

Université de Montréal

Étude de la biogenèse d'un autotransporteur d'*Escherichia coli* appelé Adhesin Involved in Diffuse Adherence (AIDA-I)

par

NANCY RUTHERFORD

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade
de Maître ès sciences (M. Sc.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Août 2006

© Nancy Rutherford, 2006



SF

607

USY

2006

V.035

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Étude de la biogenèse d'un autotransporteur d'*Escherichia coli* appelé Adhesin Involved in Diffuse Adherence (AIDA-I)

présenté par

NANCY RUTHERFORD

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Josée Harel, présidente-rapporteuse

Michaël Mourez, directeur de recherche

J. Daniel Dubreuil, membre du jury

Résumé

Les autotransporteurs sont des protéines de virulence des bactéries à Gram négatif composés d'une partie fonctionnelle et d'une partie translocatrice. Les autotransporteurs se distinguent des autres systèmes de sécrétion par leur apparente simplicité. En effet, toute l'information nécessaire à la translocation est codée par un seul polypeptide qui code aussi pour la partie fonctionnelle de la protéine. Les autotransporteurs sont synthétisés dans le cytoplasme et sont ensuite transportés à travers la membrane interne par le système *sec*. Une fois dans le périplasme, le domaine translocateur formé de deux sous-domaines, un tonneau β et une hélice α , s'insère dans la membrane externe et permet la translocation du domaine passager qui est lui aussi formé de deux domaines, un domaine fonctionnel ainsi qu'un domaine ayant des caractéristiques de chaperone, appelé domaine autochaperone. Plusieurs points de la biogenèse des autotransporteurs restent obscurs particulièrement concernant l'état de repliement du domaine passager avant la translocation. Afin de déterminer l'effet du repliement sur la translocation, nous avons utilisé la protéine affine pour le maltose, MalE en fusion avec la partie translocatrice de l'autotransporteur AIDA-I d'*Escherichia coli*. Contrairement aux études précédentes, nous avons utilisé un système rapporteur du repliement du domaine passager n'impliquant pas le degré d'oxydation de cystéines. En utilisant des mutants de MalE ayant des défauts de repliement intrinsèques, nous avons démontré que le domaine passager doit rester déplié afin d'être transloqué. Nous avons aussi étudié l'interaction entre les différents domaines prédits d'un autotransporteur en générant des fragments complémentaires. Nous avons pu montrer une interaction dans un domaine localisé entre le domaine autochaperone et le domaine de translocation. Ainsi, nous avons identifié la première interaction non-covalente entre le domaine inséré dans la membrane externe et le domaine transloqué. De plus, nos résultats suggèrent que les étapes d'insertion et de translocation sont concertées.

Mots clés: *Escherichia coli*, système de sécrétion de type V, autotransporteurs, membrane externe, MalE, repliement, translocation, cystéine, AIDA-I, système à deux partenaires

Abstract

Autotransporters are virulence proteins of Gram negative bacteria composed of a functional domain and a translocator domain. Autotransporters are really simple compared to other secretion systems. All the information needed for translocation is encoded in one polypeptide which also encodes the functional domain of the protein. Autotransporters are synthesized in the cytoplasm and are exported across the inner membrane by the *sec* pathway. Once in the periplasm, the translocator domain, formed of a β barrel and an α helix, inserts in the outer membrane and allows translocation of the passenger domain which is also formed of two domains, a functional domain and a domain with chaperone properties, called the autochaperone domain. Many aspects of the autotransporters biogenesis remain unclear particularly concerning the folding state of the passenger domain before translocation across the outer membrane. In order to determine the effect of folding on translocation, we used the maltose binding protein, MalE, in a fusion to the translocator domain of the AIDA-I autotransporter of *Escherichia coli*. Unlike previous studies, we used a folding reporter system without cysteine. We used MalE mutants with intrinsic folding defects and we showed that the passenger domain must be in an unfolded state in order to be translocated. We also studied the presence of interactions between the predicted domains of an autotransporter by generating complementary fragments. We showed the presence of an interaction between the autochaperone domain and translocation domain. Therefore, we identified the first non-covalent interaction between the domain inserted in the outer membrane and the translocated domain. Furthermore, our results suggest that the insertion and the translocation steps are concerted.

Key words: *Escherichia coli*, type V secretion system, autotransporters, outer membrane, MalE, folding, translocation, cysteine, AIDA-I, two partner secretion system

Table des matières

<i>Résumé</i>	<i>iii</i>
<i>Abstract</i>	<i>iv</i>
<i>Table des matières</i>	<i>v</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>vii</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>viii</i>
<i>Liste des sigles et abréviations</i>	<i>x</i>
<i>Remerciements</i>	<i>xiii</i>
<i>Introduction</i>	<i>2</i>
<i>Recension de la littérature</i>	<i>5</i>
Première partie: Les autotransporteurs comme système de sécrétion et facteur de virulence	5
1.1 Escherichia coli.....	5
1.2 Facteurs de virulence.....	6
1.3 Systèmes de sécrétion.....	9
1.4 Autotransporteurs.....	10
1.4.1 Organisation.....	10
1.4.2 Biogenèse.....	11
1.4.2.1 Translocation à travers la membrane interne.....	11
1.4.2.2 Transport périplasmique.....	12
1.4.2.3 Insertion dans la membrane externe et translocation.....	14
1.4.2.4 Maturation du domaine passager.....	18
1.4.3 AIDA-I.....	18
Deuxième partie : Les autotransporteurs comme outil de "présentation à la surface"	20
2.1 Système de présentation à la surface.....	20
Troisième partie: Transport et insertion des protéines de la membrane externe	23
3.1 Protéines de la ME.....	23
3.1.1 Protéines périplasmiques participant à la biogenèse des PME.....	24
3.1.2 Protéines de la ME participant à la biogenèse des PME.....	27
Quatrième partie: Généralités sur le système de transport du maltose et des maltodextrines	30
4.1 Système de transport du maltose et des maltodextrines.....	30
4.2 MalE31, une protéine avec des cinétiques de repliement ralenties.....	30
4.3 MalE133 et MalE303: des protéines séparées en fragments complémentaires.....	33
Article :	35
<i>The periplasmic folding of a cysteineless autotransporter passenger domain interferes with its outer membrane translocation</i>	<i>35</i>
<i>Reconstitution of outer membrane translocation by two independently expressed fragments of an autotransporter</i>	<i>61</i>
<i>Discussion</i>	<i>103</i>
<i>Conclusion</i>	<i>112</i>

Bibliographie	115
Annexes	xv
Annexe 1: Effet du repliement sur la translocation: utilisation d'un mutant qui doit se replier afin d'être transloqué	xv
Méthodologie.....	xv
Résultats	xvi
Annexe 2: Construction d'un mutant négatif d'insertion et de translocation	xx
Méthodologie.....	xx
Résultats	xxi
Annexe 3: Construction de mutants de délétions graduelles dans le domaine autochaperone ...	xxii
Méthodologie.....	xxii
Résultats	xxii
Annexe 4: Mesure du stress cytoplasmique et périplasmique engendré par les différentes protéines	xxiv
Méthodologie.....	xxiv
Résultats	xxiv
Annexe 5: Mutagenèse aléatoire de Aidac par analogues nucléotidiques	xxvii
Méthodologie.....	xxvii
Résultats	xxvii
Annexe 6: Mutagenèse du chromosome par insertion aléatoire de transposons	xxix
Méthodologie.....	xxix
Résultats	xxx
Annexe 7: Revue bibliographique publiée dans la revue scientifique <i>Microbial Cell Factories</i> xxxii	
Surface display of proteins by Gram-negative bacterial autotransporters	xxxii

Liste des tableaux

Article 2

Table 1: Summary of the characterizations regarding MalE localization	88
Table 2: Sensitivity towards antibiotics and membrane destabilizing agents	89

Annexe 7

Table 1: Heterologous proteins fused to TU of autotransporters and their surface display applications.....	li
--	----

Liste des figures

Introduction

Figure 1: Organisation et biogenèse d'un autotransporteur	12
Figure 2: Modèles illustrant la translocation à travers la membrane externe par un autotransporteur.	17
Figure 3: Schéma représentant les applications les plus communes du "surface display" bactérien.	20
Figure 4: Deux systèmes de réponse au stress extracytoplasmique chez <i>E. coli</i> ; le système Cpx et le système σ^E	28
Figure 5: Structure de la protéine MalE d' <i>Escherichia coli</i>	31
Figure 6: Structure de MalE31.	32

Article 1

Figure 1: Organization of AIDA-I and of the MalE-AIDAc fusion.....	56
Figure 2: Detection of MalE fused to AIDAc on the surface of whole bacteria.....	57
Figure 3: Extracellular protease accessibility of MalE fused to AIDAc.....	58
Figure 4: Release of a MalE-containing fragment in the periplasm of bacteria expressing a MalE AIDAc fusion.....	59
Figure 5: Fusion of the alkaline phosphatase PhoA has no effect on the cellular localization of MalE or MalE31.....	60

Article 2

Figure 1: Structural model of AIDAc and expression of complementary fragments.....	94
Figure 2: Expression of the MalEAIDAc constructs.....	95
Figure 3: Accessibility of MalE to extracellular antibodies.....	96
Figure 4: Accessibility of MalE to extracellular trypsin.....	97
Figure 5: Presence of AIDAcC in P993 and P965.....	98
Figure 6: Both N and C fragments of AIDAc are required in P974 for MalE accessibility to antibodies and proteases.....	99
Figure 7: Interpretation of the complementation results presented in the study.....	100
Figure S1: Lack of accessibility of β -lactamase by extracellular antibodies.....	101

Discussion

Figure 7: Structures cristallographiques du domaine passager de deux autotransporteurs.....	106
Figure 8: Construction de fragments indépendants complémentaires de la protéine MalEAidac.....	107
Figure 9: Nouveau modèle pour le mécanisme des autotransporteurs.....	109

Annexes

Figure 10: Organisation des fragments complémentaires de MalE et de leur fusion avec Aidac	xvi
Figure 11: Phénotypes des constructions sur géloses MacConkey.....	xvii
Figure 12: Test d'accessibilité aux protéases extracellulaires.....	xviii
Figure 13: Dosage du stress périplasmique.....	xxv

Annexe 7

Figure 1: Organization and biogenesis of autotransporters.....	lii
Figure 2: Mechanistic models of outer membrane translocation by autotransporters.....	liii

Liste des sigles et abréviations

A	Adénine
aa	acides aminés
aah	<i>Autotransporter adhesin heptosyltransferase</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIDA-I	<i>Adhesin involved in diffuse adherence</i>
ARN	Acide ribonucléique
Asp	Asparagine
AT	Autotransporteur
ATP	Adénosine triphosphate
ATs	Autotransporteurs
C	Cytosine
CI	Corps d'inclusions
C-terminal	Carboxy-terminal
CtxB	<i>Cholera toxin B</i>
DAEC	<i>Diffusely Adhering E. coli</i>
dNTP	Désoxy nucléotide tri-phosphate
DO	Densité optique
dPTP	6H,8H-3,4-Dihydro-pyrimido[4,5-c] [1,2]oxazin-7-one-8-β-D-2'-deoxy-ribofuranosid-5'-triphosphate
Dsb	<i>Disulphide bond formation</i>
EAEC	<i>Enteraggregative E. coli</i>
EAST1	<i>Enteraggregative E. coli heat-stable toxin 1</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétracétique
EHEC	<i>Enterohemorrhagique E. coli</i>
EIEC	<i>Enteroinvasif E. coli</i>
EPEC	<i>Enteropathogenic E. coli</i>
ETEC	<i>Enterotoxigenic E. coli</i>
ExPEC	<i>Extra-intestinal pathogenic E. coli</i>
G	Glycine
G	Guanine
Gly	Glycine
Hsps	<i>Heat shock proteins</i>
Ile	Isoleucine
Ipa	<i>invasine plasmide antigen</i>
IPTG	Isopropyl-β -D-thiogalactopyranoside
LB	Luria-Bertani
LEE	<i>Locus of enterocyte effacement</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LT	<i>Heat-labile toxin</i>
LT-B	<i>Heat-labile toxin B subunit</i>
MBP	<i>Maltose binding protein</i>
ME	Membrane externe

NMEC	<i>Neonatal meningitis-associated E. coli</i>
MI	Membrane interne
N	Asparagine
NleA	Non-lee-encoded effector A
N-terminal	Amino-terminal
ONPG	Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside
ORF	<i>Open reading frame</i>
p/v	poids/volume
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PCR	<i>Polymerase Chain reaction</i>
Pet	Plasmid-encoded toxin
PhoA	Phosphatase alcaline
p	Promoteur
<i>pmal</i>	Promoteur inductible au maltose
PME	Protéines de la membrane externe
POTRA	<i>Polypeptide-transport associated</i>
PPiase	Peptidyl-prolyl-cis-trans-isomérase
Pro	Proline
<i>ptac</i>	Promoteur hybride tryptophan-lac
S	Sérine
SS	Séquence signal
ScFv	<i>Single chain antibody variable fragment</i>
SDS	Sodium dodécylsulfate
<i>sec</i>	<i>General secretion pathway</i>
SEPEC	<i>Septicemic Pathogenic E. coli</i>
Skp	<i>Seventeen-kilodalton protein</i>
SRP	<i>Signal Recognition Particule</i> signal
ST	<i>Heat-stable toxin</i>
STL	<i>Shiga like toxin</i>
T	Thymine
T	Thréonine
Tat	<i>Twin arginine translocation</i>
Tir	<i>Translocated intimin receptor</i>
TPS	<i>Two-partner secretion</i>
UPEC	<i>Uropathogenic E. coli</i>
UT	Unité de translocation
WT	<i>Wild type</i>

