagenesis system (Amersham RPN 1526) was used as recommended by the supplier to introduce the chosen mutations into the *fha44* gene. The template for site-directed mutagenesis was generated as follows. A 0.86-kb *Eco*RI-NorI fragment from pRIT13197 containing the promoter region and the 5' end of *fhaB* was cloned into the corresponding sites of pBluescript KS⁺, generating pCB1. This plasmid was then digested with *AccI* and *SacI*, and the insert was transferred into M13mp19 to give rise to ϕ CB2. To create ϕ EC1, the *NciI* site present 29 b 3' of *Eco*RI in the 0.86-kb *Eco*RI-*NorI* fragment of ϕ CB2 was eliminated with the oligonucleotide 5'-ACCCGCTCCCTGCCCGCC-3' (The bold letter indicates the mismatch between the oligonucleotide and the template.) This construct was necessary to optimize the efficiency of further mutagenesis experiments.

In the recombinant phages ϕ Fha44-N137I and ϕ Fha44-N176I, codons 137 and 176 of the *fha44* gene were converted from AAC (asparagine) to ATC (isoleucine) by two mutagenesis reactions involving single-stranded ϕ EC1 as the template and the mutant oligonucleotides 5'-GGTTGGGGATCTTGGTCAGC-3' and 5'-CGTTGGGGATGGCGATGATG-3', respectively (e.g., N137I repre-

sents the N-to-I mutation at position 137). The presence of the desired mutations and the absence of any other changes in the *fha44* portion of the recombinant phages were confirmed by DNA analysis with the T7 sequencing kit (Pharmacia Biotech).

The mutant *fha44* DNA segments were then introduced into the *fha44* expression vector pFJD9 as follows. The 0.86-kb *Eco*RI-*Not*I fragment of pFJD9 (15) was replaced by a 1.0-kb *Eco*RI-*Not*I fragment of foreign DNA, giving rise to pCB3. The 0.86-kb *Eco*RI-*Not*I segments of double-stranded ϕ Fha44-N1371 and ϕ Fha44-N1761 were then substituted in pCB3 for the 1.0-kb fragment. The subsequent digestion of plasmid DNA allowed a simple and reliable detection of the mutant Fha44-encoding vectors, which were named pFJD9-N1371 and pFJD9-N1761, respectively.

To express the mutant *fha44* genes in *E. coli*, pFJD38 and pFJD39, which encode translational fusions of the OmpA signal peptide with Fha44-N1371 and Fha44-N1761, respectively, were obtained as follows. The replicative forms of ϕ FHA-N1371 and ϕ FHA-N1761 were restricted with *Sph1* and *No1*, and the resulting 0.5-kb *Sph1-No1* fragments encompassing the mutated regions were purified and exchanged for their wild-type counterpart in pEC11 (15), yielding plasmids pFJD36 and pFJD37, respectively. After sequencing the inserts of these plasmids, pFJD36 and pFJD37 were digested with *Xba1*. The resulting protruding ends were filled in with Klenow enzyme and the plasmids were then redigested with *BamHI*. The 2.7-kb fragments thus obtained were cloned into pMMB91 to place the translational fusions under the control of the *tac* promoter, resulting in pFJD38 and pFJD39.

Measurement of hemolytic activities. E. coli UT5600 transformed with pFJD20 alone or together with pFJD6 (fhaC⁺), pFJD23 (hpmB⁺), or pFJD30 (hpmB⁺) or HMS174(DE3) transformed by pFJD20 (hpmA⁺) alone or together with pFJD18 (fhaC⁺) or pFJD33 (shlB⁺) was grown in Luria-Bertani liquid medium with the required antibiotics to an absorbancy of 0.8 at 600 nm. For the UT5600 strains, the expression of the genes was induced by the addition of 1 mM (final concentration) IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) for 2 h. For HMS174(DE3) strains, the expression of the T7 polymerase was induced by treatment with 2 mM (final concentration) IPTG for 1 h. After centrifugation of the cultures, the supernatant fractions were kept on ice, and the pellets were resuspended in the same volume of 0.9% NaCl as the initial culture and split into two parts. The first part was kept on ice, and the second part was washed in 0.9% NaCl and subjected to sonication on ice. The sonicates were clarified by a centrifugation at 7,000 \times g for 15 min. Two hundred microliters of culture supernatants, washed whole cells, or clarified sonicates was mixed with 800 µl of a 1.25% suspension of extensively washed rabbit erythrocytes in 0.9% NaCl and incubated at 37°C for 30 min. The suspensions were then briefly centrifuged, and the absorbancy of the supernatants was determined at 540 nm. Two hundred microliters of culture medium, as a control for the culture supernatants, or 0.9% NaCl, as a control for whole cells or sonicate extracts, was mixed with the erythrocytes, and the mixture was processed as described above. The absorbancy at 540 nm of the controls was subtracted from that of the samples. The activities are expressed as the average absorbancy at 540 nm per 30 min of incubation for three to four separate experiments.

Protein analyses. To prepare the protein samples, liquid cultures of the various *E. coli* strains were grown in LB medium to an absorbancy of about 1 at 600 nm. The expression of the genes encoding the secretory and the accessory proteins was induced by the addition of IPTG at a final concentration of 1 mM for 3 h. Culture supernatants were then collected by centrifugation and concentrated by precipitation with 6% trichloroacetic acid and 20 mM deoxycholate where specified. Cell pellets were resuspended in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7) in one-fifth of the original volume of culture and sonicated on ice with 1-min pulses until the cell suspension became clear by visual inspection. The sonicates were centrifuged for 15 min at 7,000 × g. The amounts of total proteins present in the extracts were determined by measuring the absorbancy of these supernatants at 280 nm to correct for differences in sonication efficiencies.

Liquid cultures of *B. pertussis* containing the appropriate plasmids were grown in Stainer-Scholte medium supplemented with 0.1% dimethyl- β -cyclodextrin (Teijin Ltd., Tokyo, Japan) and the required antibiotics for 2 to 3 days until the late exponential phase. Cells and supernatants were separated by centrifugation. Where mentioned, cell pellets were sonicated as described above for *E. coli*. Culture supernatants of *B. pertussis* were not concentrated prior to analysis. For comparisons, the same volumes of supernatants from cultures having reached the same absorbancies at 600 nm were loaded onto 10 or 12% polyacrylamide gels

Strain, phage, or plasmid	Relevant features	Reference or source		
Strains '				
R pertussis				
BPSM	Sm ^r Nal ^r Tohama I derivative	21		
BPCDA	BPSM derivative with a chromosomal deletion of $fhaB$	20		
E coli	Di Sivi derivative with a emoniosonial deletion of <i>Judb</i>	20		
UT5600	$\Delta(ompT-fepC)$	E. coli Genetic Stock Center		
HMS174(DE3)	T7 polymerase under the control of a lac UV5 promoter	Novagen, Madison, Wis.		
Phages				
φCB2	900-bp AccI-SacI fragment from pCB1 containing the 5' region of <i>thaB</i> in M13mp19	This work		
	Φ CB2 derivative with a mutation eliminating the <i>Nci</i> site of the <i>fhaB</i> insert	This work		
6EHA-N137I	N1371 mutation in dFC1	This work		
фГНА-N1761	N1761 mutation in $\Phi EC1$	This work		
4				
Plasmids				
Cloning vectors				
pBBR122	Broad-host-range cloning vector, Km ^r	1		
pBBR1MCS	Broad-host-range cloning vector derived from pBBR122, Cm ^r	16		
pBlueScript KS ⁺		Stratagene		
pET22B	Promoter of phage T7 for high-level expression	Novagen		
pMMB67	Broad-host-range vector containing the <i>tac</i> promoter, Amp ^r	13		
pMMB91	Broad-host-range vector containing the tac promoter, Km ^r	13		
pQE32	Expression vector containing the T5 promoter and <i>lac</i> operator sequences	Diagen		
Intermediate constructs		6		
pRIT13197	6-kb <i>Eco</i> RI - <i>Bam</i> HI fragment containing the 5' end of <i>fhaB</i> in pUC8	9		
nUC18-3	1.26-kb SphI-Sall fhaB fragment in pUC18	28		
pUC18-4	pUC18-3 with a deletion of internal 471-bn <i>PstI</i> fragment	28		
pUC18-4P	Similar to pUC18-3 but with 471-bp <i>PstI</i> fragment replaced by the corresponding fragment	This work		
	ot hpmA			
pUCI8-SP pEC11	2.3-kb 3ph1-BamH1 tragment of <i>jha44</i> with the <i>Pst</i> 1 tragment of <i>hpmA</i> Translational fusion encoding OmpA signal peptide plus Fha44 (residues 3 to 862) in	1 his work 15		
pEC11B	Similar to pEC11 except for the replacement of the Fha44 region of homology by that of HomA	This work		
pFID2	Two tandem copies of $fhac$ on $Bcl1$ fragments in pOE32	15		
pWPM100	hom B and hom A in n I I C 19	34		
pCB1	0.86-kb EcoRI-NotI fragment containing the 5' end of <i>fhaB</i> in pBluescript KS ⁺	This work		
pMH1	sh/B in nACVC184	Gift of V Braun		
pFID36	nEC11 derivative with the N137I point mutation	This work		
pFID37	pEC11 derivative with the N1761 point mutation	This work		
Expression plasmids	peerr derivative with the 1970r point matation			
pBG4	2.8-kb EcoRI-BamHI fragment containing the 5' end of fhaB (fha44) in pBBR122	28		
pBG10	Hemolysin-homologous region of <i>fha44</i> replaced by the corresponding fragment of <i>hpmA</i>	This work		
pFJD6	fhaC in pQE32	15		
pFJD8	fhaC in pMMB67	15		
pFJD9	fha44 in pMMB91	15		
pFJD9-N137I	pFJD9 derivative with the N137I point mutation	This work		
pFJD9-N176I	pEID9 derivative with the N176I point mutation	This work		
pFJD11	Translational fusion encoding OmpA signal peptide plus Fha44 (residues 3 to 862) in pMMB91	15		
pFJD12	Translational fusion encoding OmpA signal peptide plus Fha44 (residues 34 to 862) in pMMB91	15		
pFJD20	hpmA from pWPM100 in pBBR1MCS	This work		
pFJD21	Translational fusion encoding OmpA signal peptide plus the Fha44-HpmA chimera (residues 3 to 862) in pMMB91	This work		
pFJD23	hpmB from pWPM100 in pMMB67HE	This work		
pFJD30	hpmB from pWPM100 in pQE32	This work		
pFJD33	shlB from pMH1 in pET22B	This work		
pFJD38	Translational fusion encoding OmpA signal peptide plus Fha44 (residues 3 to 862) with the N137I point mutation in pMMB91	This work		
pFJD39	Translational fusion encoding OmpA signal peptide plus Fha44 (residues 3 to 862) with the N176I point mutation in pMMB91	This work		

TABLE 2.	Strains,	phages,	and	plasmids	used	in	this study	
		1 13 /					/	

and separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Similarly, equivalent amounts of total proteins from sonicate extracts as determined by the absorbancy at 280 nm of the clarified protein solutions were subjected to SDS-PAGE. The proteins were electrotransferred

onto nitrocellulose membranes and developed with either an anti-Fha44 polyclonal antiserum (15), an anti-FHA polyclonal antiserum (15), or an anti-HpmA polyclonal antiserum (kindly provided by R. Welch, Madison, Wis.). All antisera were used at a 500-fold dilution.



FIG. 1. Secretion of Fha44 in *E. coli*. Culture supernatants (A) and cell sonicates (B) of UT5600 (lanes 2), UT5600(pFJD12) (lanes 3), UT5600(pFJD12, pFJD6) (lanes 4), and UT5600(pFJD12, pFJD30) (lanes 5) were analyzed by immunoblotting with an anti-Fha44 polyclonal antiserum. The same-size volumes of 10-fold-concentrated supernatants were loaded in lanes 2 to 5 of panel A. In panel B, similar amounts of proteins from the clarified sonicates were loaded in lanes 2 to 5. Prestained marker proteins are shown in the leftmost lane of panel A, and their molecular sizes in kilodaltons are given in the left margin. Fha44 secreted in the culture supernatant of *B. pertussis* BPGR4(pBG4) is shown as a control in lanes 1.

Quantitation of secreted Fha44 was performed with an enzyme-linked immunosorbent assay as described previously (15).

RESULTS

Lack of complementation of *fhaC* by *hpmB*. Previous studies have indicated that the major secretion determinant of FHA is located in its amino-proximal region and that a truncated N-terminal FHA fragment, named Fha44, is secreted very efficiently in an FhaC-dependent manner by both *B. pertussis* and *E. coli* (15, 28). We therefore used Fha44 to examine whether the secretion machineries of FHA and the hemolysins are exchangeable.

In *E. coli*, Fha44 is efficiently secreted in an FhaC-dependent fashion only if the OmpA signal peptide is fused to its N-terminal end (15). The chimeric protein is encoded by pFJD12 (15). To determine whether HpmB can functionally replace FhaC for Fha44 secretion, *E. coli* UT5600(pFJD12) was transformed with pFJD30, containing *hpmB*. As shown in Fig. 1A,

the presence of HpmB did not enhance the production of extracellular Fha44 over that of UT5600(pFJD12). Only very small amounts of Fha44 were detected in culture supernatants of *E. coli* UT5600(pFJD12) regardless of the presence of *hpmB* (Fig. 1A, lanes 3 and 5), in contrast to that detected in *E. coli* UT5600(pFJD12, pFJD6) containing *fhaC* in addition to *fha44* (Fig. 1A, lane 4). Anti-Fha44 immunoreactive proteins of the expected size were present in the cell sonicates of all strains that contained the Fha44-encoding gene (Fig. 1B, lanes 3 to 5). The low level of FhaC-independent secretion of Fha44 by *E. coli* most likely results from nonspecific leakage or slight cellular lysis, as observed previously (15). These observations suggest that HpmB cannot replace FhaC for efficient secretion of Fha44 in *E. coli*.

The absence of complementation was not caused by the lack of production or function of HpmB, since coexpression of *hpmA* and *hpmB* in UT5600(pFJD20, pFJD30) resulted in readily detectable extracellular hemolytic activity, whereas nonrecom-

TABLE 3.	Hemolytic	activities	of various E	. coli strains
----------	-----------	------------	--------------	----------------

Startin .		HpmB	FhaC	ShiB	Hemolytic activity ^a			
Strain	нртА				Supernatants	Whole cells	Sonicates	
UT5600		_		_	0	0	0	
UT5600(pFJD20)	+	-	-	-	0	0	0	
UT5600(pFJD20, pFJD6)	+	-	+	-	0	0	0.013 (0.002)	
UT5600(pFJD20, pFJD23)	+	+	-	_	2.4 (0.65)	2.1 (0.65)	0.22 (0.12)	
UT5600(pFJD20, pFJD30)	+	+	_	-	2 (0.4)	3.5 (0.5)	ND ^b	
HMS174(DE3)			_	-	Ó	0.10 (0.04)	ND	
HMS174(DE3, pFJD20)	+	-	_	-	0	0.013 (0.006)	ND	
HMS174(DE3, pFJD20, pFJD18)	+	_	+	_	0	ò	ND	
HMS174(DE3, pFJD20, pFJD33)	+	-	-	+	1.72 (0.11)	1.84 (0.19)	ND	

^a Hemolytic activities are expressed as average absorbancies at 540 nm following a 30-min incubation of rabbit erythrocytes with supernatants, whole cells, or cell sonicates of the indicated strains. Standard deviations are given in parentheses.

^b ND, not determined.



FIG. 2. Lack of secretion of a Fha44-HpmA chimera in *E. coli*. Culture supernatants (A) and cell extracts (B) of UT5600(pFJD21) (lanes 1), UT5600(pFJD21, pFJD6) (lanes 2), UT5600(pFJD21, pFJD30) (lanes 3), UT5600(pFJD11) (lanes 4), UT5600(pFJD11, pFJD6) (lanes 5), and UT5600(pFJD11, pFJD30) (lanes 6) were analyzed by immunoblotting with an anti-Fha44 polyclonal antiserum. The same-size volumes of 10-fold-concentrated supernatants were loaded in each lane of panel A. In panel B, similar amounts of proteins from the clarified sonicates were loaded. *chim.* denotes the *fha44-hpmA* chimeric gene. Note the presence of the mature (mFha44) and precursor (pFha44) forms of Fha44 derivatives in cell extracts, as already reported when pFJD11 was used (15). Prestained marker proteins are shown in the leftmost lane of panel A, and their molecular sizes in kilodaltons are given in the left margin.

binant UT5600 or UT5600(pFJD20) only expressing *hpmA* produced no detectable extracellular hemolytic activity (Table 3).

We attempted to determine whether HpmB could promote the secretion of FHA in *B. pertussis*. Since pFJD6 and pFJD30 do not replicate in *B. pertussis*, we cloned the *fhaC* and *hpmB* genes in pMMB67, under the control of the *tac* promoter, yielding pFJD8 and pFJD23, respectively. These plasmids were introduced into a *B. pertussis* strain with a chromosomal deletion of *fhaC*. Only FhaC, but not HpmB, was able to restore the production of extracellular FHA (data not shown). However, functional expression of *hpmB* from pFJD23 in *B. pertussis* could not be demonstrated, although HpmB produced in *E. coli* from the same plasmid was able to activate HpmA (Table 3).

Lack of secretion of a HpmA-Fha44 chimera. FHA and HpmA have a 115-residue-long homologous region (9) that was shown to be essential for FHA secretion (28, 35). To investigate whether this HpmA region can functionally replace the homologous FHA region, the corresponding segment of hpmA was exchanged for the homologous fragment in fha44. The resulting chimeric gene was fused to the OmpA signal peptide-coding sequence, and the plasmid encoding this construct, named pFJD21, was introduced in UT5600 either alone or together with pFJD6 containing *fhaC* or pFJD30 containing hpmB. The supernatants and cell sonicates were analyzed by immunoblotting with anti-Fha44 antibodies. Only minute amounts of chimeric Fha44-HpmA were detected in the culture supernatants of the three strains containing pFJD21, irrespective of the presence of *fhaC* or *hpmB* (Fig. 2A, lanes 1 to 3), in contrast to that of wild-type Fha44 produced in the presence of FhaC (Fig. 2A, lane 5), indicating that neither HpmB nor FhaC is able to mediate the secretion of the chimeric protein. The Fha44-HpmA chimera and its precursor, however, were detected in cell sonicates of all strains expressing the hybrid gene (Fig. 2B, lanes 1 to 3).

The hybrid gene was also introduced in B. pertussis BPSM

and BPGR4 by use of plasmid pBG10, but no anti-Fha44 immunoreactive protein was detected in the culture medium or was cell associated (data not shown), suggesting a rapid proteolytic degradation of the chimera.

Lack of complementation of hpmB by fhaC. Since HpmB could not complement the lack of FhaC function, it was of interest to know whether FhaC could mediate the secretion and activation of HpmA. Therefore, pFJD20 containing hpmA was introduced in E. coli UT5600 alone or together with pFJD6, encoding FhaC, or pFJD23, encoding HpmB. No significant hemolytic activity was detected in any of the fractions (supernatants, whole cells, or sonicates) of the strains expressing homA alone or in trans with fhaC (Table 3). In contrast, a high level of hemolytic activity was detected in the culture supernatant and on the cell surface of the strain coexpressing hpmA and hpmB, UT5600(pFJD20, pFJD23) (Table 3). A 10-fold-lower activity was found in sonicates of UT5600 (pFJD20, pFJD23) as compared with that found in whole cells or culture supernatants. This is similar to previous reports showing that secretion and activation of the highly related ShIA hemolysin are tightly coupled (30). Efficient secretion of HpmA was confirmed by the presence of an anti-HpmA immunoreactive protein of the expected size (about 160 kDa) in the supernatant of the strain coexpressing hpmA and hpmB but not in the culture supernatants of the other strains (data not shown). These observations argue that significant levels of activation and secretion of HpmA are mediated by HpmB but not by FhaC.

We investigated whether ShIB can activate and mediate the secretion of HpmA. Since it has been shown that the in vitro activation of ShIA requires stoichiometric quantities of its accessory protein ShIB (22), a system for high-level expression was chosen. pFJD20 containing *hpmA* was introduced into *E. coli* HMS174(DE3) together with pFJD33 containing *shIB*. As shown in Table 3, the coexpression of *shIB* and *hpmA* resulted in significant levels of hemolytic activity in culture supernatants



FIG. 3. Secretion of mutant Fha44s in *B. pertussis*. Culture supernatants (lanes 2 to 5) and cell sonicates (lanes 6 to 9) of BPGR4 (lanes 2 and 6), BPGR4 (pFJD9) (lanes 3 and 7), BPGR4(pFJD9-N1371) (lanes 4 and 8), and BPGR4 (pFJD9-N1761) (lanes 5 and 9) were analyzed by immunoblotting with an anti-Fha44 polyclonal antiserum. The same-size volumes of unconcentrated supernatants from liquid cultures whose optical density at 600 nm was about 5.0 were loaded in lanes 2 to 5. Similar amounts of proteins from the clarified sonicates were loaded in lanes 6 to 9. In addition to full-size Fha44, smaller immunoreactive proteins, probably proteolytic degradation products of Fha44, are detected in culture supernatants and sonicate extracts of BPGR4 containing pFJD9 or pFJD9-N176I. Lane 1 contains prestained marker proteins, and the corresponding molecular sizes in kilodatons are given in the left margin.

and whole cells, demonstrating that the two hemolysin accessory proteins are functionally interchangeable. In contrast, ShIB proved unable to mediate the secretion of Fha44 in *E. coli* (data not shown).

These results prompted us to examine whether FhaC would be able to activate HpmA if produced at a high level. *fhaC* was expressed from the T7 promoter with plasmid pFJD18 in *E. coli* HMS174(DE3), which increased the level of FhaC production (data not shown). However, when pFJD20 expressing *hpmA* was introduced into this strain, significant hemolytic activity was still not detected in the culture supernatants or on whole cells (Table 3), confirming again that FhaC, in contrast with HpmB or ShlB, cannot mediate the activation and secretion of HpmA.

Effect of alterations of the conserved asparagine residues on Fha44 secretion. Two asparagine residues of ShlA (Asn-69 and Asn-109) that lie within the region homologous to FHA have been shown to be essential for ShIA secretion and activation by ShlB (31). Since the hemolysin and FHA accessory proteins are not functionally interchangeable, it was of interest to investigate whether the corresponding asparagine residues of FHA, Asn-137 and Asn-176, respectively, are nevertheless important for its secretion. Each asparagine residue was therefore replaced by isoleucine as described for ShlA. The mutated gene segments were substituted for their wild-type counterpart in pFJD9, which encodes Fha44. The mutant plasmids, pFJD9-N137I and pFJD9-N176I, respectively, were used to transform B. pertussis BPGR4. The recombinant strains were analyzed for the presence of Fha44-related proteins in the culture supernatants (Fig. 3). Replacement of Asn-137 by isoleucine totally abolished the secretion of Fha44, whereas the replacement of Asn-176 by isoleucine reduced Fha44 secretion by approximately 80 to 90%, as estimated by enzyme-linked immunosorbent assay. The mutated gene fragments were also introduced into the chromosomal *fhaB* locus by homologous recombination to place the mutation in the context of full-length fhaB. The secretion of FHA-N137I and FHA-N176I was affected in a fashion similar to that of their respective Fha44 counterparts (data not shown). This contrasts somewhat with the results obtained for ShIA, where mutations of either residue totally abolished the secretion and activation of the hemolysin. Anti-Fha44 immunoreactive proteins of the sizes of Fha44 and its major proteolytic products were present in cell sonicates of BPGR4(pFJD9-N176I) but in significantly smaller amounts than in cell sonicates of BPGR4(pFJD9) producing wild-type Fha44 (Fig. 3, lane 7 versus lane 9). Only breakdown products were detected in sonicate extracts of BPGR4(pFJD9-N137I) (Fig. 3, lane 8), suggesting that the Fha44 derivatives are rapidly degraded in *B. pertussis*.

Alternatively, the expression of the mutant gene could be inhibited by a feedback mechanism, as described for other secretory proteins (12). We therefore examined whether the presence of either mutant Fha44 interfered with the production of wild-type FHA by using BPSM(pFJD9), BPSM(pFJD9-N137I), and BPSM(pFJD9-N176I), B. pertussis strains containing the genes for both full-length FHA and the respective Fha44 variants, each under the control of the *fhaB* promoter. As shown in Fig. 4, FHA was found in similar amounts in the supernatants from all the cultures at the exponential phase (lanes 1, 3, 5, and 7) and at the early stationary phase (lanes 2, 4, 6, and 8). In addition, Fha44 was absent from the culture supernatant of BPSM(pFJD9-N137I), whereas it was secreted by BPSM(pFJD9-N176I), although in small quantities compared with that secreted by BPSM(pFJD9) (lanes 4, 6, and 8). The presence of the secretion-deficient Fha44 variants apparently did not lower the level of production of extracellular FHA, arguing that the mutant Fha44 proteins did not exert feedback inhibition on FHA production.

The lack of cell-associated and extracellular Fha44-N137I may also conceivably be due to an intrinsic instability of this protein compared with Fha44. Since secretion-incompetent proteins in *B. pertussis* are readily degraded (20, 28), this is difficult to assess in this organism. We therefore introduced the mutated genes into the *E. coli* Fha44 secretion system together with pFJD6 containing *fhaC*. Cell-associated anti-



FIG. 4. Secretion of FHA in *B. pertussis* in the presence of mutant Fha44 proteins. Culture supernatants of BPSM(pMMB91) (lanes 1 and 2), BPSM(pFJD9) (lanes 3 and 4), BPSM(pFJD9-N137I) (lanes 5 and 6), and BPSM(pFJD9-N176I) (lanes 7 and 8) collected at the exponential phase (lanes 1, 3, 5, and 7) and at the early stationary phase (lanes 2, 4, 6, and 8) were analyzed by SDS-8% PAGE and Coomassie blue staining. The positions of FHA and Fha44 are indicated. The molecular sizes of the markers in kilodaltons are given in the left margin.


FIG. 5. Secretion of the mutant Fha44 proteins in *E. coli*. Culture supernatants (A) and cell sonicates (B) of UT5600 (lanes 1), UT5600(pFJD11) (lanes 2), UT5600(pFJD11, pFJD6) (lanes 3), UT5600(pFJD38) (lanes 4), UT5600(pFJD38, pFJD6) (lanes 5), UT5600(pFJD39) (lanes 6), and UT5600(pFJD39, pFJD6) (lanes 7) were analyzed by immunoblotting with an anti-Fha44 polyclonal antiserum. The same volumes of supernatants were loaded in each lane of panel A. Similar amounts of proteins from the clarified sonicates were loaded in each lane of panel B. The positions of the Fha44 precursor (pFha44) and processed Fha44 (mFha44) are indicated in the left margin. Prestained marker proteins are shown in the rightmost lane of panel B, and their molecular sizes in kilodaltons are given in the right margin.

Fha44 immunoreactive proteins were present in the cell sonicates of UT5600(pFJD38) expressing fha44-N137I and UT5600(pFJD39) expressing fha44-N176I, irrespective of the presence of FhaC (Fig. 5B, lanes 4 to 7), in amounts similar to those of Fha44 (Fig. 5B, lanes 2 and 3). Size estimations of the immunoreactive proteins indicated that these strains contained the nonprocessed and mature forms of the Fha44 derivatives together with smaller proteolytic degradation products. In addition, Fha44-N176I was present in the culture supernatants of E. coli UT5600(pFJD6, pFJD39), although in significantly smaller amounts than Fha44 secreted by UT5600(pFJD6, pFJD11) (Fig. 5A, lanes 3 and 7). In contrast, no Fha44-N137I was detected in the supernatants of the strains coexpressing fha44-N137I and fhaC (Fig. 7A, lane 5) or lacking fhaC (Fig. 5A, lanes 2, 4, and 6), although small amounts of the Fha44 precursors were found to have leaked out of these cells. The results obtained with E. coli are similar to those obtained with B. pertussis and indicate that Asn-137 plays a more crucial role than Asn-176 in the secretion of Fha44.

DISCUSSION

Complementation of defects in a secretion machinery with components of a similar secretion apparatus have been attempted in various systems. For the type I secretion system, a high level of functional transcomplementation was suggested to be possible only above a given threshold of sequence similarity between the machineries or between the secretory proteins (11, 17). Heterologous complementation within the type II secretion system met with variable success and was not necessarily reciprocal (8, 18). Likewise, within the family of accessory proteins that make up the type III secretion system, functional transcomplementation was observed when the entire machinery was replaced by a homologous counterpart but was less successful when only individual elements were exchanged (29). The type II and type III machineries are composed of a large number of polypeptides (6, 12, 26). Several of them secrete several unrelated proteins and are thus somewhat promiscuous (14). In Vibrio cholerae, for instance, secretion of cholera toxin, the hemagglutinin/protease, and a chitinase depends on the type II Eps machinery (23). In contrast, *B. pertussis* appears to have adapted a specific secretion strategy for each of its secretory proteins. FHA, pertussis toxin, pertactin, and adenylate cyclase/hemolysin each depend on their own secretion machinery rather than upon a general secretory pathway. The high efficiency of the FHA secretion machinery may have evolved at the expense of polyvalency.

Although FHA and the P. mirabilis HpmA are two large proteins secreted with the help of similar accessory proteins, FhaC and HpmB, respectively, and share a 115-residue aminoproximal homologous region essential for FHA secretion, these two secretion machineries are not interchangeable. It is possible that the two systems are phylogenetically too distant. The level of strict identity of the outer membrane proteins FhaC and HpmB is only 16%, although they are similar throughout their entire length (35). On the other hand, the amino-proximal regions of FHA and HpmA have about 47% sequence identity over 115 residues (19). In contrast, HpmB has 55% identity with ShIB, the accessory protein involved in the secretion of the S. marcescens ShIA hemolysin, and the two hemolysins contain 46.7% identical residues (33). ShIB was previously shown to activate HpmA in vitro (22), and our results indicate that ShIB can functionally replace HpmB in vivo both for secretion and activation of HpmA.