Unités de mesure

Å	angström
g	gramme
g	force d'accélération
h	heure
hrs	heures
kb	kilobase (10^3 bases)
kDa	kiloDaltons
L	litre
M	molaire
min	minute
mg	milligramme (10^{-3} g)
mg/ ml	mg par ml
ml	millilitre (10^{-3} L)
mM	millimolaire (10^{-3} M)
nm	nanomètre (10^{-9} m)
μ M	micromolaire (10^{-6} M)
sec	seconde
μ g	microgramme (10^{-6} g)
μ g/ ml	μ g par ml
μ l	microlitre (10^{-6} L)

Symboles

α	Alpha
β	Bêta
Δ	Delta: délétion génétique
σ	Sigma
$^{\circ}$	degré
$^{\circ}$ C	degré Celcius
%	pourcentage

Remerciements

Je voudrais remercier tout ceux grâce à qui j'ai pu mener ce projet à terme, particulièrement:

- ❖ Mon directeur de recherche, Michaël Mourez, pour votre patience ainsi que pour m'avoir tant appris mais surtout pour m'avoir donné goût à la recherche
- ❖ Frédéric Berthiaume, pour tous les conseils et toute l'aide que tu as su m'apporter au cours de ces deux années et surtout pour nous avoir fait tant rire en des jours parfois difficiles.....
- ❖ Victoria Girard, pour avoir partagé cette aventure avec moi. Nous savons toutes les deux que ce ne fut pas facile mais j'en garde d'excellents souvenirs
- ❖ Jean-Michel Betton, collaborateur, pour vos conseils sur le projet ainsi que sur la rédaction de l'article
- ❖ Tous les stagiaires qui ont participé à l'avancement de mon projet, Marie-Ève Charbonneau, Vincent Duhéron ainsi que Antoine Blatt
- ❖ Manuel Campos de la fuente alias la « dread », pour m'avoir piqué mes pipettes durant six mois mais surtout pour m'avoir aidé avec Word...
- ❖ Josée Harel et J. Daniel Dubreuil pour le partage de vos connaissances et de vos judicieux conseils
- ❖ Mes collègues et amis en particulier Miriam et Kavi, pour les bons conseils, les bonnes discussions mais surtout pour les bons moments passés ensemble
- ❖ Tous mes amis extérieurs au labo pour m'avoir encouragée, pour avoir été patients et surtout pour m'avoir fait penser à autre chose que le labo
- ❖ Mon meilleur ami Dave, pour avoir cru en moi et m'avoir supportée et aidée depuis le tout tout début, merci
- ❖ Ma famille, Monique, Larry et Kevin merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir toujours encouragée et de vous être intéressé à ce que je fais, tout simplement merci pour tout, merci d'être là
- ❖ Guillaume, je te remercie pour tout, merci d'avoir été là en tout temps, pour me faire rire et me consoler, grâce à toi j'ai évité de devenir folle durant ces deux années incroyables!!!

*Je dédie ce mémoire à moi-même!!!
Bravo ma fille, tu as bien travaillé...*

INTRODUCTION

Introduction

Toutes les bactéries pathogènes sécrètent des facteurs de virulence qui leur permettent de coloniser et d'envahir un hôte. Les bactéries à Gram négatif, comparativement aux bactéries à Gram positif, possèdent deux membranes que leurs différents facteurs de virulence doivent pouvoir traverser afin de se retrouver dans le milieu extracellulaire ou d'être injectés dans la cellule hôte [1]. Plusieurs systèmes de sécrétion ayant des mécanismes d'actions différents sont présents chez les bactéries à Gram négatif. Un de ces systèmes, appelé le système autotransporteur (AT), fait partie du système de sécrétion de type V, tout comme les autotransporteurs trimériques et le système de sécrétion à deux partenaires (TPS) [2-5].

Les autotransporteurs (ATs) sont tous des facteurs de virulence composés de deux domaines principaux: un domaine de translocation C-terminal inséré dans la membrane externe (ME) permettant la translocation à travers celle-ci du deuxième domaine, le domaine passager N-terminal [3]. Les ATs sont synthétisés dans le cytoplasme et sont sécrétés à travers la membrane interne (MI) par le système général de sécrétion *sec* [6]. Ensuite, la protéine transite dans le périplasme et le domaine translocateur s'insère dans la ME permettant la translocation du domaine passager, correspondant à la partie fonctionnelle de la protéine ainsi qu'au domaine autochaperone. Le mécanisme de translocation des ATs demeure obscur, spécialement concernant l'état de repliement du domaine passager avant la translocation. En effet, des études utilisant des domaines passagers hétérologues ont démontré que le domaine passager devait rester déplié ou partiellement replié afin de pouvoir être transloqué alors que d'autres études ont démontré qu'il pouvait être replié et transloqué efficacement [7-14]. Cependant, toutes ces études ont été effectuées en utilisant l'état d'oxydation des ponts disulfures comme indicateur du repliement. Les conditions utilisées afin de modifier l'état des ponts disulfures peuvent avoir des effets globaux incontrôlés autant sur la bactérie que sur la protéine elle-même. L'objectif majeur de notre étude consistait à étudier l'effet du repliement sur la translocation en utilisant un autre système que celui de la formation de ponts disulfures. Nous avons utilisé comme domaine passager hétérologue la protéine affine pour le maltose, MalE, fusionnée à la partie translocatrice de l'autotransporteur AIDA-I (Adhesin Involved in Diffuse Adherence) de *Escherichia coli*. MalE ne contient aucune cystéine et donc aucune possibilité de former un pont disulfure. En plus

de cette caractéristique, MalE est une protéine très bien caractérisée qui exerce une fonction essentielle dans le transport du maltose, ce qui nous a permis de mettre au point un système de criblage. En effet, la présence de MalE dans le périplasma peut être détectée par la capacité de la souche à utiliser le maltose sur un milieu de culture contenant un indicateur de pH. Avec ce système de fusion de protéine, nous avons comparé la translocation de MalE avec celle de mutants de MalE ayant des défauts de repliement afin de déterminer l'effet du repliement sur la translocation.

L'organisation ATs ressemble à celle des TPS qui font aussi partie du système de sécrétion de type V. Cependant, dans le cas des TPS, les deux domaines sont encodés sur deux polypeptides nécessitant ainsi une interaction entre les domaines [5]. Dans le cas des ATs, il ne semble pas y avoir de reconnaissance entre la partie fonctionnelle et le domaine translocateur puisque plusieurs études ont démontré que le domaine passager original des ATs pouvait être remplacé par une protéine hétérologue sans empêcher la translocation [7-9,11-17]. Malgré l'absence de cette reconnaissance entre le domaine passager et le domaine de translocation, d'autres interactions moléculaires doivent avoir lieu à différents endroits dans la protéine afin de permettre la translocation. Les détails de ces interactions restent inconnus.

Ainsi, comme deuxième objectif majeur, nous avons voulu tester s'il y avait des interactions entre les domaines de la protéine en la séparant en fragments complémentaires. Nous avons ainsi regardé si ces domaines séparés en deux fragments indépendants pouvaient s'associer, ce qui suggérerait une interaction. Ce type de technique a déjà fait ses preuves en ce qui concerne l'identification d'intermédiaires périplasmiques dans l'étude de la sécrétion et de l'insertion de protéines périplasmiques ainsi que de protéines de la membrane interne et externe [7,18-21].

En plus des deux objectifs majeurs, nous avons parallèlement fait de la mutagenèse aléatoire par PCR afin d'identifier plus précisément les acides aminés (aa) critiques pour la translocation. Une mutagenèse aléatoire du chromosome de *E. coli* a aussi été réalisée afin d'identifier des protéines impliquées dans la biogenèse des ATs. Nous ne sommes pas convaincu que les ATs soient "autosuffisants". D'autres protéines bactériennes, par exemple l'intimine et l'invasine, sont impliquées dans la virulence et ont une organisation structurale équivalente à celle des ATs. Leur domaine translocateur est situé en N-terminal et leur partie fonctionnelle en C-terminale et le tout est codé par un seul polypeptide. Cependant, personne n'a jamais suggéré que ces protéines

puissent être des ATs malgré l'organisation équivalente à celle des ATs. De plus, comme expliqué dans la section « Recension de la littérature », plusieurs étapes de la biogenèse des autotransporteurs pourraient nécessiter l'intervention de protéines accessoires.

Recension de la littérature

Première partie: Les autotransporteurs comme système de sécrétion et facteur de virulence

1.1 Escherichia coli

Escherichia coli est un bacille à Gram négatif de la famille des entérobactéries. Il est présent dans l'intestin des mammifères dès les premières heures ou journées qui suivent la naissance et il représente, tout au long de la vie, un hôte commun de la microflore commensale. Les bactéries commensales apportent certains bénéfices à l'hôte, par exemple en synthétisant de la vitamine K qui aide à l'absorption des aliments ou en prévenant, par leur équilibre, la prolifération de bactéries commensales potentiellement dangereuses. De plus, la présence de ces bactéries commensales empêche d'autres bactéries potentiellement pathogènes de coloniser le tractus intestinal. Cependant, il arrive parfois que ces mêmes *E. coli* provoquent la maladie, par exemple lorsque que les barrières gastro-intestinales sont brisées ou chez des individus immunodéprimés. De plus, certaines souches de *E. coli* ont acquis des gènes de pathogénicité leur permettant d'exprimer différents facteurs de virulence. Les souches pathogènes possèdent des éléments génétiques que n'ont pas les souches non-pathogènes, notamment un grand nombre de gènes codant pour des facteurs de virulence. De plus, un grand nombre d'éléments mobiles incluant phages, plasmides et transposons a été retrouvé dans le génome de ces souches. Les souches pathogènes semblent donc avoir évolué à partir des souches non pathogènes par transfert horizontal d'ADN. Les infections causées par les *E. coli* pathogènes peuvent être limitées aux muqueuses ou disséminées dans tout le corps. Trois types de symptômes cliniques sont généralement associés aux infections soit les diarrhées, les infections du tractus urinaire et les méningites [25] [26]. Les *E. coli* pathogènes peuvent être divisés en deux grands groupes, les pathogènes à tropisme intestinal et les pathogènes à tropisme extra-intestinal. Dans le groupe des *E. coli* pathogènes extra-intestinaux ou ExPEC sont retrouvés les *E. coli* uropathogènes (UPEC), les *E. coli* septicémiques (SEPEC) et les *E. coli* causant des méningites néonatales (NMEC).

Dans le groupe des *E. coli* pathogènes intestinaux, six pathotypes différents sont retrouvés (selon les facteurs de virulence exprimés et selon les signes cliniques provoqués), soit les *E. coli* entérotoxigéniques (ETEC), les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), les *E. coli* entéro-pathogéniques (EPEC), les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), les *E. coli* entéroagré-gatifs (EAEC) et les *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC) [25] Quelque soit leur pathotype, tous les *E. coli* pathogènes possèdent des facteurs de virulence qui leur permettent de survivre, de coloniser et de se répliquer. Les différents facteurs de virulence semblent guider le type d'interaction du pathogène avec la cellule hôte ainsi que le type de cellules qui vont éventuellement être colonisées.

1.2 Facteurs de virulence

Il existe une grande diversité de facteurs, appelés facteurs de virulence qui permettent aux micro-organismes d'infecter et de provoquer la maladie. Lors du développement d'une infection, plusieurs étapes sont requises. La première étape, l'adhésion, est essentielle à la colonisation des cellules hôtes par les bactéries. Ce type d'interaction chez les *E. coli* est le plus souvent médiée par des adhésines, notamment des fimbriae [27]. Les interactions moléculaires qui suivent l'adhésion sont variables selon le pathogène. Certains *E. coli* causent des maladies en adhérant aux muqueuses et en sécrétant des toxines tandis que d'autres le font en interagissant plus intimement avec la surface des cellules hôtes. Dans certains cas, ils pénètrent directement la cellule et y vivent comme pathogènes intracellulaires ou encore traversent les barrières de l'hôte et envahissent la circulation systémique causant des chocs septiques.