Whereas the only role demonstrated to date for FhaC is linked to the secretion of FHA, ShlB and HpmB are involved in both secretion and activation of their cognate hemolysins (22, 30). Both activaties of ShlB have not been dissociated yet, and the activation and secretion of the hemolysins appear to be tightly coupled (5, 31). To date, there is no evidence to suggest that FHA undergoes an activation step. This may be one of the fundamental differences between FhaC on the one hand and ShlB and HpmB on the other hand. FhaC may be unable to activate HpmA, and it is reasonable to hypothesize that the accessory proteins of the Ca^{2+} -independent hemolysins possess an uncharacterized modifying activity absent in FhaC. Likewise, secretion of Fha44 cannot be mediated by HpmB, suggesting that the conserved region of FHA is not recognized by HpmB. This is somewhat more surprising, since the domain indispensable for hemolysin activation and secretion lies precisely in the region of homology shared by FHA and the hemolysins (31). Even the replacement of the amino-proximal region of FHA with that of HpmA did not restore HpmBmediated secretion, suggesting that it is not the sole secretion determinant of the protein.

Among the amino acid residues previously shown to be essential for the activation or secretion of ShlA, two asparagine residues are conserved in FHA (Table 1). Interestingly, sitedirected mutagenesis experiments described here indicate that both are involved in, but only the first one is essential for, FHA secretion, whereas both appeared to be equally important in ShIA secretion and activation, and only the second one is conserved in HMWA. Activation of ShIA is brought about by a direct interaction with ShIB and is likely to result from a modification, the nature of which has to date remained elusive (31). Several observations argue against a simple conformational change, and although the presence of a covalent adduct has not been shown, the putative modification appears to be irreversible. It takes place in the amino-proximal region of ShIA and confers upon the hemolysin the ability to adhere to erythrocytes (22). Whether one of the two invariant asparagine residues is actually the site of modification has not yet been demonstrated.

The absence of FhaC or alterations of FHA which impede its secretion apparently result in extensive proteolytic degradation of the secretory protein in B. pertussis. The fact that the Fha44 mutants are found to be cell associated in E. coli argues against a major defect in stability and in favor of a defect in secretion due to the mutations. In B. pertussis, the stress due to the presence of secretion-incompetent proteins in the cell envelope might conceivably activate an envelope protease(s), as recently described for E. coli (7), or alternatively result in a feedback inhibition of *fhaB* expression. Our results show that the nonsecreted FHA derivatives undergo extensive proteolytic degradation in B. pertussis. Indeed, accumulation of periplasmic intermediates does not seem to occur in B. pertussis (20, 28), suggesting that it has an efficient envelope proteolytic machinery. In addition, the partial proteolytic degradation even of secretion-competent FHA suggests that it might move across the cell envelope in an unfolded form, and thus a significant portion would remain sensitive to proteases before secretion is completed.

Obviously, FHA has evolved in a modular fashion by the juxtaposition of several functional blocks into a secretion-competent protein. The accessory protein FhaC may have adapted to fit specific requirements of its cognate secretory partner. In addition to the putative interaction between FhaC and the amino-proximal region of FHA, the 150-kDa carboxy-terminal extension of the FHA precursor appears to play an important role in secretion (28). Furthermore, it is not excluded that additional accessory proteins might be involved in the secretion of FHA. Such additional accessory proteins are required to mediate the secretion of the HMWA adhesins in H. influenzae (3). However, no homologs of these proteins, named HMWC, or any other accessory factors necessary for the secretion of FHA have been isolated yet, but it is quite likely that the secretion of FHA makes use of several general cellular factors that remain to be identified.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank E. Fort for excellent photographic work, M. Kovach, M. Bagdasarian, R. Welch, and V. Braun for the gift of plasmids, and J. Dubuisson and R. Antoine for critical reading of the manuscript. Dimethyl-β-cyclodextrin was kindly provided by Teijin Ltd.

F.J.-D. is a Chercheur of the Centre National de la Recherche Scientifique, and C.B. holds a fellowship from the Region Nord-Pas de Calais. The work was supported by a European Community Biotechnology grant and by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut Pasteur de Lille, and the Région-Nord-Pas de Cal-

REFERENCES

- 1. Antoine, R., and C. Locht. 1992. Isolation and molecular characterization of a novel broad-host range plasmid from Bordetella bronchiseptica with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. Mol. Microbiol. 6:1785-1799
- 2. Barenkamp, S. J., and E. Leininger. 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 J. W. St. Geme III. 1994. Genes encoding high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable Haemophilus influenzae are part of gene clusters. Infect. Immun. 62:3320-3328.
- 4. Braun, V., S. Hobbie, and R. Ondraczek. 1992. Serratia marcescens forms a new type of cytolysin. FEMS Microbiol. Lett. 100:299-306.
- 5. Braun, V., R. Ondraczek, S. Hobbie, and T. Focareta. 1992. Activation, secretion and mode of action of the Serratia marcescens haemolysin. Zentralbl. Bakteriol. Suppl. 23:478-488. 6. Cornelis, G. 1994. Yersinia pathogenicity factors. Curr. Top. Microbiol. Im-
- munol. 192:243-263.
- 7. Cosma, C. L., P. N. Danese, J. H. Carlson, T. J. Silhavy, and W. B. Snyder. 1995. Mutational activation of the Cpx signal transduction pathway of Escherichia coli suppresses the toxicity conferred by certain envelope-associated stresses. Mol. Microbiol. 18:491-505.
- 8. de Groot, A., A. Filloux, and J. Tommassen. 1991. Conservation of xcp genes, involved in the two-step secretion process, in different Pseudomonas species and other gram-negative bacteria. Mol. Gen. Genet. 229:278-284
- 9. Delisse-Gathoye, A.-M., C. Locht, F. Jacob, M. Raaschou-Nielsen, I. Heron, J.-L. Ruelle, M. De Wilde, and T. Cabezon. 1990. Cloning, partial sequence expression, and antigenic analysis of the filamentous hemagglutinin gene of Bordetella pertussis. Infect. Immun. 58:2895-2905.
- 10. Domenighini, M., D. Relman, C. Capiau, S. Falkow, A. Prugnola, V. Scarlato, and R. Rappuoli. 1990. Genetic characterization of Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. Mol. Microbiol. 4:787-800.
- 11. Fath, M. J., R. C. Skvirsky, and R. Kolter. 1991. Functional complementation between bacterial MDR-like export systems: colicin V, alpha-hemolysin, and Ewinia protease. J. Bacteriol. 173:7549-7556. 12. Forsberg, A., R. Rosqvist, and H. Wolf-Watz. 1994. Regulation and polarized
- transfer of the Yersinia outer proteins (Yops) involved in antiphagocytosis. Trends Microbiol. 2:14-19.
- 13. Fürste, J. P., W. Pansegrau, R. Frank, H. Blöcker, P. Scholz, M. Bagdasarian, and E. Lanka. 1986. Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range tacP expression vector. Gene 48:119-131.
- 14. He, S. Y., M. Lindberg, A. K. Chatterjee, and A. Collmer. 1991. Cloned Erwinia chrysanthemi out genes enable Escherichia coli to selectively secrete a diverse family of heterologous proteins into its milieu. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1079-1083.
- 15. Jacob-Dubuisson, F., C. Buisine, N. Mielcarek, E. Clément, F. D. Menozzi, and C. Locht. 1996. Amino-terminal maturation of the Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin (FHA) upon secretion. Mol. Microbiol. 19:65-78.
- 16. Kovach, M. E., R. W. Phillips, P. H. Elzer, R. M. I. Roop, and K. M. Peterson. 1994. pBBR1-MCS: a broad-host-range cloning vector. BioTechniques 16:800-802
- 17. Létoffé, S., J. M. Ghigo, and C. Wandersman. 1994. Secretion of the Serratia marcescens HasA protein by an ABC transporter. J. Bacteriol. 176:5372-5377.
- 18. Lindeberg, M., G. P. C. Salmond, and A. Collmer. 1996. Complementation of deletion mutations in a cloned functional cluster of Erwinia chrysanthemi out genes with Erwinia carotovora out homologues reveals OutC and OutD as candidate gatekeepers of species-specific secretion of proteins via the type II pathway. Mol. Microbiol. 20:175-190.
- 19. Locht, C., P. Bertin, F. D. Menozzi, and G. Renauld. 1993. The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesin produced by virulent Bordetella spp. Mol. Microbiol. 9:653-660.
- 20. Locht, C., M.-C. Geoffroy, and G. Renauld. 1992. Common accessory genes for the Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the papC and papD gene families. EMBO J. 11: 3175-3183.
- 21. Menozzi, F. D., R. Mutombo, G. Renauld, C. Gantiez, J. H. Hannah, E. Leininger, M. J. Brennan, and C. Locht. 1994. Heparin-inhibitable lectin

activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. Infect. Immun. **62:**769–778.

- Ondraczek, R., S. Hobbie, and V. Braun. 1992. In vitro activation of the Serratia marcescens hemolysin through modification and complementation. J. Bacteriol. 174:5086-5094.
- Overbye, L. J., M. Sandkvist, and M. Bagdasarian. 1993. Genes required for extracellular secretion of enterotoxin are clustered in *Vibrio cholerae*. Gene 132:101-106.
- Palmer, K. L., and R. S. J. Munson. 1995. Cloning and characterization of the genes encoding the haemolysin of *Haemophilus ducreyi*. Mol. Microbiol. 18:821-830.
- Poole, K., E. Schiebel, and V. Braun. 1988. Molecular characterization of the hemolysin determinant of *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. 170:3177–3188.
- Pugsley, A. P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. Microbiol. Rev. 57:50–108.
- Relman, D. A., M. Domenighini, E. Tuomanen, R. Rappuoli, and S. Falkow. 1989. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2637-2641.
- Renauld-Mongénie, G., J. Cornette, N. Mielcarek, F. D. Menozzi, and C. Locht. 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.
- 29. Rosqvist, R., S. Hakansson, A. Forsberg, and H. Wolf-Watz. 1995. Func-

tional conservation of the secretion and translocation machinery for virulence proteins of yersiniae, salmonellae and shigellae. EMBO J. 14:4187-4195.

- Schiebel, E., H. Schwarz, and V. Braun. 1989. Subcellular localization and unique secretion of the hemolysin of *Serratia marcescens*. J. Biol. Chem. 264: 16311-16320.
- Schönherr, R., R. Tsolis, T. Focareta, and V. Braun. 1993. Amino acid replacements in the Serratia marcescens haemolysin ShIA define sites involved in activation and secretion. Mol. Microbiol. 9:1229–1237.
- Totten, P. A., D. V. Norn, and W. E. Stamm. 1995. Characterization of the hemolytic activity of *Haemophilus ducreyi*. Infect. Immun. 63:4409–4416.
- 33. Uphoff, T. S., and R. A. Welch. 1990. Nucleotide sequencing of the Proteus mirabilis calcium-independent hemolysin genes (hpmA and hpmB) reveals sequence similarity with the Serratia marcescens hemolysin genes (shlA and shlB). J. Bacteriol. 172:1206–1216.
- Welch, R. A. 1987. Identification of two different hemolysin determinants in uropathogenic *Proteus* isolates. Infect. Immun. 55:2183–2190.
- 35. Willems, R. J. C., C. Geuijen, H. G. J. van der Heide, G. Renauld, P. Bertin, W. M. R. van den Akker, C. Locht, and F. R. Mooi. 1994. Mutational analysis of the *Bordetella perussis fim/fha* gene cluster: identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA. Mol. Microbiol. 11:337–347.

Discussion générale et perspectives

Notre travail a permis d'analyser les différents signaux de sécrétion de la FHA, et d'évaluer le degré de similitude fonctionnelle du système de sécrétion de la FHA avec ceux d'hémolysines partageant des protéines auxiliaires homologues à FhaC. Nous avons pu déterminer le codon d'initiation de *fhaB*, et le site de clivage N-terminal de la séquence-signal. La séquence-signal ainsi définie se caractérise par la présence d'une extension N-terminale, conservée parmi d'autres protéines sécrétées. Nos résultats indiquent que cette extension n'est pas nécessaire pour la sécrétion de la FHA. De plus, nous avons identifié la nature de la modification N-terminale de la FHA mature: la glutamine N-terminale est cyclisée en pyroglutamate. Cette modification n'est pas nécessaire à la sécrétion de la FHA chez *B. pertussis*, ni à l'activité d'hémagglutination. Cette cyclisation n'est pas observée lorsque la Fha44 est produite chez *E. coli*.

D'autre part, nos expériences de mutagenèse montrent que les cystéines présentes dans la séquence-signal ne jouent pas de rôle critique dans la sécrétion. Cependant, leur mutation a pour effet l'absence de modification d'au moins une fraction de la FHA.

Enfin, nos résultats indiquent que les systèmes de sécrétion de la FHA et des hémolysines HpmA et ShlA présentent des divergences de mécanisme. En effet, alors que les deux asparagines conservées dans la boîte de sécrétion sont essentielles pour la sécrétion de ShlA, une seule d'entre elles paraît cruciale pour la sécrétion de la FHA. De plus, des expériences de complémentation indiquent que les système de sécrétion de la FHA et de l'hémolysine HpmA ne sont pas interchangeables.

L'ensemble de ce travail suggère que la FHA utilise selon toute apparence la première partie de la voie générale de sécrétion pour traverser la membrane cytoplasmique mais par l'intermédiaire d'une séquence-signal N-terminale particulière. Des résultats récents obtenus dans notre laboratoire ont mis en évidence un autre aspect original de la sécrétion. Dans la plupart des systèmes de type II, à l'exception des systèmes d'autosécrétion, les protéines se replient dans le périplasme et traversent la membrane externe dans une conformation proche de leur conformation native. La FHA transite elle aussi par le périplasme, mais n'y acquiert vraisemblablement pas sa structure définitive. En effet, une fusion entre la Fha44 et la sous-unité B de la toxine du choléra (CtxB) n'est pas sécrétée par FhaC, à cause de la formation dans la portion CtxB d'un pont disulfure dans le périplasme (Guédin *et al.*, 1998). La sécrétion peut être restaurée en mutant les cystéines de la partie CtxB. L'absence de sécrétion de la chimère Fha44-CtxB suggère que FhaC favoriserait la sécrétion de la FHA dans une conformation étendue.

Des approches sont proposées ci-dessous pour prolonger la caractérisation de la séquence-signal et de la modification N-terminale de la FHA, ainsi que l'étude des





Figure 20. Position des "downstream boxes" (DB) dans la séquence de *fhaB.* Les nucléotides sont numérotés par rapport à l'ATG initiateur (souligné). Les nucléotides indiqués en gras sont complémentaires de séquences situées dans la région 3' de l'ARN ribosomal 16S de *B. pertussis* appelées "anti-downstream boxes" (anti-DB). Les anti-DB et leur position dans l'ARN 16S sont représentées au-dessus de la séquence de *fhaB*. similitudes entre son système de sécrétion et celui des hémolysines HpmA et ShlA, et de l'initiation de la traduction du gène *fhaB*.