Les ExPEC causent une grande variété d'infections et sont responsables de taux significatifs de mortalité et de morbidité ainsi que d'importants coûts pour les systèmes de santé. Compte tenu de la grande diversité génétique observée chez les souches ExPEC, de nombreux facteurs de virulence ont été décrits. Parmi ceux-ci, les plus courants sont des protéines de transport et d'acquisition du fer, des adhésines telles que les fimbriae de type P et S [26]

Les ETEC sont associés principalement à la diarrhée chez les enfants dans les pays en voie de développement ainsi qu'à la diarrhée du voyageur. Ils produisent des facteurs de colonisation qui forment des fimbriae qui leur permettent d'adhérer aux récepteurs sur les muqueuses du petit

intestin [28]. Suite à cette colonisation, ils causent la maladie grâce aux toxines thermostables (ST) et thermosensibles (LT) qui sont responsables des perturbations du fluide intestinal, qui cause la diarrhée. Certaines souches d'EPEC possèdent l'une ou l'autre des toxines, d'autres souches possèdent les deux.

Les souches de EIEC sont reliées aux *Shigella* spp biochimiquement, génétiquement ainsi que par leurs mécanismes de pathogenèse [25]. Les EIEC causent des syndromes dysentériques avec diarrhée muco-sanglante. Les EIEC envahissent l'intérieur des cellules épithéliales du colon et s'y multiplient.

Comme facteurs de virulence, ces bactéries possèdent des invasines qui permettent à la bactérie de se faire internaliser par la cellule. Ces invasines sont codées par le locus *ipa* (invasine plasmide antigène) retrouvé sur un plasmide. Les EIEC possèdent aussi une protéine de la famille des autotransporteurs (voir la section "Autotransporteurs") appelée VirG (ou IcsA) qui permet le passage de cellule en cellule en recrutant des composantes de l'hôte permettant la polymérisation de l'actine cytoplasmique [28].

Les EPEC sont associés aux diarrhées chez les enfants dans les pays en voie de développement. Les EPEC colonisent la muqueuse intestinale sans l'envahir. Les EPEC causent des lésions de type attachantes-effaçantes qui sont caractérisées par l'effacement des microvillies et une adhérence intime entre la bactérie et la membrane de la cellule épithéliale [25]. Le développement de ces lésions peut être divisé en trois étapes. Premièrement, il y a un attachement initial non intime médié par des fimbriae de type IV. Ensuite, différentes protéines vont être sécrétées pour activer un réarrangement du cytosquelette d'actine de la cellule hôte. Finalement, l'attachement intime de la bactérie à la cellule hôte se fera grâce à l'interaction entre l'intimine, une protéine de la membrane externe bactérienne, et son récepteur bactérien Tir (translocated intimin receptor), préalablement inséré dans la membrane des cellules hôtes par les bactéries. Tir, ainsi que plusieurs autres protéines, sont injectés directement dans la cellule hôte grâce à un système de sécrétion de type III (voir la section "Systèmes de sécrétion"). Ce système de sécrétion est encodé par un locus présent chez tous les EPEC appelé LEE pour Locus of Enterocyte Effacement. Ce locus, ainsi que certains effecteurs qui ne sont pas encodés par le

LEE, tel que NleA [29], permettent l'infection par les EPEC. Il a aussi été démontré que les EPEC produisent des entérotoxines [30].

Les EHEC causent les mêmes lésions attachantes-effaçantes que les EPEC mais en plus, ils produisent plusieurs toxines, entre autre une toxine analogue à celle de *Shigella flexneri* (SLT, Shiga like toxin), une hémolysine et une sérine protéase. Toutes les souches dites EHEC possèdent les gènes *stx* codant pour les SLT aussi appelées vérotoxines. Les EHEC possèdent comme les EPEC un locus LEE. Ils ont été reconnus comme une classe distincte de pathogènes lorsqu'il fut observé qu'ils causaient deux maladies bien particulières soit la colite hémorragique ainsi que le syndrome urémique hémolytique [25]. Le *E. coli* O157 : H7 responsable de la "maladie du hamburger" fait parti des EHEC.

Les EAEC sont le plus souvent associés à des diarrhées aqueuses persistantes chez les jeunes enfants et causent parfois des diarrhées sanglantes. Les EAEC sont caractérisés par un type d'adhésion agrégative qui est à l'origine de nécroses au pôle apical avec oedème inflammatoire et hémorragique de la sous-muqueuse. Les EAEC possèdent au moins deux types d'adhésines fimbriales soit les fimbriae adhérent agrégatif 1 et 2 [31,32] permettant l'adhésion aux tissus en culture cellulaire et aux érythrocytes. Plusieurs EAEC possèdent aussi une toxine appelée "enteroaggrégative *E. coli* heat-stable toxin 1" ou EAST1 ainsi qu'une entérotoxine encodée par un plasmide (Pet pour plasmid encoded enterotoxin) pouvant contribuer à la maladie. Certaines souches possèdent aussi une protéine impliquée dans la colonisation intestinale dénommée Pic. Les protéines Pet et Pic sont aussi des autotransporteurs (voir la section "Autotransporteurs").

Les DAEC sont associés à des diarrhées aiguës et persistantes chez les enfants. Les caractéristiques pathogéniques des DAEC sont très peu connues. Les seuls facteurs de virulence retrouvés chez les DAEC sont des adhésines. Les plus communes sont l'adhésine afimbriale impliquée dans l'adhérence diffuse ou AIDA-I et l'adhésine fimbriale F1845. Il a été démontré que les souches de DAEC étaient capables de former des projections « finger-like » à la surface des différentes lignées cellulaires [33,34]. Les bactéries apparemment contenues dans les projections ne sont pas internalisées. Le rôle de ces projections dans la pathogenèse reste à démontrer.

Tous les différents facteurs de virulence décrits ci-dessus sont essentiels à la pathogénicité de ces bactéries. Ce sont soit des protéines insérées dans la membrane des bactéries soit des protéines sécrétées dans le milieu extracellulaire ou bien directement injectées dans les cellules hôtes. Contrairement aux bactéries à Gram positif qui ne possèdent qu'une paroi, les bactéries à Gram négatif possèdent deux membranes, la MI et la ME, et doivent donc posséder différents systèmes pour permettre aux protéines de se rendre où elles le doivent. Les bactéries à Gram négatif possèdent des systèmes d'insertion de protéines dans la ME et différents systèmes de sécrétion qui permettent aux protéines de traverser les deux membranes.

1.3 Systèmes de sécrétion

Comme mentionné précédemment, pour exercer toutes leurs fonctions, les bactéries doivent sécréter différentes protéines à travers leurs deux membranes [1]. Dans ce but, les bactéries ont développé différents systèmes de sécrétion dénommés type I à type VI.

(a) Le système de sécrétion de type I permet la sécrétion de protéines directement du cytoplasme au milieu extracellulaire. Il est composé de trois protéines [35]: (i) un transporteur de la MI faisant partie de la famille des ATP-binding cassettes ou ABC transporteurs, (ii) un adaptateur périplasmique ancré à la MI et (iii) une protéine de la ME. Ce système est indépendant du système général de sécrétion *sec* de la MI et il n'y a pas d'intermédiaire périplasmique.

(b) Le système de sécrétion de type II est aussi appelé "principale branche de terminaison du système *sec*" et permet la translocation dans le milieu extracellulaire de protéines exportées dans le périplasme par le système *sec* [36]. Ce système permet aussi de transloquer des protéines sécrétées à travers la MI par le système de translocation à deux arginines (système *tat*, twin arginin translocation system) [37]. Le système de sécrétion du type II est complexe et implique au moins une douzaine de protéines localisées dans l'enveloppe bactérienne incluant la MI, le périplasme et la ME.

(c) Le système de sécrétion de type III est composé d'une structure complexe faite d'au moins 20 protéines différentes également retrouvées dans chaque couche de l'enveloppe bactérienne [38]. Le système fonctionne comme une seringue moléculaire délivrant des facteurs de virulence du

cytoplasme bactérien directement dans le milieu extracellulaire ou dans le cytosol des cellules de plantes ou d'animaux.

(d) Le système de sécrétion de type IV agit comme une seringue permettant le transfert d'ADN et de substrats protéiques du cytoplasme d'une bactérie au cytoplasme d'une autre. Dans certains cas, ce système permet aussi de délivrer de l'ADN ou des protéines dans le milieu extracellulaire ou dans le cytosol d'une cellule animale. Le système de sécrétion de type IV est un système complexe qui implique plus d'une douzaine de composantes protéiques localisées dans la MI, le périplasme et la ME.

(e) Par contraste avec les autres systèmes, le système de sécrétion de type V apparaît être très simple [3,4]. Ce système transloque les protéines exportées à travers la MI par le système *sec*, du périplasme vers le milieu extracellulaire ou du côté extracellulaire de la ME de la bactérie. Le système de sécrétion de type V est divisé en trois groupes: les ATs aussi appelé type Va, les TPS aussi appelé type Vb et les ATs trimériques appelés type Vc. Les ATs sont encodés sur un seul polypeptide divisé en deux domaines : le premier domaine est sécrété au travers de la ME et le deuxième domaine médie la translocation. Les TPS sont similaires aux ATs cependant les deux domaines sont synthétisés en deux polypeptides indépendants [5]. Les ATs trimériques sont, tout comme les ATs, des protéines "autosuffisantes" mais qui nécessitent une trimérisation [2].

(f) Un nouveau système, le système de sécrétion de type VI a récemment été découvert [39]. Il a été identifié chez *Vibrio cholerae* et serait présent chez plusieurs bactéries pathogènes. Son mode d'action n'est pas encore connu mais il a été suggéré qu'il pourrait médier l'export de facteurs de virulence dans le milieu extracellulaire et la translocation de ces facteurs de virulence dans les cellules eucaryotes. Malgré le fait que le mécanisme d'action reste inconnu pour le moment, il est peu probable qu'il soit aussi simple que le système de sécrétion de type V.

1.4 Autotransporteurs

1.4.1 Organisation

Le premier AT à avoir été découvert est l'IgA protéase de *Neisseria gonorrhoeae* [40]. Depuis, plusieurs ATs ont été découverts et ils sont tous impliqués dans la virulence de pathogènes bactériens. Les ATs sont impliqués dans plusieurs processus comme l'adhésion, l'agrégation, l'invasion, la formation de biofilm, la résistance au sérum et la cytotoxicité [1,27].

Comparativement aux autres systèmes de sécrétion, les ATs ont une organisation distincte (Figure 1A) [3]. En N-terminal, ils possèdent une séquence signal *sec*-dépendante qui est suivie d'un domaine passager correspondant à la partie fonctionnelle de la protéine. Le domaine passager est transloqué à travers la ME grâce à la région C-terminale appelée unité de translocation (UT) [41]. L'UT est composée de deux domaines: un domaine comprenant les 250 à 300 derniers aa prédits pour former un tonneau β inséré dans la ME et immédiatement avant, un domaine formé d'environ 25 aa appelé région "linker" et prédit pour adopter une conformation d'hélice α [42]. Finalement, les ATs comportent un dernier domaine en C-terminal du domaine passager appelé domaine autochaperone [43]. Ce dernier n'est pas indispensable à la translocation mais il augmente son efficacité, soit en stabilisant le tonneau β [44], soit en favorisant le repliement du domaine passager [43]. Le mécanisme de translocation est conservé chez tous les ATs et peut être divisé en quatre étapes (Figure 1B): (i) la translocation à travers la MI, (ii) le transport périplasmique, (iii) l'insertion puis la translocation dans la ME et (iv) la maturation du domaine passager.

1.4.2 Biogenèse

1.4.2.1 Translocation à travers la membrane interne

Les ATs ont une séquence signal en N-terminal possédant toutes les caractéristiques des séquences signales *sec*-dépendantes [6]. En effet, la translocation de certains ATs à travers la MI semble être médiée par le "signal recognition particule" (SRP) et/ou par SecB, deux composants de la machinerie *sec* [19,45,46]. Certains ATs possèdent une séquence signal anormalement longue [47]. Il a été proposé que cette longue séquence signal pourrait prévenir l'adoption par la protéine d'une conformation incompetente avec la translocation au travers de la MI [45]. Il a aussi été suggéré que cette séquence signal pourrait empêcher la protéine d'adopter une conformation périplasmique incompatible avec la translocation au travers de la ME, en prolongeant l'interaction avec la machinerie de la MI [48]. Cette fonction pourrait provenir d'une association de la séquence signal avec un facteur cytoplasmique inconnu ou de l'adoption d'une conformation altérant l'affinité de la protéine pour la machinerie de sécrétion [46].

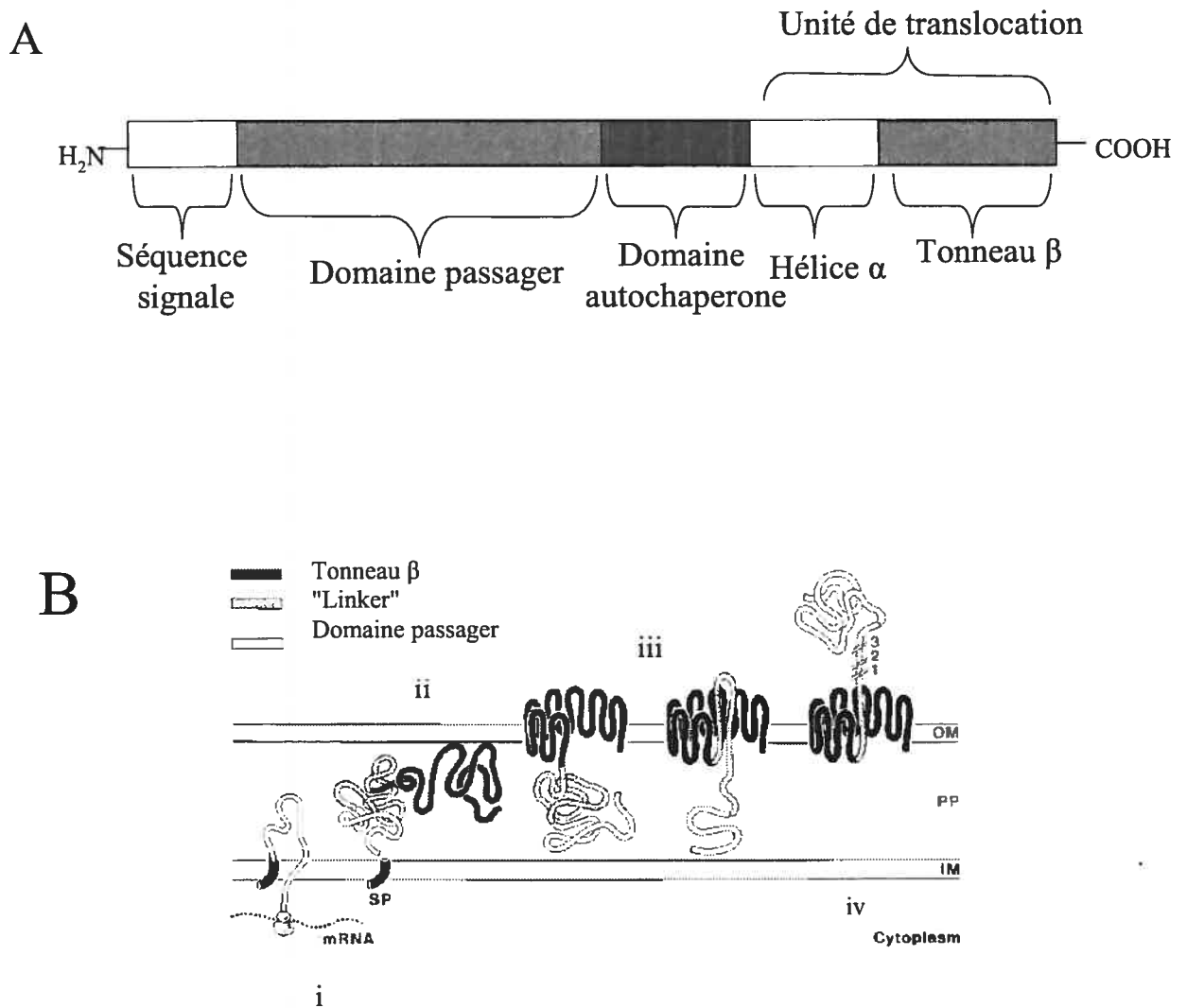


Figure 1: Organisation et biogenèse d'un autotransporteur. (A) Schéma montrant l'organisation d'un autotransporteur. L'unité de translocation comprend l'hélice α ainsi que le tonneau β . Les boîtes ne sont pas à l'échelle. (B) La biogenèse d'un autotransporteur comprend quatre étapes: (i) translocation à travers la membrane interne, (ii) transport périplasmique, (iii) insertion dans la membrane externe et translocation, (iv) maturation du domaine passager. Figure adaptée de Maurer et al. (1997)

1.4.2.2 Transport périplasmique

Après le passage de la MI, la protéine existe comme intermédiaire périplasmique [4]. Plusieurs études ont tenté de déterminer l'état de repliement du domaine passager avant la translocation au

travers de la ME. Le mécanisme de translocation des ATs est particulièrement versatile et il a été rapidement observé qu'il n'était pas affecté par la nature du domaine passager. Plusieurs études ont donc remplacé les domaines passagers originaux des ATs par des protéines hétérologues et modifié le repliement de ces protéines afin d'étudier le mécanisme de translocation des ATs [7,8,11-17]. Les premières expériences ont utilisé la sous-unité B de la toxine cholérique (CtxB) fusionnée à l'UT de l'IgA protéase de *N. gonorrhoeae*. CtxB contient des cystéines qui forment des ponts disulfures dans le périplasme. Il a été initialement démontré que la translocation de CtxB était affectée lorsqu'elle était capable de former des ponts disulfures et que sous cette forme oxydée, la protéine restait bloquée dans le périplasme [7,8]. Par la suite, ils ont montré que les mutants de CtxB sans cystéine étaient transloqués plus efficacement et donc que l'état non replié ou partiellement replié favorise la translocation. Un effet similaire a été observé par l'ajout de β -mercaptoéthanol dans le milieu de culture ou en utilisant une souche mutante pour *dsbA*, conditions prévenant la formation de ponts disulfures dans le périplasme [16]. La formation de ponts disulfures est une étape lente dans le processus de repliement des protéines et la présence de ces liens est souvent utilisée comme "marqueur" de repliement. Les expériences utilisant CtxB ont donc été interprétées comme une indication de l'incompatibilité entre le repliement périplasmique du domaine passager et la translocation à travers la ME chez les ATs. Dans d'autres expériences, PhoA, une protéine périplasmique contenant des cystéines, a été fusionnée à l'UT de l'AT IcsA de *S. flexneri* [9]. Il a été montré que la translocation de PhoA à travers la ME était incomplète et pouvait être améliorée en bloquant la formation de ponts disulfures, confirmant les résultats obtenus avec CtxB. Des expériences similaires utilisant différentes combinaisons d'UT et de domaines passagers hétérologues contenant des cystéines en sont venues aux mêmes conclusions [15]. Cependant, des études plus récentes ont démontré qu'un fragment d'une chaîne simple d'anticorps (ScFv) fusionné à l'UT de l'IgA protéase de *N. gonorrhoeae* se retrouvait à la surface de la bactérie dans une conformation active [13,14]. Or, la formation de ponts disulfures est nécessaire pour que la plupart des ScFv puissent adopter une conformation correctement repliée. Ces études suggèrent que lors de la translocation d'une ScFv en fusion avec une UT, le pont disulfure se formerait dans le périplasme et donc avant la translocation. Il a donc été conclu que la protéine était repliée avant la translocation, contredisant ainsi les premières observations. D'autres expériences ont rapidement suivi, suggérant que des polypeptides repliés pouvaient effectivement être transloqués à travers la ME par les ATs. Une

étude utilisant une fusion entre l'UT d'une adhésine de *E. coli* impliquée dans l'adhérence diffuse (AIDA-I) et la sous-unité B de l'entérotoxine thermosensible de *E. coli* (LT-B) comme domaine passager, a démontré que la présence de ponts disulfures dans ces protéines avaient peu ou pas d'effet sur l'efficacité de translocation [11]. Dans une autre étude, il a été démontré que le domaine passager natif de IcsA contenait un pont disulfure formé dans le périplasma et donc avant la translocation [10]. Dernièrement, une étude utilisant une fusion entre CtxB et l'UT de l'AT EspP de *E. coli* a montré que la translocation d'un domaine passager replié ou du moins partiellement replié était possible [17].

Toutes ces expériences étudiant l'effet du repliement sur la translocation ont été effectuées en utilisant la formation de pont disulfure comme indicateur de repliement et/ou en manipulant la capacité de ces protéines à former ces ponts disulfures dans le but d'étudier l'effet du repliement sur la translocation. Cela pourrait permettre d'expliquer les résultats contradictoires obtenus dans les études énumérées ci-dessus. En effet, l'absence ou la présence de ces ponts ne corrèle pas toujours avec l'état de repliement d'une protéine [49]. De plus, manipuler la capacité de la bactérie ou de la protéine à former des ponts disulfures en mutant les cystéines du domaine passager ou en changeant l'environnement oxydo-réducteur du périplasma peut avoir des effets globaux incontrôlés sur la protéine ou peut induire une réponse bactérienne au stress [50]. Tous ces facteurs peuvent donc compliquer les interprétations de ces études qui s'intéressent seulement à l'effet du repliement sur la translocation. Afin de tenter de résoudre les contradictions concernant l'effet du repliement périplasmique sur la translocation, de nouvelles méthodes d'étude n'utilisant plus les ponts disulfures comme marqueur doivent être développées.

1.4.2.3 Insertion dans la membrane externe et translocation

Il a longtemps été admis que le passage à travers la ME par les ATs pouvait être divisé en deux étapes [8]: l'insertion de l'UT dans la ME suivie de la translocation du domaine passager à la surface extracellulaire. Plusieurs modèles ont été proposés afin de détailler ces étapes [4] (Figure 2). Ces modèles sont surtout basés sur des observations faites sur le repliement périplasmique du domaine passager ainsi que sur des études structurales réalisées sur les UT. Pour certains ATs, les limites de l'UT ont été expérimentalement déterminées et sa structure a été prédite [41,51] consistant en une hélice α et un tonneau β [42,52,53]. Récemment, la structure obtenue par

cristallographie de l'UT de l'AT NalP de *Neisseria meningitidis* a confirmé ces prédictions [54]. En effet, cette UT consiste en un tonneau β formé de 12 brins antiparallèles et d'une hélice α localisée dans la lumière du tonneau β avec son extrémité N-terminale du côté extracellulaire de la ME. La plus grande dimension du pore peut être estimée à 10 angströms (Å). Une telle taille peut seulement être compatible avec l'hypothèse impliquant que les polypeptides sont transloqués dépliés dans le pore du tonneau β . Dans ce cas, le repliement du domaine passager une fois à la surface pourrait fournir l'énergie nécessaire à la translocation [54]. Deux modèles ont été proposés en fonction de cette hypothèse. Le premier modèle suggère que la translocation du domaine passager commence par son extrémité C-terminale, soit le domaine autochaperone. Ceci résulterait en la formation d'une structure en tête d'épingle d'où le nom "hairpin model" (Figure 2A) [40]. Cependant, le diamètre du pore dans ce modèle permettrait de tolérer au maximum deux chaînes polypeptidiques dépliées suggérant que l'hélice α , retrouvée dans le pore, se replierait seulement une fois la translocation terminée. Un modèle alternatif ayant été suggéré propose que la translocation du domaine passager commencerait par son extrémité N-terminale. Ce modèle, nommé le "threading model" (Figure 2B), pourrait prendre en compte les problèmes stériques du modèle en tête d'épingle puisqu'un seul polypeptide serait retrouvé dans le pore durant la translocation [54]. Cependant ce modèle est peu probable puisqu'il impliquerait une reconnaissance de la partie N-terminale du domaine passager par l'UT alors que plusieurs protéines hétérologues sont efficacement transloquées par les ATs. Vraisemblablement, aucun de ces modèles ne peut donc permettre la translocation de polypeptides même partiellement repliés vu le petit diamètre du pore. Un autre modèle, appelé le modèle multimérique (Figure 2C), a été proposé suite à la visualisation en microscopie électronique de structure en anneau de l'UT d'un AT [55]. La taille de la cavité centrale dans ce cas a été estimée à environ 20 Å . Ce diamètre est suffisamment large pour permettre la translocation de petites protéines repliées, de protéines plus larges partiellement repliées ou de protéines avec plusieurs domaines pour lesquelles chaque domaine serait séquentiellement transloqué. Le modèle multimérique permet de résoudre les problèmes stériques des deux modèles précédents.

Cependant, ce modèle est incohérent avec la structure de l'UT de NalP pour lequel aucun oligomère n'a été observé [54]. Similairement, deux études ont récemment démontré que les UT des ATs AIDA-I et EspP n'étaient pas multimériques [17,56]. Ce dernier modèle est également

incohérent avec l'observation montrant que l'hélice α , qui est connectée au domaine passager, est localisée dans le pore du tonneau β et non à l'extérieur comme le modèle multimérique l'exigerait [54]. Ce modèle pose également une autre question, à savoir si les domaines passagers sont repliés avant la translocation, quelle est la source d'énergie permettant la translocation?

Les modèles précédents comportent d'importants problèmes stériques et/ou mécaniques. Un modèle alternatif, appelé le modèle Omp85 (Figure 2D), suggère que la translocation des ATs implique une machinerie extracytoplasmique. Omp85 est une protéine essentielle de la ME présente chez toutes les bactéries à Gram négatif (équivalent de YaeT chez *E. coli*). En effet, Omp85 participerait à l'insertion de toutes les protéines intégrales de la ME y compris les ATs [57]. Omp85 pourrait coopérer avec d'autres protéines périplasmiques telles que SkpA ou SurA et des lipoprotéines de ME telles que YfiO et YfgL [58]. SkpA et SurA sont des protéines essentielles impliquées dans l'insertion de protéines de la ME dont certaines possèdent des boucles extracellulaires pouvant représenter jusqu'à la moitié de la protéine [57]. Il a donc été suggéré que cette même machinerie pourrait être impliquée dans la translocation de domaines passagers. Il est cependant difficile de différencier la contribution de Omp85 dans l'insertion de l'UT et dans la translocation du domaine passager. Le modèle Omp85 semble intéressant mais il devra être testé plus en détail.