Initiation de la traduction de fhaB

Lors de l'initiation de la traduction chez les procaryotes, la sous-unité ribosomale 30S se fixe sur l'ARN messager au niveau du RBS (pour "ribosome binding site"). Ce RBS comprend un codon d'initiation (généralement un codon ATG) précédé par une séquence de Shine-Dalgarno (SD). L'interaction entre la séquence SD et une séquence complémentaire située dans la région 3' de l'ARN ribosomal 16S, appelée anti-SD, permet le positionnement du codon d'initiation dans le site P du ribosome, et l'interaction de ce codon d'initiation avec l'ARNt initiateur. La distance optimale entre la séquence SD et l'ATG est de 7-9 nucléotides. En plus de la séquence SD, d'autres séquences de l'ARNm peuvent être impliquées dans l'initiation de la traduction (pour revue, voir Sprengart et Porter, 1997). En particulier, un élément appelé "downstream box" (DB) est nécessaire pour une traduction efficace de certains gènes chez E. coli (Sprengart et al., 1990, Sprengart et al., 1996). Située en aval du codon d'initiation, la DB est une séquence de 12 à 15 nucléotides complémentaire à la région 1469-1483 de l'ARNr 16S (région anti-DB). L'expression du gène 0.3 du phage T7 est considérablement réduite suite à une délétion de la DB (Sprengart et al., 1990). De même, la traduction du gène *rpoH* est inhibée par des mutations ponctuelles dans la DB ayant pour effet une réduction de la complémentarité avec l'ARNr 16S (Nagai et al., 1991). Inversement, des mutations qui augmentent la complémentarité entre la DB et l'ARNr 16S ont pour effet une stimulation de l'expression dans le cas du gène glnS (Faxen et al., 1991) et du gène 10 du phage T7 (Sprengart et al., 1996).

La production de la FHA en grande quantité par B. pertussis repose probablement sur des mécanismes de transcription, de traduction et de sécrétion particulièrement efficaces. L'absence de séquence SD typique en amont de l'ATG initiateur de *fhaB* pourrait apparaître comme un handicap pour une bonne traduction de ce gène. L'absence de production du mutant FHA-∆ext1 indiquée par nos expériences de marquage métabolique montre que la région en aval de l'ATG initiateur est cruciale pour la synthèse de la FHA. Ceci nous a incité à proposer que l'initiation de la traduction de *fhaB* pourrait dépendre d'une séquence de type DB. L'analyse de la séquence de *fhaB* montre la présence en aval du codon d'initiation de 2 séquences complémentaires à 2 segments distincts situés dans la région 3' de l'ARNr 16S de *B. pertussis* (figure 20). Nous avons appelé ces séquences DB1 et DB2. L'initiation de la traduction de *fhaB* chez *B. pertussis* pourrait faire appel à la DB1. Pourtant, une délétion de la région contenant la DB1 (mutation Δ ext2) n'a pas d'effet sur la production de la FHA. Cependant, cette délétion rapproche la DB2 de l'ATG initiateur; la DB2 pourrait alors être utilisée pour initier la traduction. Dans la délétion plus longue Δ ext1, les 2 DB sont éliminées, ce qui pourrait expliquer l'absence de production de la FHA. Afin de tester l'hypothèse d'un rôle des séquences

DB1 et DB2 dans la traduction de *fhaB*, nous pourrions introduire dans ces séquences différentes mutations silencieuses. Les mutations susceptibles d'améliorer la complémentarité entre les DB et l'ARN ribosomal 16S devraient augmenter l'expression de *fhaB*, tandis que les mutations ayant pour effet de réduire la complémentarité devraient diminuer l'expression.

Séquence-signal de la FHA

Au cours de ce travail, nous avons montré que FhaB est synthétisé avec une longue séquence-signal de 71 résidus comprenant une extension N-terminale de 22 résidus suivie d'un domaine présentant les caractéristiques d'un peptide-signal classique. Malgré sa grande conservation parmi plusieurs protéines bactériennes, nos analyses n'ont pas fait apparaître un rôle essentiel de l'extension N-terminale pour la production et la sécrétion de la FHA. La fonction de l'extension N-terminale n'a pas encore été étudié chez SepA, AIDA-I, Hia, Hsf, HMW1A et HMW2A. Ces protéines possèdent toutes dans leur extension N-terminale certains résidus absents dans celle de la FHA, en particulier une séquence Leu-Ala/Thr-Arg à la fin de l'extension. De plus, le troisième acide aminé de l'extension est basique pour toutes les protéines, sauf pour la FHA où il est remplacé par une paire de résidus neutres. Ces différences pourraient être à l'origine d'une perte de fonction de l'extension N-terminale dans le cas de la FHA. Pour répondre à cette question, des délétions de l'extension pourraient être opérées sur les autres protéines. Dans un second temps, s'il s'avère que ces délétions affectent leur sécrétion, des expériences de mutagenèse ciblées sur les résidus mentionnés ci-dessus permettraient de savoir s'ils sont critiques pour la fonction de l'extension.

Le site de clivage de la séquence-signal de FhaB se situe après l'alanine 71, et présente les caractéristiques d'un site de clivage par la signal peptidase LepB. Aucune signal-peptidase homologue à LepB n'a été décrite jusqu'à présent chez B. pertussis. Cependant, plusieurs approches ont été envisagées afin de mieux connaître le mécanisme d'exportation de FhaB à travers la membrane cytoplasmique et le mode de clivage de sa séquence-signal. Dans un premier temps, nous avons introduit des mutations aux positions (-1) et (-3) du site de clivage. On sait en effet que des résidus défavorables à ces positions sont capables d'inhiber le clivage par LepB (Fikes et al., 1990). Nous n'avons pas obtenu de clones lorsque nous avons tenté de transformer les plasmides contenant ces mutations chez *B. pertussis*. Ceci suggère une toxicité des constructions, peut-être liée à une accumulation de la FHA dans les bactéries. D'autre part, le clivage de la séquence-signal pourrait être étudié à l'aide d'une souche de E. *coli* synthétisant une signal-peptidase LepB déficiente. Il serait également intéressant d'examiner l'exportation de la Fha44 dans des souches de E. coli possédant des mutations dans certains composants du système Sec. Nous avons réalisé des essais préliminaires d'expression de la Fha44 dans des souches portant des mutations thermosensibles dans les gènes lep, secA et secY. Nous avons procédé à un marquage métabolique suivi d'une chasse, puis d'une immunoprécipitation de la Fha44. Cependant, les quantités de Fha44 immunoprécipitée étaient insuffisantes pour détecter des altérations dans le clivage et l'exportation chez les mutants. Ces problèmes sont peut-être liés au niveau d'expression de la Fha44 dans les souches choisies; d'autres souches pourraient donc être testées.

Modification N-terminale de la FHA mature

Après le clivage de la séquence-signal de FhaB, la glutamine N-terminale de la FHA mature est cyclisée en pyroglutamate chez *B. pertussis*. Cette observation soulève plusieurs questions. Est-elle de nature spontanée ou est-elle catalysée ? Quelle pourrait être sa fonction ?

Les 3 cystéines présentes dans la séquence-signal de FhaB semblent capables d'influencer la modification N-terminale de la FHA. Lorsque l'une de ces cystéines est mutée, une fraction au moins de la FHA produite chez *B. pertussis* présente un résidu glutamine non cyclisé à son extrémité N-terminale. Ceci écarte l'idée que la modification de la FHA pourrait être due à la composition du milieu de croissance de B. pertussis ou aux conditions de culture. D'autre part, nous avons montré l'absence de modification de la FHA produite chez E. coli. Ces deux éléments nous ont conduit à proposer que la modification de la FHA pourrait être catalysée par une glutaminyl cyclase spécifique de *B. pertussis*. Un tel enzyme a été identifié et caractérisé chez les mammifères, où il serait responsable de la modification post-traductionnelle de différentes hormones peptidiques telles que la GnRH (pour "gonadotropin-releasing hormone") et la TRH (pour "thyrotropin-releasing hormone) (Song et al., 1994; Pohl et al., 1991). Il faut noter qu'un gène codant une protéine homologue est également présent chez la levure (Murakami et al., 1995). Par contre, aucune protéine homologue n'a encore été détectée chez les procaryotes. Les protéines pyroglutamylées sont relativement rares chez les bactéries. Elles sont en majorité extracytoplasmiques. Parmi ces protéines, le cytochrome c550 de Thiobacillus versutus est particulièrement intéressant. En effet, de même que la FHA, cette protéine n'est pas pyroglutamylée lorsqu'elle est produite chez E. coli (Ubbink et al., 1992). Cependant, le mécanisme de formation des pyroglutamates chez les bactéries n'est pas connu. On peut supposer que la cyclisation a lieu après le clivage du peptide signal, puisqu'elle nécessite la libération du groupement α -NH2 de la glutamine. Une approche possible pour identifier une activité glutaminyl cyclase chez B. pertussis serait d'incuber la FHA produite chez E. coli avec des surnageants ou des extraits périplasmiques ou cellulaires de *B. pertussis*, puis d'examiner l'état de blocage de la protéine. La souche BPGR4 de B. pertussis pourrait être utilisée pour cette expérience, car elle ne produit pas de FHA, ce qui éviterait les problèmes de contamination par la protéine sauvage. Si la FHA devient réfractaire au séquençage N-terminal, on pourrait examiner si cet effet de blocage est sensible à des protéases ou à l'action de la chaleur, en vue d'établir la nature protéique du facteur de modification. Ensuite, la

purification de l'enzyme et le clonage du gène correspondant pourraient confirmer l'existence d'une glutaminyl cyclase chez *B. pertussis*. Le séquençage systématique du génôme de cette bactérie, récemment commencé, pourrait mener au même résultat.

La mise en évidence d'une cyclisation catalysée de la glutamine N-terminale de la FHA suggèrerait que cette modification a une signification physiologique. Dans le cas de la TRH, le pyroglutamate N-terminal est essentiel pour l'activité biologique (Vale and Rivier, 1975) et serait impliqué dans l'interaction avec le récepteur hormonal (Perlman et al., 1993). D'autre part, ce type de modification pourrait jouer un rôle dans la protection des protéines vis à vis de la dégradation par les aminopeptidases, comme cela a été proposé dans le cas de différentes α-amylases (Brayer et al., 1995; Strobl et al., 1997). La présence d'un pyroglutamate N-terminal semble également constituer un facteur de stabilité pour certains peptides, appelés peptides β-amyloïdes, qui se déposent sous forme de plaques de sénescence dans le cerveau des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer (Russo et al., 1997). Nos résultats indiquent que la cyclisation de la glutamine n'influence pas la stabilité de la FHA en culture. En effet, nous n'avons pas observé un accroissement de la dégradation de la FHA dans la souche exprimant le mutant Q72L. Cependant, on peut imaginer que la cyclisation joue un rôle de protection vis-à-vis des protéases in vivo, c'est à dire chez l'hôte infecté. Alternativement, on ne peut exclure que la modification soit nécessaire pour des activités d'adhérence, même si nos observations indiquent qu'elle n'est pas critique pour l'hémagglutination. Dans l'une ou l'autre de ces situations, on s'attendrait à une diminution de la capacité de colonisation d'un mutant produisant une FHA non modifiée. Il serait donc intéressant d'analyser le comportement de notre mutant Q72L dans les modèles animaux souris et lapin. En effet, la FHA est impliquée dans la persistence de *B. pertussis* dans la trachée et le nasopharynx de la souris (Kimura et al., 1990), et dans l'accumulation des bactéries au sein des macrophages pulmonaires chez le lapin (Saukkonen et al., 1991).

Enfin, l'effet de la mutation des cystéines de la FHA sur la modification Nterminale est difficile à interpréter. Ces 3 cystéines sont présentes dans la région Nterminale de FhaB, clivée lors de la sécrétion. Ceci indique que certaines altérations de la séquence-signal peuvent affecter le taux de modification. Cette hypothèse serait renforcée par l'observation d'un effet sur la modification N-terminale suite à d'autres mutations dans cette région. Les mutants dont nous disposons déjà (mutants M2L, M3L, et FHA-Δext1) pourraient être utilisés à cette fin.

Similitudes et différences entre le système de sécrétion de la FHA et le système de sécrétion de *HpmA*

Bien que la FHA et l'hémolysine HpmA soient sécrétées grâce à des protéines auxiliaires similaires (FhaC et HpmB, respectivement), leurs machineries de sécrétion ne sont pas interchangeables. Ces résultats peuvent s'expliquer par la distance évolutive qui existe entre FhaC et HpmB. Le degré d'identité entre ces 2 protéines n'est que de 16 %, alors que l'identité atteint 55.4 % entre HpmB et ShlB, la protéine auxiliaire impliquée dans la sécrétion de l'hémolysine ShlA (Uphoff et Welch, 1990). De plus, la seule région d'homologie partagée par la FHA et HpmA est la boîte de sécrétion amino-proximale, longue de 115 résidus (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990). En contraste, HpmA et ShlA contiennent 46.7 % de résidus identiques (Uphoff et Welch, 1990). L'activation de HpmA par ShlB *in vitro* (Ondraczec *et al.*, 1992) et nos propress résultats *in vivo* indiquent que ShlB est capable de remplacer HpmB pour la sécrétion et l'activation de HpmA. Il semble donc que FhaC d'une part, et HpmB et ShlB d'autre part, appartiennent à 2 sous-familles distinctes de protéines auxiliaires.

Une caractéristique de la sous-famille des hémolysines est le couplage entre l'activation et la sécrétion. Si la nature de l'activation n'a pas été étudiée dans le cas de HpmA, elle est maintenant caractérisée pour ShlA. Il avait été précédemment montré chez E. coli qu'en absence de ShlB, ShlA s'accumule dans le périplasme sous une forme inactive, appelée ShlA* (Schiebel et al., 1989). Des travaux récents ont permis de découvrir que ShlA* peut être activée in vitro en présence de ShlB et de phosphatidyléthanolamine (PE), le phospholipide majoritaire dans la membrane externe chez E. coli (Hertle et al., 1997). Un traitement de ShlA par la phospholipase A2 abolit l'activation de l'hémolysine. L'utilisation de PE marqué radioactivement indique que l'activation de l'hémolysine correspond à la fixation de 2 à 6 molécules de PE par molécule de ShlA. Cette fixation est non covalente et se fait dans la partie N-terminale de ShlA. L'importance du PE a également été montrée *in vivo*. En effet, une souche mutante de *E. coli* qui synthétise très peu de PE ne sécrète pas ShlA, et l'activité hémolytique associée aux cellules bactériennes est extrêmement faible. La fixation de PE sur ShlA est donc nécessaire à la fois pour l'activation et pour la sécrétion. Un résultat particulièrement intéressant est que le PE est capable de se lier à ShIA* en absence de ShIB, mais que cette liaison ne suffit pas pour l'activation. Sur la base de toutes ces observations, Hertle et al. (1997) ont proposé que le rôle de ShIB au cours de la sécrétion serait de conférer à ShIA* sa conformation active, où le PE serait correctement exposé pour permettre l'interaction de l'hémolysine avec la membrane des érythrocytes.