Les résultats obtenus lors de l'étude du mécanisme de translocation à travers la ME sont très confus et même contradictoires. Jusqu'à ce jour, aucun modèle satisfaisant n'a émergé de toutes ces observations. L'étape de translocation reste mystérieuse. Plusieurs structures moléculaires d'UT ainsi que des études biochimiques *in vitro* et *in vivo* sont attendues et devraient aider à comprendre le mécanisme de translocation.

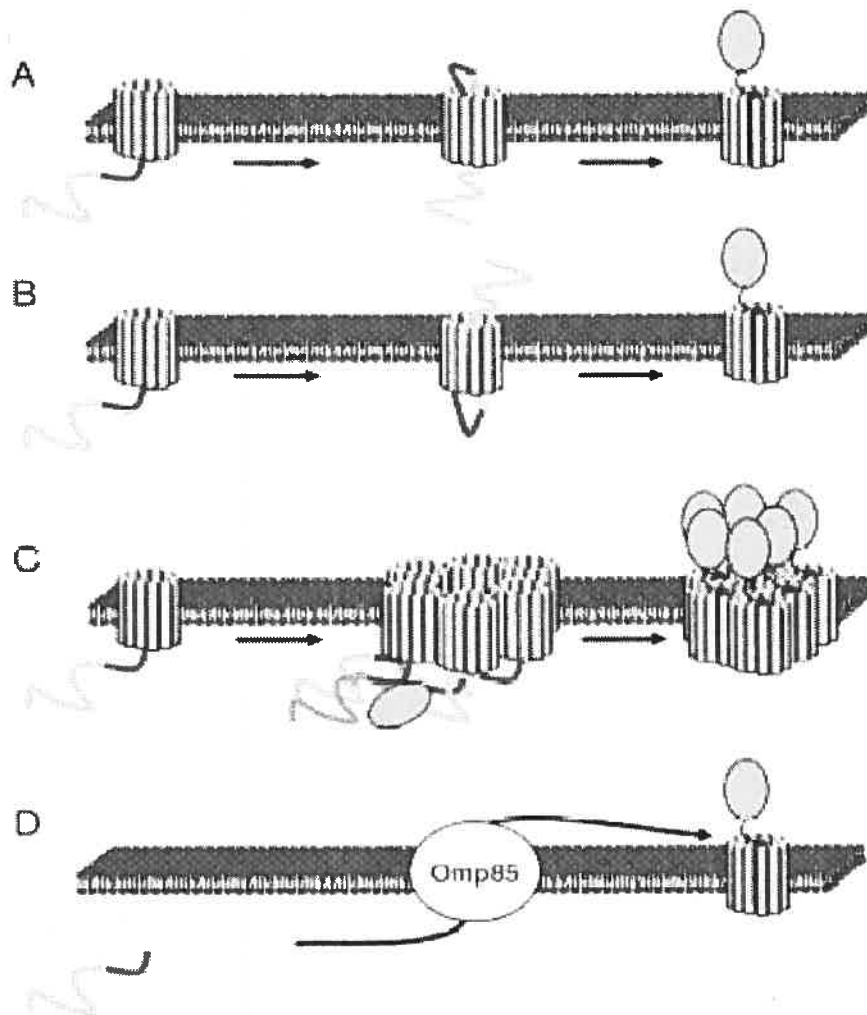


Figure 2: Modèles illustrant la translocation à travers la membrane externe par un autotransporteur (A) Modèle en tête d'épingle. Le tonneau β est inséré dans la ME et le domaine autochaperone (en noir) forme une structure en tête d'épingle (se replie sur lui-même) pour permettre au domaine passager (en gris) d'être transloqué, ce qui implique que deux chaînes peptidiques se retrouvent dans le pore au même moment. La translocation du domaine passager débute donc par son extrémité C-terminale. (B) "Threading model". Dans ce modèle, la translocation débute par l'extrémité N-terminale du domaine passager qui doit donc pouvoir "trouver" le pore. (C) Modèle multimérique. Dans ce modèle, un certain nombre de tonneaux β (ici six), s'associent et forment un pore central qui peut permettre la translocation des domaines passagers. En effet, le diamètre de ce pore semble plus compatible avec la translocation que le diamètre d'un pore formé par un seul tonneau β . (D) Modèle Omp85. La protéine de ME Omp85 pourrait permettre l'insertion du tonneau β dans la ME ainsi que la translocation du domaine passager.

1.4.2.4 Maturation du domaine passager

Pour plusieurs ATs, le domaine passager est clivé après la translocation. Une fois clivé, il peut soit être relâché dans le milieu extracellulaire ou bien rester associé de manière non-covalente avec la ME. C'est le cas pour l'adhésine Hap de *Haemophilus influenzae*, pour laquelle le clivage est médié par une région du domaine passager contenant un site catalytique sérine protéase qui agit en *trans* [59]. Dans d'autres cas, le clivage peut être effectué par une protéase accessoire de la ME. Cela a été observé chez *S. flexneri* où la protéase SopA clive l'AT IcsA [60]. Pour d'autres ATs, comme l'adhésine AIDA-I de *E. coli*, aucun site catalytique de protéase n'a été identifié et aucune protéine accessoire n'a été trouvée responsable pour le clivage post-translocation [61]. Le clivage pour ces ATs pourrait être du à des contraintes structurales locales.

1.4.3 AIDA-I

AIDA-I qui a été identifiée pour la première fois dans un cas de diarrhée infantile chez la souche entéro-pathogène *E. coli* 2787 (O126:H27), est un des premiers ATs à avoir été décrit. [18]. AIDA-I est une adhésine encodée par un plasmide, qui confère un phénotype d'adhérence diffuse chez la souche de laboratoire K12. Le gène codant pour AIDA-I est présent dans plusieurs isolats de *E. coli* provenant de cas de diarrhée chez les porcelets nouveaux nés ou en sevrage. La protéine AIDA-I porcine présente une haute homologie en aa avec la protéine AIDA-I humaine [62]. Cette homologie a été confirmée par d'autres laboratoires (résultats non publiés). La séquence nucléotidique de AIDA-I contient deux cadres de lecture ouverts (ORF, Open Reading Frame), l'ORF B et l'ORF A. L'ORF B code pour un précurseur de AIDA-I de 130 kDa comportant une séquence signal de 49 aa. La séquence de AIDA-I contient un nombre important d'aa polaires non-chargés (G, N, S, T; 47% des aa) ainsi qu'un nombre important de répétition de 19 aa [63]. L'ORF A est indispensable pour le phénotype d'adhérence diffuse, malgré le fait qu'il ne comporte pas de séquence signal. Le produit de l'ORF A est une heptosyltransférase cytoplasmique appelée Aah pour Autotransporter Adhésin Heptosyltransférase [63]. Aah ajoute des heptoses sur AIDA-I, probablement sur les répétitions retrouvées en N-terminal. AIDA-I, comme tout les ATs monomériques est constituée d'un domaine passager et d'un domaine de translocation. La longueur du domaine passager de AIDA-I est de 797 aa tandis que celle du

domaine de translocation inséré dans la ME est de 440 aa [64]. AIDA-I est un bon modèle pour étudier les ATs puisque c'est une protéine de *E. coli* qui a souvent été utilisée à cette fin [11,44,51,56,61,64,65]. L'utilisation d'AIDA-I permet notamment d'éviter les problèmes de toxicité dus à l'expression d'une protéine étrangère.

Deuxième partie : Les autotransporteurs comme outil de "présentation à la surface"

2.1 Système de présentation à la surface

Le système de présentation de protéines à la surface d'organismes biologiques aussi appelé "surface display", représente un intérêt majeur en médecine et en biotechnologie. Plusieurs techniques ont été développées afin de faire du "surface display" à la surface de virus, de levures ainsi que de bactéries [66]. Le "surface display" bactérien a beaucoup été utilisé dans les dernières années [67], [68]. Les applications les plus communes du "surface display" bactérien sont le développement de vaccins, l'expression d'enzymes hétérologues d'intérêts biotechnologiques ainsi que la sélection de bibliothèques de peptides ou de protéines (Figure 3) [69-74].

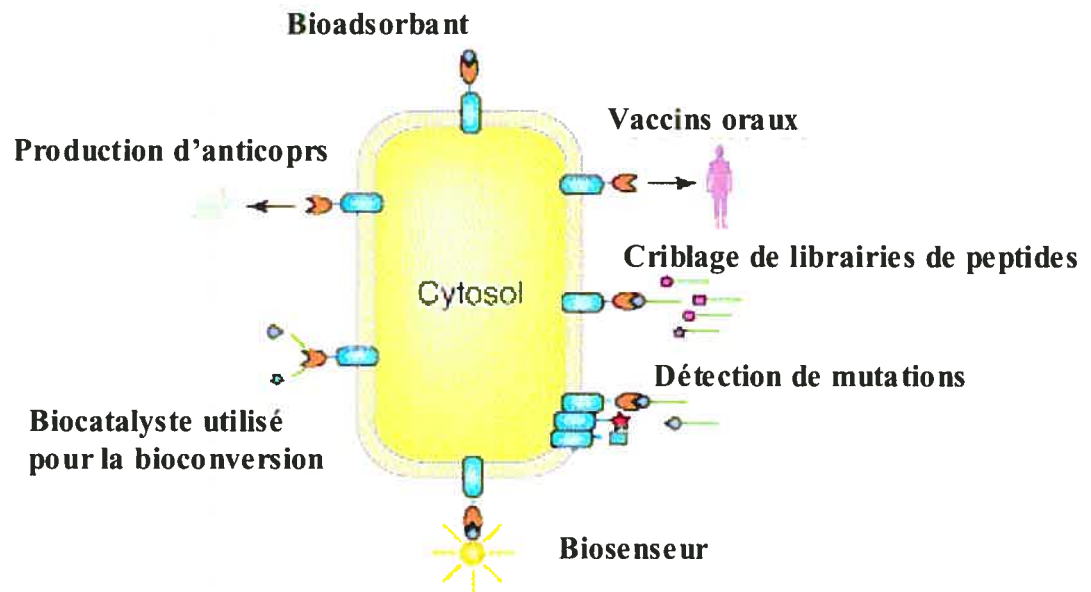


Figure 3: Schéma représentant les applications les plus communes du "surface display" bactérien. Figure adaptée de Lee, et al. (2003).

Le "surface display" consiste à fusionner génétiquement une protéine d'intérêt à une protéine qui va permettre sa présentation à la surface de l'organisme [66]. Le "surface display" bactérien exploite des systèmes déjà existants chez les bactéries permettant l'export des protéines du

cytoplasme au milieu extracellulaire [68]. Le système le plus utilisé est le système des ATs monomériques décrit ci-dessus. Plusieurs autres systèmes bactériens ont été utilisés afin de faire de la présentation à la surface tels que les protéines intégrales de la ME, les lipoprotéines de la ME, les flagelles, les fimbriae ainsi que les systèmes de sécrétion de type II et III [66,75-85]. Plusieurs de ces systèmes présentent des inconvénients tels que la taille maximale qu'ils peuvent exposer à la surface ou la localisation de leurs extrémités. Ces inconvénients peuvent en partie être résolus par les ATs.

Les ATs peuvent transloquer à la surface des polypeptides de tailles variées d'environ 10 aa [11,86-88] jusqu'à 613 aa dans le cas de la lipase de *Serratia marcescens* fusionnée à l'AT EstA [89]. Cette caractéristique est assez spécifique des ATs, quoique certains systèmes permettent aussi la présentation de protéines assez grosses. En effet, le système de "phage display" (utilisation d'un phage comme système de présentation) a été efficacement utilisé pour présenter la phosphatase alcaline qui compte 471 aa [90] tandis que la protéine de nucléation de la glace de *Pseudomonas syringae* a permis d'exposer la levansucrase de *Zymomonas mobilis* qui compte 424 aa [81]. Alors que, plusieurs systèmes sont restreints à transporter des polypeptides de maximum 100 aa à cause de la toxicité engendrée ou à cause de contraintes structurales [91-93]. Un autre avantage des ATs est la possibilité de fusionner la protéine d'intérêt en N-terminal. Tandis que, certaines protéines transporteuses telles que les flagellines (protéine majoritaire des flagelles) et les pilin (protéine majoritaire des fimbriae), nécessitent que leurs extrémités N- et C-terminales soient libres afin d'interagir correctement avec d'autres protéines participant à leur export (58). Similairement, certaines protéines intégrales de la ME utilisées comme protéine transporteuse ont leurs extrémités N- et C- terminales localisées dans le périplasme [92]. Dans ce cas, la stratégie a pour but d'insérer les protéines d'intérêts dans des boucles permissives de ces protéines transporteuses. Cependant, ces boucles doivent avoir été identifiées et caractérisées, ce qui nécessite beaucoup de temps. De plus, les polypeptides hétérologues insérés dans ces boucles doivent avoir leurs extrémités N et C terminales rapprochées afin de ne pas perturber les boucles. La possibilité d'une fusion en N-terminal semble donc plus intéressante. D'autres protéines, comme par exemple l'intimine, une protéine de ME de *E. coli* permettant une fusion en C-terminal, ont aussi été utilisées avec succès [66].

Les ATs permettent aussi d'exprimer des protéines d'intérêts à des taux d'expression et d'activité élevés et ce avec peu de toxicité. Cependant, lorsque les protéines d'intérêts sont des enzymes, il

peut y avoir une certaine perte d'activité, due à la surface complexe des bactéries. Par exemple, les lipopolysaccharides (LPS) peuvent empêcher l'enzyme d'être accessible au substrat ou imposer des contraintes structurales réduisant l'activité [67]. Une astuce afin de résoudre ce problème consiste à fusionner la protéine d'intérêt au domaine passager original de l'AT comme ce fut le cas pour l'adhésine FimH fusionnée à un AT de *E. coli*, l'antigène 43 [94]. La présence du domaine passager dans la fusion pourrait agir comme un lien éloignant la protéine d'intérêt de la surface bactérienne [7-9,94,95].

Finalement, les ATs sont très versatiles et retrouvés chez toutes les bactéries à Gram négatif permettant à une même fusion d'être aisément exprimée dans différentes espèces. Ces transferts de souches sont probablement possibles car les UT sont très conservées.

Grâce à tous ces aspects, les ATs semblent particulièrement bien appropriés pour le "surface display". Cependant, les récents progrès dans le domaine des ATs nous obligent à considérer plusieurs détails qui sont importants pour l'efficacité du système. En effet, comme mentionné ci-dessus, la nature et la taille de la protéine doivent être examinées avec attention. Par exemple, il est important de s'assurer que si la protéine contient des cystéines permettant la formation de ponts disulfures, sa translocation soit possible puisqu'il a été démontré que dans certains cas, la translocation était affectée par la formation de ces ponts [7,9,16]. L'idéal serait d'opter pour une protéine ne contenant pas de cystéine. Cependant, si cela n'est pas faisable, il est possible de prévenir la formation des ponts disulfures, par exemple en ajoutant du β -mercaptoéthanol au milieu de culture ou en utilisant une souche mutante pour la protéine DsbA [8,9,12,16,95,96]. Dans tous les cas, il est important de s'assurer que la protéine exposée à la surface soit encore active. Ensuite, le choix de la séquence signal à utiliser ainsi que la présence du domaine autochaperone [9,41,51,96] sont des facteurs importants à considérer puisqu'ils ont un impact sur l'efficacité de translocation. Finalement, la provenance de l'UT ainsi que le choix de la souche à utiliser sont aussi importants puisqu'ils vont influencer le devenir de la protéine c'est-à-dire si elle restera attachée ou non à la ME de la bactérie.

Les ATs représentent de très bons outils de "surface display" bactérien. Les facteurs à considérer afin d'utiliser les ATs à leur plein potentiel ne doivent pas être vus comme des désavantages mais plutôt comme des possibilités. Plus le mécanisme des ATs sera compris, plus ils seront de bons outils adaptés à ce genre d'application.

Troisième partie: Transport et insertion des protéines de la membrane externe

3.1 Protéines de la ME

Les protéines de ME (PME) sont des protéines intégrales de la membrane des bactéries à Gram négatif. Toutes les PME ont une structure de base en tonneau β avec un nombre variable de brins β connectés par de petits tours ou de grandes boucles selon qu'ils soient du côté périplasmique ou extracellulaire. Selon une estimation, il semblerait que 2 à 3% des gènes de *E. coli* codent pour des PME [97]. Comme ces PME sont très importantes autant par leur quantité que par leur fonction, il est logique de penser qu'il existe pour ces protéines un système efficace de transport à travers le périplasme et d'insertion dans la ME. Les PME suivent le même chemin que les protéines périplasmiques ainsi que les protéines sécrétées. Elles sont tout d'abord sécrétées à travers la MI soit par le système SRP, soit par SecA/SecB [98]. SRP lie les protéines co-translationnellement et les apportent ensuite au récepteur membranaire FtsY. La majorité des protéines qui passent par le système SRP sont des protéines de la MI et cela dépend principalement de l'hydrophobicité de leur séquence signal [99]. Dans la voie SecA/SecB, SecB lie les polypeptides post-traductionnellement et les amènent à SecA [100]. La participation de SecA au système SRP n'a pas encore été établie [101]. Dans les deux cas, les polypeptides sont ensuite dirigés vers le translocon de la MI SecYEG [100].

Les étapes de transport et de « protection » périplasmique ainsi que l'étape d'insertion dans la ME sont beaucoup moins claires. Il est d'usage courant de dire qu'elles sont spontanées. Cependant, pour plusieurs raisons, il doit y avoir d'autres protéines impliquées dans ces étapes : (i) les PME, qui se retrouveraient sans protection dans le périplasme, se replieraient prématurément ou s'agrégeraient vu leur grande hydrophobicité, (ii) les PME doivent traverser le périplasme dans une conformation compatible avec leur insertion dans la bicouche lipidique, (iii) certaines PME possèdent de longues boucles localisées dans le milieu extracellulaire dont le transport à travers la ME est énergiquement défavorable, (iv) et finalement, le temps de repliement et d'insertion de protéines dans des membranes *in vitro* est beaucoup trop long et donc incompatible avec le temps de croissance des bactéries [97].

Plusieurs protéines périplasmiques ou de ME pourraient avoir un rôle dans la biogenèse de ces PME. Ces facteurs, pouvant agir de différentes manières, sont des chaperones moléculaires, des catalyseurs de repliement ainsi que des protéases.

3.1.1 Protéines périplasmiques participant à la biogenèse des PME

Bien que toute l'information nécessaire pour qu'une protéine adopte sa structure native soit contenu dans la séquence en aa, *in vivo* ce processus nécessite l'intervention de différentes protéines, telles que des catalyseurs de repliement, des chaperones ainsi que des protéases.

Les catalyseurs de repliement catalysent les étapes limitantes du repliement. Il existe deux types de catalyseurs de repliement. Le premier regroupe les protéines Dsb pour disulphide bond formation. La protéine périplasmique DsbA oxyde les cystéines présentes dans les protéines pour qu'elles puissent former un pont disulfure. La protéine de MI DsbB permet la réoxydation de DsbA qui peut ensuite aller oxyder d'autres cystéines. Les électrons que DsbB prend à DsbA afin de la réoxyder sont ensuite dirigés vers la chaîne respiratoire d'électrons. Dans toutes les protéines contenant plus de deux cystéines, il existe une possibilité que les ponts disulfures soient mal formés. Ainsi, deux autres protéines, DsbC et DsbG permettent la bonne formation des ponts tandis que DsbD a sensiblement le même rôle pour DsbC et G que DsbB pour DsbA [102]. Toutes ces protéines sont nécessaires à la formation des ponts disulfures dans le périplasma puisque c'est un environnement oxydant et qu'il n'y a pas d'énergie disponible. La plupart des PME ne possèdent cependant pas de pont disulfure.

Le deuxième type de protéines regroupe les peptidyl-prolyl isomérases (PPIase) qui catalysent l'isomérisation *cis-trans* de la liaison peptidique impliquant des prolines [103]. Il existe trois familles de PPIases dans le périplasma qui sont classées soit par rapport aux drogues immunosuppressives auxquelles elles sont sensibles, soit par l'homologie qu'elles partagent avec d'autres PPIases. Les protéines suivantes représentent les différentes familles: PpiA (classe des cyclophiline), FkpA (classe des FKPB) et PpiD ainsi que SurA (classe des parvulines) (27). À l'exception de SurA, les PPIases ne semblent pas essentielles à la viabilité des bactéries ou ont des fonctions redondantes.

Les chaperones périplasmiques stabilisent la structure de protéines non natives et participent au repliement alors que les protéases dégradent les protéines qui se sont mal repliées. Les chaperones, ainsi que les protéases périplasmiques doivent être mécaniquement différentes de leurs équivalentes cytoplasmiques puisqu'il n'y a pas d'ATP dans le périplasma [103]. La seule chaperone générale connue étant reliée aux PME est appelée Skp pour Seventeen Kilodalton Protein [97]. Cette protéine reconnaît spécifiquement les PME et est impliquée dans les premières étapes de leur repliement [104]. Cependant, Skp n'est pas essentielle à la survie des bactéries et son absence résulte en une diminution modérée de la quantité de protéines correctement repliées. Quatre autres protéines périplasmiques ont des activités de chaperone soit SurA, FkpA, DegP et DsbG. Il est intéressant de noter que ces quatre protéines ont également d'autres fonctions dans le périplasma (27).

Par exemple, DegP agit comme une chaperone [105] mais représente aussi la machinerie protéolytique la plus importante et est responsable du contrôle de la qualité du repliement périplasmique [103]. L'activité de DegP varie selon la température de l'activité chaperone à celle de protéase [105]. En effet, lorsque la température est inférieure à 28°C, DegP agit comme chaperone pour "protéger" les protéines mal repliées afin d'éviter qu'elles soient dirigées vers une agrégation irréversible tandis qu'à une température supérieure à 28°C son activité protéolytique augmente. DegP est essentielle pour la bactérie lorsque les températures sont supérieures à 40°C.

La transcription de toutes les protéines dépend de l'association d'un facteur σ avec l'ARN polymérase permettant de diriger la reconnaissance spécifique de l'holoenzyme à un promoteur. Le facteur σ^{70} contrôle la transcription de la plupart des gènes, c'est le facteur σ général. Les autres facteurs σ sont des facteurs alternatifs qui permettent à la bactérie de s'adapter aux changements externes. Le facteur σ^{32} est essentiel lorsque la température est supérieure à 20°C et contrôle donc la régulation des "protéines de choc à la chaleur" (Hsps, heat shock proteins). Cependant, comme ce facteur σ est nécessaire à une température supérieure à 20°C, cela suggère que les protéines contrôlées par ce facteur sont aussi nécessaires dans des conditions normales de croissance (27). Plusieurs chaperones cytoplasmiques et protéases sont sous le contrôle du σ^{32} . Il existe un autre facteur σ alternatif, soit σ^E (σ^{24}), qui est activé principalement par un mauvais repliement des PME ou une surproduction des PME ainsi que par l'éthanol et la chaleur [106]. En effet, malgré la présence de protéines participant au repliement des PME, il est possible que

certaines PME soient mal repliées. Ceci peut se produire spontanément ou être dû à des mutations, des stress environnementaux ou à une surexpression de gènes recombinants (71). Dans ce cas, les protéines mal repliées sont soit dégradées soit agrégées et séquestrées dans des corps d'inclusion (CI). La production de la plupart des chaperones et des catalyseurs de repliement périplasmiques associés aux PME est régulée par des systèmes de réponse au stress soit par le système alternatif σ^E et/ou par le système Cpx (voir ci-dessous). Le facteur σ^E est inactif en conditions normales car il est fixé à la protéine de MI RseA (Figure 4). RseA inactive σ^E grâce à son extrémité N-terminale qui est localisée dans le cytoplasme. L'extrémité C-terminale de RseA est localisée dans le périplasma. Une autre protéine périplasmique, RseB interagit avec l'extrémité périplasmique de RseA et inactive indirectement σ^E . Le rôle de RseB consiste à protéger RseA qui, lorsqu'un stress se fait sentir, est rapidement dégradée. Cette dégradation est effectuée par deux protéases, DegS ainsi que YaeL [107]. DegS a un domaine senseur qui peut lier les PME mal repliées. Cette liaison active DegS, ce qui permet ensuite la dégradation de la partie périplasmique de RseA. Par la suite, la protéase YaeL dégrade la partie membranaire de RseA libérant ainsi le facteur σ^E qui peut s'associer avec l'ARN polymérase. Cette association permet de diriger la transcription de différents gènes permettant aux bactéries de se "défendre" contre les effets néfastes des stress [103]. Il existe chez *E. coli* un autre système de réponse au stress, le système à deux composantes Cpx (Figure 4). Ce système consiste en une histidine kinase, CpxA, et un régulateur de la réponse, CpxR. CpxA est une protéase de la MI ayant un domaine périplasmique agissant comme senseur du signal. Une fois le signal perçu, CpxA s'autophosphoryle en un résidu histidine conservé en utilisant l'ATP. Ensuite, CpxA transfère le phosphate sur un résidu aspartate conservé situé sur le domaine N-terminal de la protéine périplasmique CpxR. Une fois phosphorylé, le régulateur CpxR active la transcription de différents gènes. En conditions normales, la protéine CpxA serait maintenue dans une conformation inactive par la protéine périplasmique CpxP qui n'est pas située sur le même opéron que CpxAB. CpxP agit probablement en se liant au domaine "senseur" de CpxA. Le système Cpx est activé par des pH élevés, une composition en lipides anormale de la MI, l'EDTA ainsi que par une surproduction de protéines de l'enveloppe [106]. Le système Cpx, tout comme le système σ^E , permet aussi de contrôler la production des chaperones et des catalyseurs du repliement des PME. En effet, les deux systèmes peuvent s'entrecroiser notamment pour la production de DegP.