Une activation de la FHA par FhaC par un mécanisme similaire à celui décrit ci-dessus n'a pas été mise en évidence jusqu'à présent. Cependant, des résultats récemment obtenus dans notre laboratoire suggèrent que la FHA n'acquiert sa structure tertiaire qu'au sortir de la membrane externe, suggérant un changement conformationnel important suite à l'interaction avec FhaC. D'autre part, il n'a pas encore été déterminé si la FHA fixe le PE. Pour éclaircir ce point, la liaison du PE à la région N-terminale de la FHA pourrait être testée *in vitro* à l'aide de la Fha44 et de PE marqué radioactivement. Un résultat négatif confirmerait les différences de mécanismes entre les systèmes de sécrétion de HpmA et de la FHA et pourrait expliquer l'absence de complémentation entre ces 2 systèmes.

Un dérivé N-terminal de ShlA, appelé ShlA255, est capable de convertir ShlA* en ShlA active, par complémentation (Schönherr *et al.*, 1993). Si une fixation de PE par la Fha44 était mise en évidence, nous pourrions tester si la Fha44, à l'instar de ShlA255, est capable de convertir ShlA* en ShlA active. Le cas échéant, pour justifier l'absence de complémentation entre les 2 systèmes de sécrétion, il faudrait invoquer d'autres facteurs non identifiés conférant une spécificité étroite entre les différents partenaires.

La mutation de certains résidus conservés de la boîte de sécrétion de ShIA, en particulier les asparagines 69 et 109, a pour effet l'absence d'activation par ShIB in vitro et une perte de la sécrétion in vivo (Schönherr et al., 1993). Cependant, ces mutants semblent toujours capables d'interagir avec ShlB, comme le montrent des expériences de compétition avec ShIA*. Sur la base de ces résultats, une hypothèse est que les asparagines 69 et 109 pourraient être impliquées directement ou indirectement dans la fixation du PE. Il serait donc intéressant de savoir si les mutants N69 et N109 sont encore capables de fixer du PE radioactif, et de déterminer le nombre de molécules de PE par molécule de ShlA mutée. Ce nombre pourrait être significativement diminué, ce qui expliquerait l'absence d'activation et de sécrétion chez ces mutants. Une autre possibilité est que les mutants 69 et 109 fixent le PE mais que leur interaction avec ShlB soit improductive. La FHA possède les 2 asparagines conservées aux positions 137 et 176. Nos expériences de mutagenèse dirigée ont montré que ces 2 acides aminés sont importants pour la sécrétion de la FHA, mais que seul l'acide aminé N137 est crucial. Les résidus N137 et N176 de la FHA pourraient donc être impliqués (directement ou indirectement) dans l'interaction avec FhaC. Des données intéressantes sur le système de sécrétion de l'adhésine HMW1A de H. influenzae ont récemment été publiées (St Geme et Grass, 1998). Cette protéine possède uniquement la deuxième asparagine conservée, située au début du motif conservé NPNGI. Une mutation de cette asparagine n'a aucun effet sur la sécrétion de HMW1A. Par contre, un effet sur la sécrétion dans le surnageant de culture est obtenu grâce à une mutation plus drastique (le motif conservé est changé en IAIGI). La nature de l'interaction HMW1A-HMW1B semble donc sensiblement différente de l'interaction FHA-FhaC. L'ensemble de ces résultats suggère que le système de sécrétion originel, utilisé par les hémolysines, pourrait avoir divergé chez B. pertussis en perdant certaines caractéristiques (par exemple, perte du rôle crucial de la deuxième asparagine). La divergence serait encore plus marquée dans le cas des adhésines HMW1A et HMW2A, puisque la deuxième asparagine paraît totalement accessoire.

La topologie de FhaC dans la membrane externe est actuellement à l'étude dans notre laboratoire. Il sera particulièrement intéressant de comparer cette topologie avec celle de ShlB, qui a également été entreprise (V. Braun, communication personnelle). Cette comparaison pourrait mener à la détermination de domaines impliqués dans l'activation et/ou la sécrétion. Des différences possibles dans la structure de FhaC et ShlB pourraient être à l'origine de la spécificité étroite de ces protéines auxiliaires pour leurs substrats. Références bibliographiques

Akerley, B.J., and Miller, J.F. (1993) Flagellin gene transcription in *Bordetella bronchiseptica* is regulated by the BvgAS virulence control system. *J Bacteriol* **175:** 3468-79.

Akerley, B.J., and Miller, J.F. (1996) Understanding signal transduction during bacterial infection. *Trends Microbiol* **4:** 141-6.

Akerley, B.J., Monack, D.M., Falkow, S., and Miller, J.F. (1992) The *bvgAS* locus negatively controls motility and synthesis of flagella in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol* **174:** 980-90.

Allaoui, A., Woestyn, S., Sluiters, C., and Cornelis, G.R. (1994) YscU, a Yersinia enterocolitica inner membrane protein involved in Yop secretion. J Bacteriol **176**: 4534-42.

Alvarez Dominguez, C., Vazquez Boland, J.A., Carrasco Marin, E., Lopez Mato, P., and Leyva Cobian, F. (1997) Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. *Infect Immun* **65**: 78-88.

Amsbaugh, D.F., Li, Z.M., and Shahin, R.D. (1993) Long-lived respiratory immune response to filamentous haemagglutinin following *Bordetella pertussis* infection. *Infect Immun* **61:** 1447-52.

Arico, B., Miller, J.F., Roy, C., Stibitz, S., Monack, D., Falkow, S., Gross, R., and Rappuoli, R. (1989) Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 6671-5.

Arico, B., Nuti, S., Scarlato, V., and Rappuoli, R. (1993) Adhesion of *Bordetella pertussis* to eukaryotic cells requires a time-dependent export and maturation of filamentous haemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90:** 9204-8.

Arico, B., Scarlato, V., Monack, D.M., Falkow, S., and Rappuoli, R. (1991) Structural and genetic analysis of the *bvg* locus in *Bordetella* species. *Mol Microbiol* **5**: 2481-91.

Baker, S.M., Masi, A., Liu, D.F., Novitsky, B.K., and Deich, R.A. (1995) Pertussis toxin export genes are regulated by the *ptx* promoter and may be required for efficient translation of *ptx* mRNA in *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 63: 3920-6.

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 haemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 60: 1302-13.

Barenkamp, S.J., and St. Geme, J.W. III (1996) Identification of a second family of high-molecular-weight adhesion proteins expressed by non-typable *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* **19:** 1215-23.

Barkocy-Gallagher, G.A., and Bassford, P.J. Jr., (1992) Synthesis of precursor maltose-binding protein with proline in the +1 position of the cleavage site interferes with the activity of *Escherichia coli* signal peptidase I *in vivo*. J Biol Chem 267: 1231-8.

Barry, E.M., Weiss, A.A., Ehrmann, I.E., Gray, M.C., Hewlett, E.L., and Goodwin, M.S. (1991) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation. *J Bacteriol* **173**: 720-6.

Beattie, D.T., Mahan, M.J., and Mekalanos, J.J. (1993) Repressor binding to a regulatory site in the DNA coding sequence is sufficient to confer transcriptional regulation of the *vir*-repressed genes (*vrg* genes) in *Bordetella pertussis*. J *Bacteriol* **175**: 519-27.

Beattie, D.T., Shahin, R., and Mekalanos, J.J. (1992) A vir-repressed gene of Bordetella pertussis is required for virulence. Infect Immun 60: 571-7.

Benjelloun Touimi, Z., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (1995) SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Mol Microbiol* **17**: 123-35.

Benz, I., and Schmidt, M.A. (1992) AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol Microbiol* **6**: 1539-46.

Berggard, K., Johnsson, E., Mooi, F.R., and Lindahl, G. (1997) *Bordetella pertussis* binds the human complement regulator C4BP: role of filamentous haemagglutinin. *Infect Immun* 65: 3638-43.

Bieker-Brady, K., and Silhavy, T.J. (1992) Suppressor analysis suggests a multistep, cyclic mechanism for protein secretion in *Escherichia coli*. *EMBO J* **11**: 3165-74.

Binet, R., and Wandersman, C. (1996) Cloning of the *Serratia marcescens hasF* gene encoding the Has ABC exporter outer membrane component: a TolC analogue. *Mol Microbiol* **22**: 265-73.

Blight, M.A., Chervaux, C., and Holland, I.B. (1994) Protein secretion pathway in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **5**: 468-74.

Bordet, J. and Gengou, O. (1906) Le microbe de la coqueluche. Ann. Inst. Pasteur (Paris) 20: 731-41.

Bordet, J. and Gengou, O. (1909) L'endotoxine coquelucheuse. Ann. Inst. Pasteur (Paris) 23: 415-19.

Boucher, P.E., Menozzi, F.D., and Locht, C. (1994) The modular architecture of bacterial response regulators. Insights into the activation mechanism of the BvgA transactivator of *Bordetella pertussis*. *J Mol Biol* **241**: 363-77.

Boucher, P.E., Murakami, K., Ishihama, A., and Stibitz, S. (1997) Nature of DNA binding and RNA polymerase interaction of the *Bordetella pertussis* BvgA transcriptional activator at the *fha* promoter. *J Bacteriol* **179**: 1755-63.

Brayer, G.D., Luo, Y., and Withers, S.G. (1995) The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 A resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci* **4**: 1730-42.

Brennan, M.J., Hannah, J.H., and Leininger, E. (1991) Adhesion of *Bordetella pertussis* to sulfatides and to the GalNAcβ4Gal sequence found in glycosphingolipids. *J Biol Chem* **266**: 18827-31.

Breukink, E., Kusters, R., and De Kruijff, B. (1992) In-vitro studies on the folding characteristics of the *Escherichia coli* precursor protein prePhoE. Evidence that

SecB prevents the precursor from aggregating by forming a functional complex. *Eur J Biochem* **208:** 419-25.

Cahill, E.S., O'Hagan, D.T., Illum, L., and Redhead, K. (1993) Mice are protected against *Bordetella pertussis* infection by intra-nasal immunization with filamentous haemagglutinin. *FEMS Microbiol Lett* **107**: 211-6.

Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R., and Covacci, A. (1996) cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14648-53.

Charles, I., Fairweather, N., Pickard, D., Beesley, J., Anderson, R., Dougan, G., and Roberts, M. (1994) Expression of the *Bordetella pertussis* P.69 pertactin adhesin in *Escherichia coli*: fate of the carboxy-terminal domain. *Microbiology* **140**: 3301-8.

Charles, I.G., Dougan, G., Pickard, D., Chatfield, S., Smith, M., Novotny, P., Morrissey, P., and Fairweather, N.F. (1989) Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 3554-8.

Cherry, J.D. (1996) Historical review of pertussis and the classical vaccine. *J Infect Dis* **174:** S259-63.

Chou, M.M., and Kendall, D.A. (1990) Polymeric sequences reveal a functional interrelationship between hydrophobicity and length of signal peptides. *J Biol Chem* **265**: 2873-80.

Christie, P.J. (1997) Agrobacterium tumefaciens T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. J Bacteriol **179**: 3085-94.

Confer, S.L., and Eaton, J.W. (1982) Phagocytic impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science* **217**: 948-50.

Cookson, B.T., Cho, H.L., Herwaldt, L.A., and Goldman, W.E. (1989a) Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 57: 2223-9.

Cookson, B.T., Tyler, A.N., and Goldman, W.E. (1989b) Primary structure of the peptidoglycan-derived tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Biochemistry* **28**: 1744-9.

Coote, J.G. (1992) Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **8**: 137-61.

Cope, L.D., Thomas, S.E., Latimer, J.L., Slaughter, C.A., Muller Eberhard, U., and Hansen, E.J. (1994) The 100 kDa haem:haemopexin-binding protein of *Haemophilus influenzae*: structure and localization. *Mol Microbiol* **13**: 863-73.

Corbel, M.J., and Xing, D.K. (1997) A consideration of control requirements for acellular pertussis vaccines. *Dev Biol Stand* 89: 343-7.

Cornelis, G., Sluiters, C., de Rouvroit, C.L., and Michiels, T. (1989) Homology between virF, the transcriptional activator of the *Yersinia* virulence regulon, and AraC, the *Escherichia coli* arabinose operon regulator. *J Bacteriol* **171**: 254-62.

Cornelis, G.R., and Wolf Watz, H. (1997) The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **23**: 861-7.

Cotter, P.A., and Miller, J.F. (1994) BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. *Infect Immun* **62:** 3381-90.

Cowell, J.L., Hewlett, E.L., and Manclark, C.R. (1979) Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **25**: 896-901.

D'Souza, S.E., Ginsberg, M.H., and Plow, E.F. (1991) Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends Biochem Sci* **16**: 246-50.

de Melker, H.E., Conyn van Spaendonck, M.A., Rumke, H.C., van Wijngaarden, J.K., Mooi, F.R., and Schellekens, J.F. (1997) Pertussis in the Netherlands: an outbreak despite high levels of immunization with whole-cell vaccine. *Emerg Infect Dis* **3**: 175-8.

de Vrije, G.J., Batenburg, A.M., Killian, J.A., and de Kruijff, B. (1990) Lipid involvement in protein translocation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **4**: 143-50.

Delisse-Gathoye, A.M., Locht, C., Jacob, F., Raaschou-Nielsen, M., Heron, I., Ruelle, J.L., de Wilde, M., and Cabezon, T. (1990) Cloning, partial sequence, expression, and antigenic analysis of the filamentous haemagglutinin gene of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **58**: 2895-905.

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**: 3825-31.

Domenighini, M., Relman, D., Capiau, C., Falkow, S., Prugnola, A., Scarlato, V., and Rappuoli, R. (1990) Genetic characterization of *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. *Mol Microbiol* **4**: 787-800.

Duong, F., and Wickner, W. (1997a) Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. *EMBO J* **16**: 2756-68.

Duong, F., and Wickner, W. (1997b) The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO J* **16**: 4871-9.

Economou, A., and Wickner, W. (1994) SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* **78**: 835-43.

Economou, A., Pogliano, J.A., Beckwith, J., Oliver, D.B., and Wickner, W. (1995) SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF. *Cell* 83: 1171-81.

Eder, J., and Fersht, A.R. (1995) Pro-sequence-assisted protein folding. *Mol Microbiol* **16:** 609-14.

Everest, P., Li, J., Douce, G., Charles, I., De Azavedo, J., Chatfield, S., Dougan, G., and Roberts, M. (1996) Role of the *Bordetella pertussis* P.69/pertactin protein and the P.69/pertactin RGD motif in the adherence to and invasion of mammalian cells. *Microbiology* **142**: 3261-8.

Ewald, P.W. (1996) The need for new vaccines. In *concepts in vaccine development*. Kaufman, S.H.E. (ed). Berlin: de Gruyer. pp. 1-8.

Ewanowich, C.A., Melton, A.R., Weiss, A.A., Sherburne, R.K., and Peppler, M.S. (1989) Invasion of HeLa 229 cells by virulent *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **57**: 2698-704.

Farizo, K.M., Cafarella, T.G., and Burns, D.L. (1996) Evidence for a ninth gene, *ptlI*, in the locus encoding the pertussis toxin secretion system of *Bordetella pertussis* and formation of a PtII-PtIF complex. *J Biol Chem* **271**: 31643-9.