3.1.2 Protéines de la ME participant à la biogenèse des PME

Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont démontré l'importance des phospholipides ainsi que des LPS dans l'insertion et le repliement des PME [108-110]. La protéine de ME Omp85 (l'équivalent de YaeT chez *E. coli*) récemment découverte semblerait interagir avec les PME. Omp85 fonctionnerait comme un système général d'insertion des protéines dans la ME un peu comme le translocon SecYEG pour la MI [97]. Il a été démontré chez *N. meningitidis* qu'une mutation dans le gène codant pour Omp85 provoquerait l'accumulation des PME dans le périplasme sous une forme non-native, suggérant le rôle de Omp85 dans l'insertion des PME [57]. Des résultats identiques ont été obtenus chez *E. coli* avec la protéine YaeT.

Initialement, il avait été suggéré que YaeT (Omp85) pourrait être responsable de l'insertion des LPS dans la ME. Cependant, il a été démontré chez *E. coli* que la perte de YaeT n'entraînait pas l'accumulation de LPS, suggérant un rôle direct de YaeT avec les PME et non avec les LPS [97]. Un modèle concernant la structure de Omp85 a pu être proposé grâce à des alignements de séquences (11). Cette protéine serait composée de deux domaines, un domaine N-terminal soluble d'environ 54 kDa résidant dans le périplasme et un domaine d'environ 35 kDa formé intégralement d'un tonneau β à 12 brins inséré dans la ME. Le domaine N-terminal pourrait être impliqué dans la reconnaissance des précurseurs de PME périplasmiques grâce à des domaines appelés POTRA (polypeptide-transport-associated) qui sembleraient posséder des propriétés de chaperones et lier les PME matures [111]. Ainsi, le repliement des PME pourrait débuter alors qu'elles sont toujours accessibles aux chaperones périplasmiques. La translocation de PME dans la ME peut être envisagée de trois manières, selon que Omp85 soit monomérique ou multimérique. Dans le premier modèle, Omp85 serait multimérique et les PME seraient transportées du périplasme vers la ME par le pore d'un seul tonneau de Omp85. Ensuite, le tonneau s'ouvrirait pour libérer la protéine dans la ME. Dans le deuxième cas, le modèle est le même. Cependant, les PME seraient transportées par le pore formé par un multimère de Omp85. Finalement, dans un dernier modèle, plusieurs tonneaux β pourraient s'associer pour n'en former qu'un seul (même modèle que les ATs trimériques), formant un seul pore qui permettrait le transport et le relargage des PME [97].

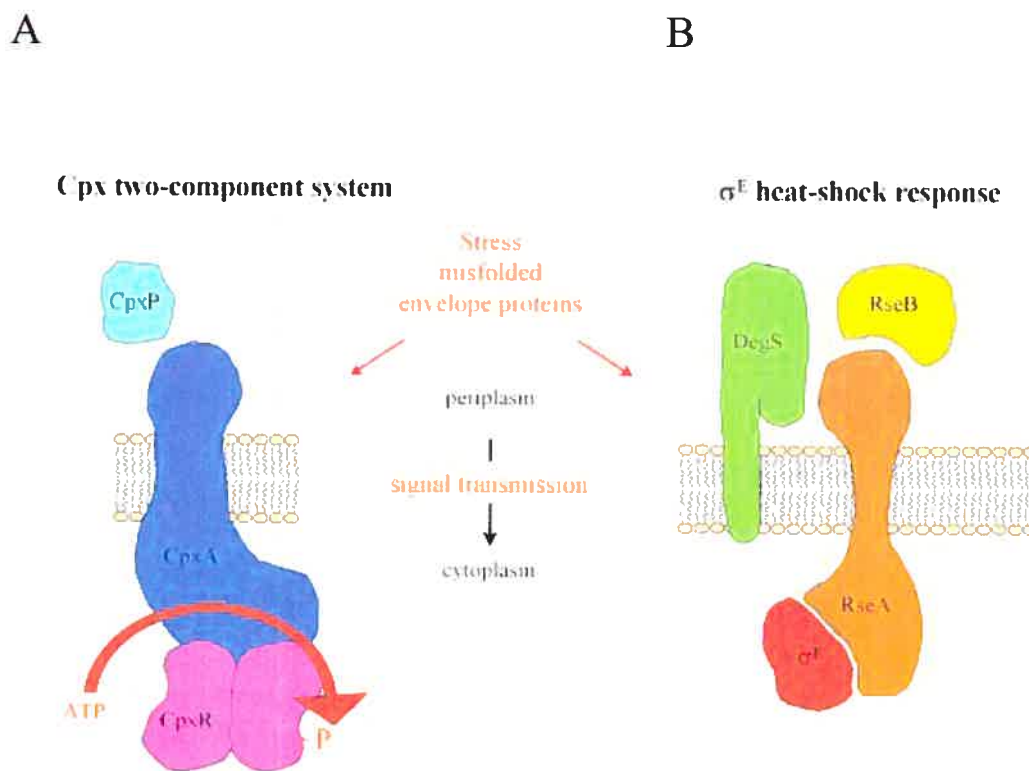


Figure 4: Deux systèmes de réponse au stress extracytoplasmique chez *E. coli*; le système Cpx et le système σ^E . (A) Le système Cpx est un système à deux composantes. Lorsqu'un stress se fait sentir, la protéine CpxP libère CpxA qui s'active et s'autophosphoryle pour ensuite phosphoryler CpxR à son tour. Une fois phosphorylée, CpxR permet la transcription de plusieurs gènes. (B) En conditions normales, RseB protège RseA qui inactive le facteur σ^E en s'y liant. Lorsqu'un stress est perçu, RseB libère RseA qui se fait rapidement dégradée permettant de libérer le facteur σ^E qui peut aller fixer l'ARN polymérase. Figure adaptée de Miot and Betton (2004).

Le rôle des phospholipides et des LPS dans la biogenèse des PME semble moins évident que celui de Omp85. Cependant, leur présence n'en est pas moins essentielle aux PME puisqu'ils représentent le milieu dans lequel les PME s'insèrent et atteignent leur état natif et leur fonctionnalité. Il a été suggéré que les LPS pourraient amener les PME vers la ME lorsqu'ils sont dirigés vers celle-ci. Cependant, comme les deux mécanismes semblent distincts, cette hypothèse reste à démontrer [97]. Il semble probable que l'interaction entre les PME et les LPS dans la ME

soit importante et possiblement que les LPS soient impliqués dans les dernières étapes de repliement des PME. Les LPS pourraient avoir un rôle d'échafaudage, permettant aux protéines d'acquérir leur structure tridimensionnelle. Les phospholipides agiraient aussi avec les PME mais une fois dans la ME et non dans le périplasma. Ils pourraient donc être impliqués dans les étapes tardives de repliement. Il est probable que ce soit les propriétés physiques de la ME qui déterminent le repliement plutôt qu'une association spécifique des lipides avec les PME dans le périplasma [97].

Quatrième partie: Généralités sur le système de transport du maltose et des maltodextrines

4.1 Système de transport du maltose et des maltodextrines

Le système permettant l'utilisation du maltose et des maltodextrines est composé de 10 protéines régularisées par la protéine MalT, qui est l'activateur principal du système [112]. Cinq gènes codent pour un système d'ABC transporteur incluant la protéine LamB, une porine spécifique de la ME appelée maltoporine. En effet, c'est une porine permettant le transport passif du maltose et la diffusion facilitée des maltodextrines. Le système code aussi pour MalE ou maltose binding protein (MBP), MalF, MalG et MalK.

MalE est une protéine périplasmique globulaire constituée d'une chaîne polypeptidique de 42 kDa. MalE est le récepteur soluble du maltose et des maltodextrines. MalE participe au transport à travers la MI mais concentre également les molécules avant de les apporter à la machinerie MalF, G et K. MalF et MalG sont des protéines de la MI formant les deux sous-unités d'une perméase tandis que deux copies de la protéine MalK se localisent du côté cytoplasmique et hydrolysent l'ATP nécessaire pour fournir l'énergie au système [112].

La position de MalE dans ce système en fait une protéine très intéressante puisqu'elle est essentielle pour les bactéries dans un milieu contenant comme seule source de carbone le maltose. De plus, les structures de MalE avec ou sans substrat sont disponibles [113]. La MBP consiste en deux domaines structuraux discontinus où l'interface correspond au site de fixation du substrat (Figure 5) [113]. La grande disponibilité de données sur MalE ainsi que la possibilité de purifier cette protéine en une seule étape, facilitent son étude. Conséquemment, MalE est très bien caractérisée et son étude a permis de découvrir des mutants intéressants.

4.2 MalE31, une protéine avec des cinétiques de repliement ralenties

En 1987, il a été montré que la protéine MalE possédait des sites permissifs, c'est-à-dire des sites qui permettent des insertions ou des délétions sans affecter la protéine [114]. Ces sites ont été découverts grâce à des insertions aléatoires d'oligonucléotides *Bam*HI (adaptateur oligonucléotidique possédant un site pour une endonucléase de restriction). Un des mutants, appelé MalE31, a été obtenu par une substitution de deux aa soit Gly³²→Asp et Ile³³→Pro [115].

La substitution en position 33 semble être majoritairement responsable du phénotype. En effet, la substitution en position 32 seulement donne un mutant ressemblant au phénotype sauvage (WT). Ces résidus sont localisés dans un tour connectant l'hélice αI au brin βB sur le premier élément $\beta\alpha\beta$ dans le domaine N-terminal (Figure 6) [115].

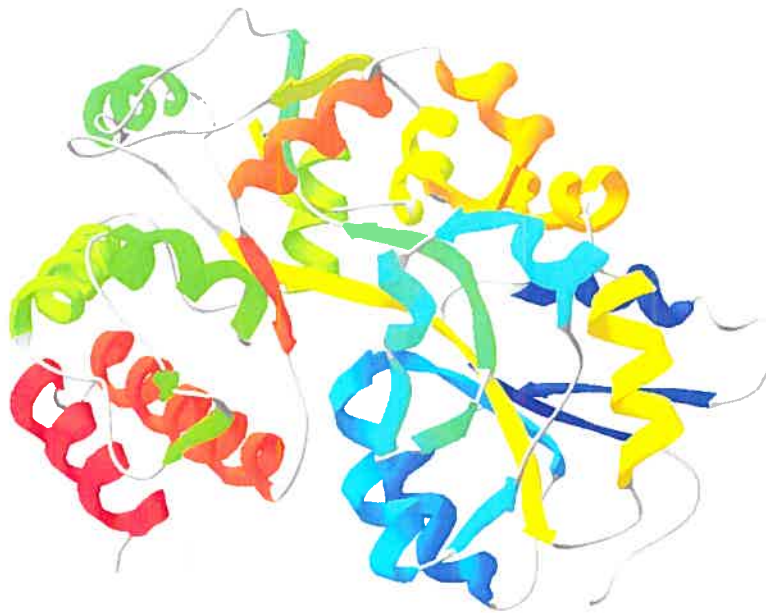


Figure 5: Structure cristallographique de la protéine MaleE d'Escherichia coli. (Code : 3MBP). L'extrémité N-terminale est en bleu et l'extrémité C-terminale en rouge. Les brins β (flèches) et les hélices α (spiraux) sont indiqués. Programme: SwissPDB viewer, version 3.7

Le mutant MaleE31 a été bien caractérisé et il a été déterminé que lors d'un fractionnement cellulaire, la protéine était localisée dans la fraction membranaire et non dans la fraction périplasmique. Afin de déterminer si la protéine restait bloquée dans la MI ou bien si elle était

retrouvée dans des CI, des gradients de sucrose, des études de stabilité de protéines marquées radioactivement ainsi que de la microscopie électronique ont été réalisés et ont démontré que la protéine mature MalE31 s'agrégeait dans le périplasma. La protéine localisée dans les CI a été solubilisée avec l'urée et renaturée en protéine mature démontrant une activité totale. Ainsi, il a été conclu que la mutation affectait le repliement périplasmique de la protéine mais n'affectait pas son action. Ces études de dénaturation-renaturation ont également permis de mieux connaître les cinétiques de repliement de MalE31 démontrant que le repliement de cette protéine est 25 fois plus lent que le repliement du WT [115]. Toutes ces données sur le mutant MalE31 en font un bon modèle pour étudier le repliement dans le périplasma.

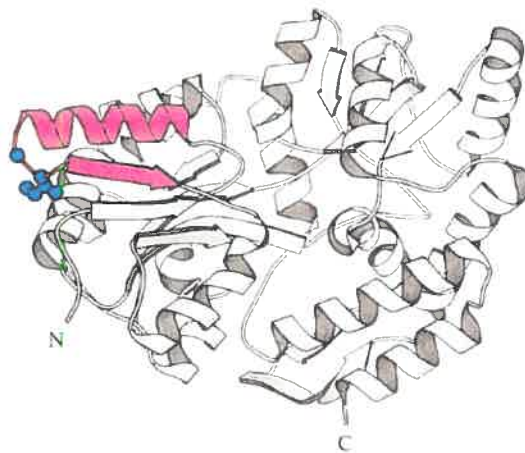


Figure 6: Structure de MalE31. Structure cristallographique de MalE avec les mutations correspondant à MalE31 en mauve et les résidus affectés en bleu. Figure adaptée de Betton et al. (1996).