Fath, M.J., and Kolter, R. (1993) ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev* 57: 995-1017.

Faxen, M., Plumbridge, J., and Isaksson, L.A. (1991) Codon choice and potential complementarity between mRNA downstream of the initiation codon and bases 1471-1480 in 16S ribosomal RNA affects expression of *glnS*. *Nucleic Acids Res* **19**: 5247-51.

Felmlee, T., Pellett, S., and Welch, R.A. (1985b) Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. *J Bacteriol* **163**: 94-105.

Felmlee, T., Pellett, S., Lee, E.Y., and Welch, R.A. (1985a) *Escherichia coli* hemolysin is released extracellularly without cleavage of a signal peptide. *J Bacteriol* **163**: 88-93.

Fernandez, R.C., and Weiss, A.A. (1994) Cloning and sequencing of a *Bordetella* pertussis serum resistance locus. *Infect Immun* 62: 4727-38.

Fields, K.A., Plano, G.V., Straley, S.C. (1994) A low Ca^{2+} response (LCR) secretion (ysc) locus lies within the *lcrB* region of the LCR plasmid in Yersinia pestis. J. Bacteriol. **176**: 569-79.

Fikes, J.D., and Bassford, P.J. Jr. (1989) Novel *secA* alleles improve export of maltose-binding protein synthesized with a defective signal peptide. *J Bacteriol* **171**: 402-9.

Fikes, J.D., Barkocy Gallagher, G.A., Klapper, D.G., and Bassford, P.J. Jr. (1990) Maturation of *Escherichia coli* maltose-binding protein by signal peptidase I *in vivo*. Sequence requirements for efficient processing and demonstration of an alternate cleavage site. *J Biol Chem* **265**: 3417-23.

Fine, P.E. (1997) Adult pertussis: a salesman's dream--and an epidemiologist's nightmare. *Biologicals* 25: 195-8.

Finlay, B.B., and Falkow, S. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Rev* **61**: 136-69.

Finn, T.M., and Stevens, L.A. (1995) Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol Microbiol* **16**: 625-34.

Geuijen, C.A., Willems, R.J., and Mooi, F.R. (1996) The major fimbrial subunit of *Bordetella pertussis* binds to sulfated sugars. *Infect Immun* **64:** 2657-65.

Gilson, L., Mahanty, H.K., and Kolter, R. (1990) Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V. *EMBO J* **9**: 3875-94.

Glaser, P., Ladant, D., Sezer, O., Pichot, F., Ullmann, A., and Danchin, A. (1988) The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: cloning and expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **2**: 19-30.

Goodnow, R.A. (1980) Biology of Bordetella bronchiseptica. Microbiol Rev 44: 722-38.

Greco, D., Salmaso, S., Mastrantonio, P., Giuliano, M., Tozzi, A.E., Anemona, A., Ciofi degli Atti, M.L., Giammanco, A., Panei, P., Blackwelder, W.C., Klein, D.L., and Wassilak, S.G. (1996) A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. Progetto Pertosse Working Group. *N Engl J Med* **334:** 341-8.

Gregory, R.J., Cheng, S.H., Rich, D.P., Marshall, J., Paul, S., Hehir, K., Ostedgaard, L., Klinger, K.W., Welsh, M.J., and Smith, A.E. (1990) Expression and characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* **347**: 382-6.

Greiff, L., Erjefalt, I., Svensson, C., Wollmer, P., Alkner, U., Andersson, M., and Persson, C.G. (1993) Plasma exudation and solute absorption across the airway mucosa. *Clin Physiol* **13**: 219-33.

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*. Sous presse.

Gustafsson, L., Hallander, H.O., Olin, P., Reizenstein, E., and Storsaeter, J. (1996) A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N Engl J Med* **334:** 349-55.

Guzman, C.A., Brownlie, R.M., Kadurugamuwa, J., Walker, M.J., and Timmis, K.N. (1991) Antibody responses in the lungs of mice following oral immunization with *Salmonella typhimurium aroA* and invasive *Escherichia coli* strains expressing the filamentous haemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **59**: 4391-7.

Guzman, C.A., Molinari, G., Fountain, M.W., Rohde, M., Timmis, K.N., and Walker, M.J. (1993) Antibody responses in the serum and respiratory tract of mice following oral vaccination with liposomes coated with filamentous haemagglutinin and pertussis toxoid. *Infect Immun* **61**: 573-9.

Guzzo, J., Duong, F., Wandersman, C., Murgier, M., and Lazdunski, A. (1991) The secretion genes of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease are functionally related to those of *Erwinia chrysanthemi* proteases and *Escherichia coli* α -haemolysin. *Mol Microbiol* **5**: 447-53.

Guzzo, J., Pages, J.M., Duong, F., Lazdunski, A., and Murgier, M. (1991) *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J Bacteriol* **173**: 5290-7.

Hackett, M., Guo, L., Shabanovitz, J., Hunt, D.F., and Hewlett, E.L. (1994) Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science* **266**: 433-35.

Hanada, M., Nishiyama, K.I., Mizushima, S., and Tokuda, H. (1994) Reconstitution of an efficient protein translocation machinery comprising SecA and the three membrane proteins, SecY, SecE, and SecG (p12). *J Biol Chem* **269**: 23625-31.

Hannah, J.H., Menozzi, F.D., Renauld, G., Locht, C., and Brennan, M.J. (1994) Sulfated glycoconjugate receptors for the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. *Infect Immun* 62: 5010-9.

Hansen, W. (1994) Bordetella. In *Manuel de biologie clinique*. Freney, J., Renaud, F., Hansen, W., and Bollet, C. (Eds). Amsterdam: Elsevier. pp. 1421-39.

Hardie, K.R., Lory, S., and Pugsley, A.P. (1996a) Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein. *EMBO J* **15**: 978-88.

Hardie, K.R., Seydel, A., Guilvout, I., and Pugsley, A.P. (1996b) The secretinspecific, chaperone-like protein of the general secretory pathway: separation of proteolytic protection and piloting functions. *Mol Microbiol* **22**: 967-76.

Hartl, F.U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J.P., and Wickner, W. (1990) The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell* **63**: 269-79.

Hazenbos, W.L., Geuijen, C.A., van den Berg, B.M., Mooi, F.R., and van Furth, R. (1995a) *Bordetella pertussis* fimbriae bind to human monocytes via the minor fimbrial subunit FimD. J Infect Dis 171: 924-9.

Hazenbos, W.L., van den Berg, B.M., Geuijen, C.W., Mooi, F.R., and van Furth, R. (1995b) Binding of FimD on *Bordetella pertussis* to very late antigen-5 on monocytes activates complement receptor type 3 via protein tyrosine kinases. *J Immunol* **155**: 3972-8.

Heiss, L.N., Lancaster, J.R. Jr., Corbett, J.A., and Goldman, W.E. (1994) Epithelial autotoxicity of nitric oxide: role in the respiratory cytopathology of pertussis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91:** 267-70.

Heiss, L.N., Moser, S.A., Unanue, E.R., and Goldman, W.E. (1993) Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis. *Infect Immun* **61**: 3123-8.

Hendrick, J.P., and Wickner, W. (1991) SecA protein needs both acidic phospholipids and SecY/E protein for functional high-affinity binding to the *Escherichia coli* plasma membrane. *J Biol Chem* **266**: 24596-600.

Hertle, R., Brutsche, S., Groeger, W., Hobbie, S., Koch, W., Könninger, U., and Braun, V. (1997) Specific phosphatidylethanolamine dependence of *Serratia marcescens* cytotoxin activity. *Mol Microbiol* **26**: 853-65.

Hess, J., Gentschev, I., Goebel, W., and Jarchau, T. (1990) Analysis of the haemolysin secretion system by PhoA-HlyA fusion proteins. *Mol Gen Genet* **224**: 201-8.

Hewlett, E.L., Gray, M.C., Ehrmann, I.E., Maloney, N.J., Otero, A.S., Gray, L., Allietta, M., Szabo, G., Weiss, A.A., and Barry, E.M. (1993) Characterization of adenylate cyclase toxin from a mutant of *Bordetella pertussis* defective in the activator gene, *cyaC. J Biol Chem* **268**: 7842-8.

Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. Annu Rev Cell Biol 8: 67-113.

Higgins, C.F. (1993) The multidrug resistance P-glycoprotein. *Curr Opin Cell Biol* 5: 684-7.

Higgins, C.F., Haag, P.D., Nikaido, K., Ardeshir, F., Garcia, G., and Ames, G.F. (1982) Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of *S. typhimurium*. *Nature* **298**: 723-7.

Hiles, I.D., Gallagher, M.P., Jamieson, D.J., and Higgins, C.F. (1987) Molecular characterization of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **195**: 125-42.

Hirono, I., Tange, N., and Aoki, T. (1997) Iron-regulated haemolysin gene from *Edwardsiella tarda*. *Mol Microbiol* **24:** 851-6.

Horiguchi, Y., Senda, T., Sugimoto, N., Katahira, J., and Matsuda, M. (1995) *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin stimulates assembly of actin stress fibers and focal adhesions by modifying the small GTP-binding protein rho. *J Cell Sci* **108**: 3243-51.

Hultgren, S.J., Jacob Dubuisson, F., Jones, C.H., and Branden, C.I. (1993) PapD and superfamily of periplasmic immunoglobulin-like pilus chaperones. *Adv Protein Chem* **44**: 99-123.

Hwang, J., Zhong, X., and Tai, P.C. (1997) Interactions of dedicated export membrane proteins of the colicin V secretion system: CvaA, a member of the membrane fusion protein family, interacts with CvaB and TolC. *J Bacteriol* **179**: 6264-70.

Isaacs, R.D. (1994) Borrelia burgdorferi bind to epithelial cell proteoglycans. J Clin Invest 93: 809-19.

Ishibashi, Y., Claus, S., and Relman, D.A. (1994) *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). J Exp Med 180: 1225-33.

Izard, J.W., and Kendall, D.A. (1994) Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Mol Microbiol* **13**: 765-73.

Jarchau, T., Chakraborty, T., Garcia, F., and Goebel, W. (1994) Selection for transport competence of C-terminal polypeptides derived from *Escherichia coli* hemolysin: the shortest peptide capable of autonomous HlyB/HlyD-dependent secretion comprises the C-terminal 62 amino acids of HlyA. *Mol Gen Genet* **245**: 53-60.

Johnson, F.D., and Burns, D.L. (1994) Detection and subcellular localization of three Ptl proteins involved in the secretion of pertussis toxin from *Bordetella pertussis*. J Bacteriol **176**: 5350-6.

Kadner, R.J. (1996) Cytoplasmic membrane. In Escherichia coli and Salmonella. *Cellular and molecular biology*. Neidhardt, F.C. (ed). Washington: ASM Press. pp. 58-87.

Kenny, B., Taylor, S., and Holland, I.B. (1992) Identification of individual amino acids required for secretion within the haemolysin (HlyA) C-terminal targeting region. *Mol Microbiol* **6:** 1477-89.

Kersters, K., Hinz, K.H., Hertle, A., Segers, P., Lievens, A., Siegman, O., and De Ley, J. (1984) *Bordetella avium* sp. nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds. *Int J Syst Bacteriol* **34**: 56-70.

Kimura, A., Mountzouros, K.T., Relman, D.A., Falkow, S., and Cowell, J.L. (1990) *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. *Infect Immun* **58**: 7-16.

Kimura, M., and Kuno Sakai, H. (1990) Developments in pertussis immunisation in Japan. *Lancet* **336**: 30-2.

Kjellen, L., and Lindhal, U. (1991) Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* **60**: 443-75.

Klauser, T., Kramer, J., Otzelberger, K., Pohlner, J., and Meyer, T.F. (1993) Characterization of the *Neisseria* Iga_{β} -core. The essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion. *J Mol Biol* **234**: 579-93.

Klauser, T., Pohlner, J., and Meyer, T.F. (1990) Extracellular transport of cholera toxin B subunit using *Neisseria* IgA protease β -domain: conformation-dependent outer membrane translocation. *EMBO J* **9**: 1991-9.

Knapp, S., and Mekalanos, J.J. (1988) Two trans-acting regulatory genes (*vir* and *mod*) control antigenic modulation in *Bordetella pertussis*. J Bacteriol **170**: 5059-66.

Koronakis, V., Koronakis, E., and Hughes, C. (1989) Isolation and analysis of the C-terminal signal directing export of *Escherichia coli* hemolysin protein across both bacterial membranes. *EMBO J* **8:** 595-605.

Koronakis, V., Li, J., Koronakis, E., and Stauffer, K. (1997) Structure of TolC, the outer membrane component of the bacterial type I efflux system, derived from two-dimensional crystals. *Mol Microbiol* **23**: 617-26.

Koster, M., Bitter, W., de Cock, H., Allaoui, A., Cornelis, G.R., Tomassen, J. (1997) The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-sahaped multimeric complex. *Mol Microbiol* **26**: 789-97.

Kotob, S.I., Hausman, S.Z., and Burns, D.L. (1995) Localization of the promoter for the *ptl* genes of *Bordetella pertussis*, which encode proteins essential for secretion of pertussis toxin. *Infect Immun* **63**: 3227-30.

Kotob, S.I., and Burns, D.L. (1997) Essential role of the consensus nucleotidebinding site of PtlH in secretion of pertussis toxin from *Bordetella pertussis*. J *Bacteriol* **179**: 7577-7580

Kuehn, M.J., Normark, S., and Hultgren, S.J. (1991) Immunoglobulin-like PapD chaperone caps and uncaps interactive surfaces of nascently translocated pilus subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10586-90.

Kumamoto, C.A. (1991) Molecular chaperones and protein translocation across the *Escherichia coli* inner membrane. *Mol Microbiol* 5: 19-22.

Kusukawa, N., Yura, T., Ueguchi, C., Akiyama, Y., and Ito, K. (1989) Effects of mutations in heat-shock genes *groES* and *groEL* on protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J* **8**: 3517-21.

Lacey, B. (1960) Antigenic modulation of Bordetella pertussis. J Hyg 58: 57-93.

Laminet, A.A., Ziegelhoffer, T., Georgopoulos, C., and Pluckthun, A. (1990) The *Escherichia coli* heat shock proteins GroEL and GroES modulate the folding of the β -lactamase precursor. *EMBO J* **9**: 2315-9.

Lee, C., Li, P., Inouye, H., Brickman, E.R., and Beckwith, J. (1989) Genetic studies on the inability of β -galactosidase to be translocated across the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *J Bacteriol* **171:** 4609-16.

Lee, C.A. (1997) Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells? *Trends Microbiol* **5:** 148-56.

Lee, C.K., Roberts, A.L., Finn, T.M., Knapp, S., and Mekalanos, J.J. (1990) A new assay for invasion of HeLa 229 cells by *Bordetella pertussis*: effects of inhibitors, phenotypic modulation, and genetic alterations. *Infect Immun* **58**: 2516-22.

Leininger, E., Ewanowich, C.A., Bhargava, A., Peppler, M.S., Kenimer, J.G., and Brennan, M.J. (1992) Comparative roles of the Arg-Gly-Asp sequence present in the *Bordetella pertussis* adhesins pertactin and filamentous haemagglutinin. *Infect Immun* **60**: 2380-5.

Leininger, E., Roberts, M., Kenimer, J.G., Charles, I.G., Fairweather, N., Novotny, P., and Brennan, M.J. (1991) Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 345-9.

Leslie, P., and Gardner, A.D. (1931) The phases of *Haemophilus pertussis*. J Hyg Camb **31**: 423-434.

Letoffe, S., Delepelaire, P., and Wandersman, C. (1990) Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*: the specific secretion functions are analogous to those of *Escherichia coli* α -haemolysin. *EMBO J* **9**: 1375-82.

Li, Z.M., Hannah, J.H., Stibitz, S., Nguyen, N.Y., Manclark, C.R., and Brennan, M.J. (1991) Cloning and sequencing of the structural gene for the porin protein of *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol* **5**: 1649-56.

Lill, R., Cunningham, K., Brundage, L.A., Ito, K., Oliver, D., and Wickner, W. (1989) SecA protein hydrolyzes ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of *Escherichia coli*. *EMBO J* **8**: 961-6.

Lill, R., Dowhan, W., and Wickner, W. (1990) The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins. *Cell* **60**: 271-80.

Liu, G., Topping, T.B., and Randall, L.L. (1989) Physiological role during export for the retardation of folding by the leader peptide of maltose-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 9213-7.

Livey, I., and Wardlaw, A.C. (1984) Production and properties of *Bordetella* pertussis heat-labile toxin. J Med Microbiol 17: 91-103.

Locht, C., and Antoine, R. (1997) Pertussis toxin. In *Bacterial toxins*. Aktories, K. (Ed). Weinheim: Chapman and Hall. pp. 33-45.

Locht, C., and Keith, J.M. (1986) Pertussis toxin gene: nucleotide sequence and genetic organization. *Science* 232: 1258-64.

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:** 653-60.

Locht, C., Geoffroy, M.C., and Renauld, G. (1992) Common accessory genes for the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the *papC* and *papD* gene families. *EMBO J* **11:** 3175-83.

Long, S.S., Welkon, C.J., and Clark, J.L. (1990) Widespread silent transmission of pertussis in families: antibody correlates of infection and symptomatology. *J Infect Dis* **161**: 480-6.

Lory, S. (1992) Determinants of extracellular protein secretion in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **174**: 3423-8.

Luker, K.E., Tyler, A.N., Marshall, G.R., and Goldman, W.E. (1995) Tracheal cytotoxin structural requirements for respiratory epithelial damage in pertussis. *Mol Microbiol* **16**: 733-43.

Makhov, A.M., Hannah, J.H., Brennan, M.J., Trus, B.L., Kocsis, E., Conway, J.F., Wingfield, P.T., Simon, M.N., and Steven, A.C. (1994) Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. A bacterial adhesin formed as a 50-nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in β strands and turns. *J Mol Biol* **241**: 110-24.

Makoff, A.J., Oxer, M.D., Ballantine, S.P., Fairweather, N.F., and Charles, I.G. (1990) Protective surface antigen P69 of *Bordetella pertussis*: its characterization and very high level expression in *Escherichia coli*. *Biotechnology* N Y **8**: 1030-3.

Marcon, M.J. (1995) Bordetella. In Manual of clinical microbiology. Murray, P.R. (ed). Washington: ASM Press. pp. 566-73.

Mekalanos, J.J. (1992) Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* **174:** 1-7.

Menozzi, F.D., Gantiez, C., and Locht, C. (1991) Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin with heparin. *FEMS Microbiol Lett* **62:** 59-64.

Menozzi, F.D., Mutombo, R., Renauld, G., Gantiez, C., Hannah, J.H., Leininger, E., Brennan, M.J., and Locht, C. (1994) Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 62: 769-78.

Merkel, T.J., and Stibitz, S. (1995) Identification of a locus required for the regulation of *bvg*-repressed genes in *Bordetella pertussis*. J Bacteriol **177**: 2727-36.

Mielcarek, N., Cornette, J., Schacht, A.M., Pierce, R.J., Locht, C., Capron, A., and Riveau, G. (1997) Intranasal priming with recombinant *Bordetella pertussis* for the induction of a systemic immune response against a heterologous antigen. *Infect Immun* **65**: 544-550.

Mielcarek, N., Riveau, G., Remoué, F., Antoine, R., and Locht, C. (1998) Homologous and heterologous protection after single intranasal administration of live attenuated recombinant *Bordetella pertussis*. *Nature Biotech* **16**: 454-57. Miller, J.F., Johnson, S.A., Black, W.J., Beattie, D.T., Mekalanos, J.J., and Falkow, S. (1992) Constitutive sensory transduction mutations in the *Bordetella pertussis bvgS* gene. *J Bacteriol* **174**: 970-9.

Miller, J.F., Roy, C.R., and Falkow, S. (1989) Analysis of *Bordetella pertussis* virulennce gene regulation by the use of transcriptional fusions *in Escherichia coli*. J Bacteriol **171**: 6345-48.

Missiakas, D., and Raina, S. (1997) Protein folding in the bacterial periplasm. J Bacteriol 179: 2465-71.

Monack, D.M., Arico, B., Rappuoli, R., and Falkow, S. (1989) Phase variants of *Bordetella bronchiseptica* arise by spontaneous deletions in the *vir* locus. *Mol Microbiol* **3**: 1719-28.

Mooi, F.R. (1994) Genes for the filamentous hemagglutinin and fimbriae of *Bordetella pertussis*: colocation, coregulation, and cooperation ? In *Molecular* genetics of bacterial pathogenesis. Miller, V.L. (ed). Washington: ASM Press. pp. 145-55.

Mooi, F.R., Jansen, W.H., Brunings, H., Gielen, H., van der Heide, H.G., Walvoort, H.C., and Guinee, P.A. (1992) Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae. *Microb Pathog* **12**: 127-35.

Munoa, F.J., Miller, K.W., Beers, R., Graham, M., and Wu, H.C. (1991) Membrane topology of *Escherichia coli* prolipoprotein signal peptidase (signal peptidase II). *J Biol Chem* **266**: 17667-72.

Murakami, Y., Naitou, M., Hagiwara, H., Shibata, T., Osawa, M., Sasanuma, S., Sasanuma, M., Tsuchiya, Y., Soeda, E., Yokoyama, K., *et al.* (1995) Analysis of the nucleotide sequence of chromosome VI from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Genet* **10**: 261-268.

Nagai, H., Yuzawa, H., and Yura, T. (1991) Interplay of two cis-acting mRNA regions in translational control of sigma 32 synthesis during the heat shock response of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10515-9.

Nicosia, A., Perugini, M., Franzini, C., Casagli, M.C., Borri, M.G., Antoni, G., Almoni, M., Neri, P., Ratti, G., and Rappuoli, R. (1986) Cloning and sequencing of the pertussis toxin genes: operon structure and gene duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 4631-5.

Nikaido, H. (1996) Outer membrane. In Escherichia coli and Salmonella. Cellular and molecular biology. Neidhardt, F.C. (ed). Washington: ASM Press. pp. 29-47.

Nishiyama, K., Suzuki, T., and Tokuda, H. (1996) Inversion of the membrane topology of SecG coupled with SecA-dependent preprotein translocation. *Cell* **85**: 71-81.

Oliver, D.B. (1996) Periplasm. In Escherichia coli and Salmonella. Cellular and molecular biology. Neidhardt, F.C. (ed). Washington: ASM Press. pp. 88-103.

Ondraczek, R., Hobbie, S., and Braun, V. (1992) *In vitro* activation of the *Serratia marcescens* hemolysin through modification and complementation. *J Bacteriol* **174**: 5086-94.

Ortega Barria, E., and Pereira, M.E. (1991) A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell* **67**: 411-21.

Palmer, K.L., and Munson, R.S. Jr. (1995) Cloning and characterization of the genes encoding the hemolysin of *Haemophilus ducreyi*. *Mol Microbiol* **18**: 821-30.

Parton, R. (1996) New perspectives on *Bordetella* pathogenicity. *J Med Microbiol* **44**: 233-5.

Pearson, R.D., Symes, P., Conboy, M., Weiss, A.A., and Hewlett, E.L. (1987) Inhibition of monocyte oxidative responses by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J Immunol* **139**: 2749-54.

Perlman, J.H., Thaw, C.N., Laakkonen, L., Bowers, C.Y., Osman, R., and Gershengorn, M.C. (1993) Hydrogen bonding interaction of thyrotropin-releasing hormone (TRH) with transmembrane tyrosine 106 of the TRH receptor. *J Biol Chem* **269**: 1610-1613.

Pettersson, J., Nordfelth, R., Dubinina, E., Bergman, T., Gustafsson, M., Magnusson, K.E., and Wolf Watz, H. (1996) Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science* **273**: 1231-3.

Pittman, M. (1984) Genus Bordetella. In Bergey's manual of systematic bacteriology. N.R. Krieg (ed). Baltimore/London : Williams and Wilkins, pp. 388-93.

Plano, G.V., Barve, S.S., and Straley, S.C. (1991) LcrD, a membrane-bound regulator of the *Yersinia pestis* low-calcium response. *J Bacteriol* **173**: 7293-303.

Pohl, T., Zimmer, M., Mugele, K., and Spiess, J. (1991) Primary structure and functional expression of a glutaminyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88:** 10059-63.

Poole, K., Schiebel, E., and Braun, V. (1988) Molecular characterization of the hemolysin determinant of *Serratia marcescens*. J Bacteriol 170: 3177-88.

Poquet, I., Kornacker, M.G., and Pugsley, A.P. (1993) The role of the lipoprotein sorting signal (aspartate +2) in pullulanase secretion. *Mol Microbiol* **9:** 1061-9.

Possot, O.M., Letellier, L., and Pugsley, A.P. (1997) Energy requirement for pullulanase secretion by the main terminal branch of the general secretory pathway. *Mol Microbiol* **24**: 457-64.

Prasad, S.M., Yin, Y., Rodzinski, E., Tuomanen, E.I., and Masure, H.R. (1993) Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous haemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **61**: 2780-5.

Provence, D.L., and Curtiss, R. III (1994) Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Inf Immun* **62**: 1369-80.

Pugsley, A.P. (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* 57: 50-108.

Pugsley, A.P., and Dupuy, B. (1992) An enzyme with type IV prepilin peptidase activity is required to process components of the general extracellular protein secretion pathway of *Klebsiella oxytoca*. *Mol Microbiol* **6**: 751-60.

Puziss, J.W., Fikes, J.D., and Bassford, P.J. Jr. (1989) Analysis of mutational alterations in the hydrophilic segment of the maltose-binding protein signal peptide. *J Bacteriol* **171**: 2303-11.

Puziss, J.W., Strobel, S.M., and Bassford, P.J. Jr. (1992) Export of maltose-binding protein species with altered charge distribution surrounding the signal peptide hydrophobic core in *Escherichia coli* cells harboring *prl* suppressor mutations. *J Bacteriol* **174:** 92-101.

Rappuoli, R. (1994) Pathogenicity mechanisms of Bordetella. Curr Top Microbiol Immunol **192:** 319-36.

Redhead, K. (1995) Pertussis vaccines - Old and New. In *Molecular and clinical* aspects of bacterial vaccines development. Ala'Aldeen, D.A.A., and Hormaeche, C.E. (eds). London: John Wiley&Sons Ltd. pp. 258-294.

Relman, D., Tuomanen, E., Falkow, S., Golenbock, D.T., Saukkonen, K., and Wright, S.D. (1990) Recognition of a bacterial adhesin by an integrin: macrophage CR3 ($\alpha_M\beta_2$, CD11b/CD18) binds filamentous haemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell* **61**: 1375-82.

Relman, D.A., Domenighini, M., Tuomanen, E., Rappuoli, R., and Falkow, S. (1989) Filamentous haemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 2637-41.

Renauld-Mongenie, G., Cornette, J., Mielcarek, N., Menozzi, F.D., and Locht, C. (1996a) Distinct roles of the N-terminal and C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *J Bacteriol* **178**: 1053-60.

Renauld-Mongenie, G., Mielcarek, N., Cornette, J., Schacht, A.M., Capron, A., Riveau, G., and Locht, C. (1996b) Induction of mucosal immune responses against a heterologous antigen fused to filamentous haemagglutinin after intranasal immunization with recombinant *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93:** 7944-9.

Ricci, S., Rappuoli, R., and Scarlato, V. (1996) The pertussis toxin liberation genes of *Bordetella pertussis* are transcriptionally linked to the pertussis toxin operon. *Infect Immun* **64:** 1458-60.

Rick, P.D. and Silver, R.P. (1996) Enterobacterial common antigen and capsular polysaccharides. In Escherichia coli *and* Salmonella. *Cellular and molecular biology*. Neidhardt, F.C. (ed). Washington: ASM Press. pp. 104-22.

Rizo, J., Blanco, F.J., Kobe, B., Bruch, M.D., and Gierasch, L.M. (1993) Conformational behavior of *Escherichia coli* OmpA signal peptide in membrane mimetic environments. *Biochemistry* **32**: 4881-94.

Roberts, M., Cropley, I., Chatfield, S., and Dougan, G. (1993) Protection of mice against respiratory *Bordetella pertussis* infection by intranasal immunization with P.69 and FHA. *Vaccine* **11**: 866-72.

Roberts, M., Fairweather, N.F., Leininger, E., Pickard, D., Hewlett, E.L., Robinson, A., Hayward, C., Dougan, G., and Charles, I.G. (1991) Construction and characterization of *Bordetella pertussis* mutants lacking the *vir*-regulated P.69 outer membrane protein. *Mol Microbiol* **5**: 1393-404.

Robinson, A., Ashworth, L.A., and Irons, L.I. (1989) Serotyping *Bordetella pertussis* strains. *Vaccine* 7: 491-4.

Roy, C.R., and Falkow, S. (1991) Identification of *Bordetella pertussis* regulatory sequences required for transcriptional activation of the *fhaB* gene and autoregulation of the *bvgAS* operon. *J Bacteriol* **173**: 2385-92.

Roy, C.R., Miller, J.F., and Falkow, S. (1989) The *bvgA* gene of *Bordetella pertussis* encodes a transcriptional activator required for coordinate regulation of several virulence genes. *J Bacteriol* **171:** 6338-44.

Roy, C.R., Miller, J.F., and Falkow, S. (1990) Autogenous regulation of the *Bordetella pertussis bvgABC* operon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 3763-7.

Rusch, S.L., Chen, H., Izard, J.W., and Kendall, D.A. (1994) Signal peptide hydrophobicity is finely tailored for function. *J Cell Biochem* **55**: 209-17.

Russell, D.G., and Wright, S.D. (1988) Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp-containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania promastigotes*. J Exp Med **168**: 279-92.

Russo, C., Saido, T.C., DeBusk, L.M., Tabaton, M., Gambetti, P., and Teller, J.K. (1997) Heterogeneity of water-soluble amyloid β-peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brains. *FEBS Lett* **409**: 411-6.

Salmond, G.P., and Reeves, P.J. (1993) Membrane traffic wardens and protein secretion in gram-negative bacteria. *Trends Biochem Sci* 18: 7-12.

Sankaran, K., and Wu, H.C. (1994) Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglyceryl moiety from phosphatidylglycerol. *J Biol Chem* **269**: 19701-6.

Sasaki, S., Matsuyama, S., and Mizushima, S. (1990) *In vitro* kinetic analysis of the role of the positive charge at the amino-terminal region of signal peptides in translocation of secretory protein across the cytoplasmic membrane in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **265**: 4358-63.

Sato, Y., Kimura, M., and Fukumi, H. (1984) Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet* 1: 122-6.

Saukkonen, K., Burnette, W.N., Mar, V.L., Masure, H.R., and Tuomanen, E.I. (1992) Pertussis toxin has eukaryotic-like carbohydrate recognition domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89:** 118-22.

Saukkonen, K., Cabellos, C., Burroughs, M., Prasad, S., and Tuomanen, E. (1991) Integrin-mediated localization of *Bordetella pertussis* within macrophages: role in pulmonary colonization. *J Exp Med* **173**: 1143-9.

Sauvonnet, N., and Pugsley, A.P. (1996) Identification of two regions of *Klebsiella* oxytoca pullulanase that together are capable of promoting β -lactamase secretion by the general secretory pathway. *Mol Microbiol* **22:** 1-7.

Scarlato, V., Arico, B., Prugnola, A., and Rappuoli, R. (1991) Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J* **10:** 3971-5.

Scarlato, V., Prugnola, A., Arico, B., and Rappuoli, R. (1990) Positive transcriptional feedback at the *bvg* locus controls expression of virulence factors in *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87:** 6753-7.

Schiebel, E., Driessen, A.J., Hartl, F.U., and Wickner, W. (1991) $\Delta \mu_{H^+}$ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell* **64**: 927-39.

Schiebel, E., Schwarz, H., and Braun, V. (1989) Subcellular location and unique secretion of the hemolysin of *Serratia marcescens*. J Biol Chem **264**: 16311-20.

Schlör, S., Schmidt, A., Maier, E., Benz, R., Goebel, W., and Gentschev, I. (1997) *In vivo* and *in vitro* studies on interactions between components of the hemolysin (HlyA) secretion machinery of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **256**: 306-19.

Schnaitman, C.A., and Klena, J.D. (1993) Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol Rev* **57:** 655-82.

Schonherr, R., Tsolis, R., Focareta, T., and Braun, V. (1993) Amino acid replacements in the *Serratia marcescens* haemolysin ShIA define sites involved in activation and secretion. *Mol Microbiol* **9**: 1229-37.

Shahin, R., Leef, M., Eldridge, J., Hudson, M., and Gilley, R. (1995) Adjuvanticity and protective immunity elicited by *Bordetella pertussis* antigens encapsulated in poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Infect Immun* **63**: 1195-200.

Shahin, R.D., Amsbaugh, D.F., and Leef, M.F. (1992) Mucosal immunization with filamentous haemagglutinin protects against *Bordetella pertussis* respiratory infection. *Infect Immun* 60: 1482-8.

Shieh, M.T., WuDunn, D., Montgomery, R.I., Esko, J.D., and Spear, P.G. (1992) Cell surface receptors for *herpes simplex* virus are heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol* **116**: 1273-81.

Song, I., Chuang, CZ, and Bateman, R.C. Jr. (1994) Molecular cloning, sequence analysis and expression of human pituitary glutaminyl cyclase. *J Mol Endocrinol* **13**: 77-86.

Sory, M.P., Boland, A., Lambermont, I., and Cornelis, G.R. (1995) Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92:** 11998-2002.

Sprengart, M.L., and Porter, A.G. (1997) Functional importance of RNA interactions in selection of translation initiation codons. *Mol Microbiol* **24:** 19-28.

Sprengart, M.L., Fatscher, H.P., and Fuchs, E. (1990) The initiation of translation in *E. coli*: apparent base pairing between the 16S rRNA and downstream sequences of the mRNA. *Nucleic Acids Res* **18**: 1719-23.

Sprengart, M.L., Fuchs, E., and Porter, A.G. (1996) The downstream box: an efficient and independent translation initiation signal in *Escherichia coli*. *EMBO J* **15**: 665-74.

St. Geme, J.W. III, Cutter, D., and Barenkamp, S.J. (1996) Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils. *J Bacteriol* **178**: 6281-7.

St Geme, J.W. III, and 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**: 617-30.

Stader, J., Gansheroff, L.J., and Silhavy, T.J. (1989) New suppressors of signalsequence mutations, *prlG*, are linked tightly to the *secE* gene of *Escherichia coli*. *Genes Dev* **3**: 1045-52.

Stainer, D.W., and Scholte, M.J. (1970) A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. J Gen Microbiol 63: 211-20.

Stanfield, S.W., Ielpi, L., O'Brochta, D., Helinski, D.R., and Ditta, G.S. (1988) The ndvA gene product of *Rhizobium meliloti* is required for β -(1-2)glucan production and has homology to the ATP-binding export protein HlyB. *J Bacteriol* **170**: 3523-30.

Stanley, P., Koronakis, V., and Hughes, C. (1991) Mutational analysis supports a role for multiple structural features in the C-terminal secretion signal of *Escherichia coli* haemolysin. *Mol Microbiol* **5**: 2391-403.

Stanley, P., Packman, L.C., Koronakis, V., and Hughes, C. (1994) Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of *Escherichia coli* hemolysin. *Science* **266**: 1992-6.

Steffen, P., Goyard, S., and Ullmann, A. (1996) Phosphorylated BvgA is sufficient for transcriptional activation of virulence-regulated genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J* **15:** 102-9.

Stein, M., Kenny, B., Stein, M.A., and Finlay, B.B. (1996) Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. *J Bacteriol* **178**: 6546-54.

Stein, P.E., Boodhoo, A., Armstrong, G.D., Cockle, S.A., Klein, M.H., and Read, R.J. (1994) The crystal structure of pertussis toxin. *Structure* **2:** 45-57.

Stibitz, S., Aaronson, W., Monack, D., and Falkow, S. (1989) Phase variation in *Bordetella pertussis* by frameshift mutation in a gene for a novel two-component system. *Nature* **338**: 266-9.

Stibitz, S., and Garletts, T.L. (1992) Derivation of a physical map of the chromosome of *Bordetella pertussis* Tohama I. J Bacteriol 174: 7770-7.

Stibitz, S., and Yang, M.S. (1991) Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the *vir* locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **173**: 4288-96.

Stibitz, S., Weiss, A.A., and Falkow, S. (1988) Genetic analysis of a region of the *Bordetella pertussis* chromosome encoding filamentous haemagglutinin and the pleiotropic regulatory locus *vir. J Bacteriol* **170**: 2904-13.

Strobl, S., Gomis Ruth, F.X., Maskos, K., Frank, G., Huber, R., and Glockshuber, R. (1997) The α -amylase from the yellow meal worm: complete primary structure, crystallization and preliminary X-ray analysis. *FEBS Lett* **409**: 109-14.

Strom, M.S., and Lory, S. (1993) Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu Rev Microbiol* **47:** 565-96.

Struyve, M., Moons, M., and Tommassen, J. (1991) Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J Mol Biol* **218**: 141-8.

Suhr, M., Benz, I., and Schmidt, M.A. (1996) Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDAc and evidence for the outer membrane anchoring as a β -barrel structure. *Mol Microbiol* **22:** 31-42.

Tamura, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M., and Ishii, S. (1982) Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* **21**: 5516-22.

Thern, A., Stenberg, L., Dahlback, B., and Lindahl, G. (1995) Ig-binding surface proteins of *Streptococcus pyogenes* also bind human C4b-binding protein (C4BP), a regulatory component of the complement system. *J Immunol* **154:** 375-86.

Thomas, M.G., Ashworth, L.A., Miller, E., and Lambert, H.P. (1989) Serum IgG, IgA, and IgM responses to pertussis toxin, filamentous haemagglutinin, and agglutinogens 2 and 3 after infection with *Bordetella pertussis* and immunization with whole-cell pertussis vaccine. *J Infect Dis* **160**: 838-45.

Thomas, M.G., Redhead, K., and Lambert, H.P. (1989) Human serum antibody responses to *Bordetella pertussis* infection and pertussis vaccination. *J Infect Dis* **159:** 211-8.

Tschantz, W.R., and Dalbey, R.E. (1994) Bacterial leader peptidase 1. Methods Enzymol 244: 285-301.

Tuomanen, E. (1986) Piracy of adhesins: attachment of superinfecting pathogens to respiratory cilia by secreted adhesins of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **54**: 905-8.

Tuomanen, E., Towbin, H., Rosenfelder, G., Braun, D., Larson, G., Hansson, G.C., and Hill, R. (1988) Receptor analogs and monoclonal antibodies that inhibit adherence of *Bordetella pertussis* to human ciliated respiratory epithelial cells. *J Exp Med* **168**: 267-77.

Tuomanen, E.I., Prasad, S.M., George, J.S., Hoepelman, A.I., Ibsen, P., Heron, I., and Starzyk, R.M. (1993) Reversible opening of the blood-brain barrier by antibacterial antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90:** 7824-8.

Ubbink, M., Van Beeumen, J., and Canters, G.W. (1992) Cytochrome c550 from *Thiobacillus versutus*: cloning, expression in *Escherichia coli*, and purification of the heterologous holoprotein. *J Bacteriol* **174**: 3707-14.

Uchida, K., Mori, H., and Mizushima, S. (1995) Stepwise movement of preproteins in the process of translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. J Biol Chem **270**: 30862-8.

Uhl, M.A., and Miller, J.F. (1994) Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91:** 1163-7.

Uhl, M.A., and Miller, J.F. (1996a) Central role of the BvgS receiver as a phosphorylated intermediate in a complex two-component phosphorelay. *J Biol Chem* **271**: 33176-80.

Uhl, M.A., and Miller, J.F. (1996b) Integration of multiple domains in a twocomponent sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J* **15:** 1028-36.

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 (*shlA* and *shlB*). J Bacteriol 172: 1206-16.

Vale, W., and Rivier, C. (1975) In *Handbook of psychopharmacology*, Iverson, L.L., Iverson, S.D., and Snyder, S.H. (eds). New York: Plenum Press. pp. 195-238.

van't Wout, J., Burnette, W.N., Mar, V.L., Rozdzinski, E., Wright, S.D., and Tuomanen, E.I. (1992) Role of carbohydrate recognition domains of pertussis toxin in adherence of *Bordetella pertussis* to human macrophages. *Infect Immun* **60**: 3303-8.

Vandamme, P., Hommez, J., Vancanneyt, M., Monsieurs, M., Hoste, B., Cookson, B., Wirsing von Konig, C.H., Kersters, K., and Blackall, P.J. (1995) *Bordetella hinzii* sp. nov., isolated from poultry and humans. *Int J Syst Bacteriol* **45:** 37-45.

von Heijne, G. (1984) How signal sequences maintain cleavage specificity. J Mol Biol 173: 243-51.

von Heijne, G. (1986) Net N-C charge imbalance may be important for signal sequence function in bacteria. *J Mol Biol* **192:** 287-90.

von Heijne, G. (1989) The structure of signal peptides from bacterial lipoproteins. *Protein Eng* **2:** 531-4.

von Heijne, G. (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* **225**: 487-94.

Wandersman, C. (1992) Secretion across the bacterial outer membrane. *Trends* Genet 8: 317-22.

Wandersman, C., and Delepelaire, P. (1990) TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87:** 4776-80.

Wattiau, P., Woestyn, S., and Cornelis, G.R. (1996) Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria. *Mol Microbiol* **20**: 255-62.

Webster, R.E. (1991) The *tol* gene products and the import of macromolecules into *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**: 1005-11.

Weiss, A.A. (1997) Mucosal immune defenses and the response of *Bordetella* pertussis. ASM News 63: 22-28.

Weiss, A.A., and Falkow, S. (1984) Genetic analysis of phase change in *Bordetella* pertussis. Infect Immun **43**: 263-9.

Weiss, A.A., and Goodwin, M.S. (1989) Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model. *Infect Immun* 57: 3757-64.

Weiss, A.A., Hewlett, E.L., Myers, G.A., and Falkow, S. (1984) Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of *Bordetella pertussis*. J *Infect Dis* **150**: 219-22.

Weiss, A.A., Johnson, F.D., and Burns, D.L. (1993) Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 2970-4.

Westrop, G., Hormozi, K., da Costa, N., Parton, R., and Coote, J. (1997) Structurefunction studies of the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* and the leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* by heterologous C protein activation and construction of hybrid proteins. *J Bacteriol* **179**: 871-9.

Weyant, R.S., Hollis, D.G., Weaver, R.E., Amin, M.F., Steigerwalt, A.G., O'Connor, S.P., Whitney, A.M., Daneshvar, M.I., Moss, C.W., and Brenner, D.J. (1995) *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. J Clin Microbiol 33: 1-7.

Whitney, E.N. (1971) The tolC locus in Escherichia coli K12. Genetics 67: 39-53.

Wickner, W., and Leonard, M.R. (1996) *Escherichia coli* preprotein translocase. J Biol Chem 271: 29514-6.

Willems, R., Paul, A., van der Heide, H.G., ter Avest, A.R., and Mooi, F.R. (1990) Fimbrial phase variation in *Bordetella pertussis*: a novel mechanism for transcriptional regulation. *EMBO J* **9**: 2803-9.

Willems, R.J., Geuijen, C., van der Heide, H.G., Matheson, M., Robinson, A., Versluis, L.F., Ebberink, R., Theelen, J., and Mooi, F.R. (1993) Isolation of a putative fimbrial adhesin from *Bordetella pertussis* and the identification of its gene. *Mol Microbiol* **9**: 623-34.

Willems, R.J., Geuijen, C., van der Heide, H.G., Renauld, G., Bertin, P., van den Akker, W.M., Locht, C., and Mooi, F.R. (1994) Mutational analysis of the *Bordetella pertussis fim/fha* gene cluster: identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA. *Mol Microbiol* **11**: 337-47.

Willems, R.J., van der Heide, H.G., and Mooi, F.R. (1992) Characterization of a *Bordetella pertussis* fimbrial gene cluster which is located directly downstream of the filamentous haemagglutinin gene. *Mol Microbiol* **6**: 2661-71.

Winans, S.C., Burns, D.L., and Christie, P.J. (1996) Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. *Trends Microbiol* **4**: 64-8.

Woestyn, S., Allaoui, A., Wattiau, P., and Cornelis, G.R. (1994) YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. *J Bacteriol* **176**: 1561-9.

Woestyn, S., Sory, M.P., Boland, A., Lequenne, O., and Cornelis, G.R. (1996) The cytosolic SycE and SycH chaperones of *Yersinia* protect the region of YopE and YopH involved in translocation across eukaryotic cell membranes. *Mol Microbiol* **20**: 1261-71.

Yanagishita, M., and Hascall, V.C. (1992) Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 267: 9451-4.

Young, P. (1996) White House to expand response to infectious diseases. ASM News 62: 450-51.