4.3 MalE133 et MalE303: des protéines séparées en fragments complémentaires

La même approche de mutagenèse aléatoire que celle utilisée pour MalE31 a été utilisée pour obtenir ces mutants. Les insertions d'oligonucléotides contenant le site de reconnaissance de l'enzyme de restriction *Bam*HI dans le gène de *malE* étaient presque toutes accompagnées de délétions d'environ cinq à six aa [116]. Ces modifications dans la séquence codante pour MalE avec ou sans délétion sont appelées des "insertions-délétions". Presque toutes les "insertions-délétions" sont localisées dans des éléments de structure secondaire en surface de la protéine et donc dans des régions de la protéine sans grande importance dans le repliement, la stabilité ou la fonction [52].

Ces insertions d'oligonucléotides permettent l'insertion de séquences étrangères dans le gène. Ainsi, ces insertions ont été utilisées afin de séparer la protéine en deux fragments et d'étudier le repliement de la protéine. Un codon stop, un site de liaison au ribosome, un site d'initiation de la transcription, un promoteur et une séquence signal ont ainsi été insérés afin de générer deux fragments complémentaires. Deux des sites permissifs ont été identifiés en position 133 et 303 et dans les deux cas, des fragments complémentaires sont capables de se réassocier dans le périplasme afin de reformer une protéine fonctionnelle [116]. Cette approche a aussi été utilisée afin d'étudier le repliement et l'insertion des PME [117-119].

ARTICLES

Article :

The periplasmic folding of a cysteineless autotransporter
passenger domain interferes with its outer membrane
translocation

(Journal of Bacteriology 2006, 188: 4111-4116)

En tant que première auteure, j'ai réalisé la majorité des expérimentations et de la rédaction

The periplasmic folding of a cysteineless autotransporter passenger domain interferes with its outer membrane translocation

Nancy Rutherford¹, Marie-Ève Charbonneau¹, Frédéric Berthiaume¹, Jean-Michel Betton²,
Michael Mourez^{1,*}

¹Canada Research Chair on Bacterial Animal Diseases, Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, J2S 7C6, Quebec, Canada

²CNRS URA 2185, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

*For correspondence. Tel. (+1) 450 773 8521 ext 8430; Fax (+1) 450 778 8108; Email

████████████████████

Running title: Folding and translocation by autotransporters

Abstract

Autotransporters are single polypeptides consisting of an outer membrane translocation domain mediating the translocation of a passenger domain. The periplasmic folding state of the passenger domain is controversial. By comparing passenger domains differing in their folding properties, our results suggest that periplasmic folding of passenger domains interferes with translocation.

Various secretion systems allow Gram-negative bacterial pathogens to secrete proteins across the outer membrane (8). One of these systems, the autotransporter pathway stands out by its apparent simplicity (6, 7, 9, 10). A typical autotransporter, such as AIDA-I, the *Escherichia coli* adhesin involved in diffuse adherence (1), has a characteristic modular organization (Fig. 1): (i) an N-terminal *sec*-dependent signal sequence; (ii) a central domain bearing the functional part of the autotransporter; (iii) a 100 aminoacids long region called the autochaperone region; (iv) a linker region predicted to form an α helix and (v) a 300 aminoacids long C-terminal region predicted to form a β barrel in the outer membrane. The structure of the two latter domains has been solved for the autotransporter NalP from *Neisseria meningitidis*, confirming the predictions (22). This structure constitutes the Translocation Unit (TU) of the autotransporter. The mechanism of translocation is still poorly understood and remains the subject of various hypotheses (12, 22, 31). In all hypotheses, the TU is thought to insert itself in the outer membrane and mediate the translocation of the rest of the autotransporter, hence called the passenger domain (17). Furthermore, although not absolutely necessary for translocation, the autochaperone region was shown to increase the efficiency of translocation (19-21, 33).

One central question pertains to the folding state of the passenger domain while in transit in the periplasm. Remarkably, autotransporters can mediate the translocation of heterologous polypeptides replacing part of their original passenger domains (15, 16). Using such heterologous passenger domains containing cysteines, it was observed that the formation of disulfide bridges interfered with their translocation (11-13, 28). The authors of these studies therefore argued that there is a “translocation competent” unfolded state that the passenger domains must adopt in order to be translocated. Other investigators, however,

have seen no effect of preventing disulfide bond formation on the export of heterologous passenger domains containing cysteines (5, 14, 15), and some showed that passenger domains can be disulfide-bonded in the periplasm and still be translocated (25, 30, 31).

All these studies were performed by using heterologous passenger domains containing cysteines and assessing the effect of preventing disulfide bond formation, either through modification of the protein (using mutants without cysteine) or its environment (using either reducing agents or a *dsbA* mutant strain). Unfortunately, the latter can have poorly controlled global effects. Moreover, the presence or absence of disulfide bonds cannot always correlate with the presence or absence of secondary or tertiary structures between cysteines (35). Since translocated substrates can be in transient intermediary states, this is peculiarly troublesome in the study of secretion. It has been, for instance, reported that the precursor of OmpA can be translocated through the *sec* general secretion machinery even with a disulfide bond (29), although it is accepted that the *sec* machinery exports unfolded polypeptides.

We therefore wanted to address the effect of periplasmic folding of passenger domains of autotransporter on their translocation with a new approach that did not rely on manipulating the oxidation state of disulfide bonds as a surrogate indicator of folding. We decided instead to compare the translocation efficiency of cysteineless passenger domains carefully characterized and known to differ solely in their folding abilities.

MalE can be translocated by AIDA_c to the bacterial surface.

To study the translocation mediated by AIDA-I, we decided to fuse the periplasmic maltose binding protein (MalE) to the TU and autochaperone domain of AIDA-I, a polypeptide called AIDA_c (27). The DNA fragment coding for AIDA_c was amplified by PCR from the

genomic DNA of the *E. coli* strain 2787 (1), with primers bearing recognition sites for the restriction enzymes *SacI* and *XbaI*. This fragment was cloned in the commercial pMalp2x vector expressing a MalE-LacZ α fusion under the control of the IPTG-inducible *ptac* promoter (New England Biolabs). The resulting pMalEAIDAc vector encodes a fusion of MalE (42kDa) to AIDAc (48 kDa), a protein we called Male β (Fig. 1). As a control MalE-expressing plasmid, we constructed plasmid pMalE Δ lac by cleaving pMalp2x with *EcoRI*, filling-in with the Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase, and religation. This results in the expression of MalE with a C-terminal extension of 25 aminoacids, a protein we designated Male* (Fig. 1). As a negative control, the empty plasmid pTrc99A (Amersham biosciences) was used. All plasmids were transformed in ED9, an *E. coli* strain bearing a non polar deletion of the *malE* gene (*araD*, Δ *lacU169*, *rpsL*, *relA*, *flbB*, *deoC*, *ptsF*, Δ *malE444*). Bacteria harboring the different plasmids were grown on LB agar plates or in LB broth containing 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of ampicillin. The bacteria in broth were grown with agitation at 30° until OD_{600nm} reached 0.4 and induced with 10 μM IPTG for 3 hours to minimize a potential toxicity due to overproduction of a membrane protein.

In order to assess the translocation of MalE fused to AIDAc, we first tested if MalE could be accessible to externally added antibodies. Bacteria were grown as described above and fixed at an OD_{600nm} of 1 in 13 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 10% (w/v) paraformaldehyde and 0.08% (w/v) glutaraldehyde. Fixed bacteria were pelleted, washed 3 times with PBS, resuspended in 50 mM glucose, 10 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, and immobilized on microscope slides coated with poly L-lysine (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, Sigma). The slides were then blocked with PBS containing 2% Bovine Serum Albumin (BSA). MalE at the bacterial surface was visualized by incubation with rabbit polyclonal anti-MalE

antibodies (New England Biolabs) diluted 1/1,000th in PBS-2% BSA, followed by incubation with a goat anti-rabbit IgG rhodamine red conjugate (Molecular Probes). The slides were washed with PBS and examined with a microscope under phase contrast and epifluorescence.

As seen in Fig. 2A, whereas no signal could be seen with bacteria expressing Male*, bacteria expressing the Male β fusion show a fluorescence signal located around the bacterial cells. It should be noted, however, that many bacteria had only a very weak signal, suggesting that translocation of Male was significant but not complete.

We also subjected whole bacterial cells to limited trypsin proteolysis. Bacteria, grown as described above, were harvested by centrifugation, washed and resuspended in 1 mL of PBS. Trypsin (0.1 mg.mL⁻¹ final concentration) or PBS was added to the samples which were incubated for 30 minutes on ice. The protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 1 mM final concentration) was added to stop the reaction and the samples were boiled for 5 minutes with an equal volume of twice concentrated SDS-PAGE sample buffer in the presence of β -mercaptoethanol. The samples were then processed for electrophoresis and immunoblotting using polyclonal anti-Male antibodies.

Fig. 3A shows that the 90 kDa band corresponding to the Male β fusion protein band disappeared upon treatment with trypsin, suggesting that the Male polypeptide is accessible to externally added proteases when fused to AIDAc. As expected, the control protein Male*, expressed by bacteria bearing pMale Δ lac, was not affected. Accessibility of Male in intact bacteria to both antibodies and proteases therefore strongly suggest that Male is translocated to the bacterial cell surface when fused to AIDAc.

Some MaleE is found in the periplasm, cleaved from the MaleE-AIDAc fusion.

We were surprised, however, to notice a polypeptide of approximately 42 kDa reacting with the anti-MaleE antibodies in bacteria expressing MaleE β (Fig. 3A). We hypothesized that this polypeptide could be some MaleE, released in the periplasm by a proteolytic cleavage occurring between MaleE and AIDAc. Consistent with this hypothesis, the 42 kDa band was unaffected by trypsin, suggesting that it is not translocated to the bacterial surface.

To confirm this localization, we performed a cellular fractionation of bacteria expressing MaleE β or MaleE*. Bacteria were grown as described above and normalized cultures of induced cells, in 10 mL cultures, were harvested. Supernatants were collected, filtered through a 0.2 μ m filter, centrifuged at 156,000 g for one hour and then precipitated with 10% trichloroacetic acid. The harvested bacteria were resuspended in 800 μ L of 10 mM Tris-HCl, pH 8, 0.75 mM sucrose and 100 μ L of 4 mg.mL⁻¹ lysozyme in 100 mM EDTA, pH 8, was added. After 30 minutes on ice, the bacteria were centrifuged at 13,200g for 20 minutes and the supernatants collected as the periplasm. The pellets were resuspended in 800 μ L of Tris Buffer Saline (TBS; 50 mM Tris-HCl, pH8, 150 mM NaCl) containing a protease inhibitor cocktail (Complete Mini, Roche). The bacteria were lysed by sonication and the lysates were centrifuged for one hour at 156,000g to pellet insoluble material, while the supernatants correspond to the cytoplasmic fractions. The pellets were resuspended in 800 μ L of TBS containing 1% Triton X-100 and 10 mM MgCl₂ to solubilize the inner membrane. After 30 minutes of incubation on ice, the samples were centrifuged again for one hour at 156,000g. The pellets, corresponding to the outer membrane, were resuspended in TBS. Amounts of the fractions equivalent to the same volume of unfractionated

bacterial culture were then separated by SDS-PAGE and revealed by immunoblotting with anti-MalE antibodies.

This fractionation confirmed that, in bacteria expressing MalE β , the 42 kDa band was recovered in the periplasmic fraction (Fig. 4A). The 42 kDa periplasmic band could be a degradation product bearing an incomplete MalE polypeptide. We reasoned that if full length MalE was released in the periplasm, bacteria expressing MalE β should be able to complement the *malE* mutation of ED9. Indeed, when bacteria expressing MalE β were grown for 48 h at 37°C on MacConkey plates containing 2% maltose (w/v), 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ampicillin and 10 μM IPTG, it was clear that the bacteria were able to utilize maltose (Fig. 4B). Overall, these experiments therefore suggest that some MalE is cleaved from the MalE-AIDAc fusion and accumulates in the periplasm as a fragment we designated MalE'. The fractionation also reveals a band of the size of MalE in the culture supernatant of bacteria expressing MalE β . The passenger domain of AIDA-I is normally cleaved from AIDAc after translocation and remains non-covalently attached to the outer membrane (27). This result thus suggests that MalE is translocated by AIDAc. For unknown reasons, however, the cleavage is less efficient with the MalE-AIDAc fusion and the released MalE does not remain non-covalently linked to the outer membrane. Lastly, the cytoplasmic fractions of bacteria expressing MalE* or MalE β reveal bands of the size of MalE* or MalE' and MalE β , respectively. These bands are either cytoplasmic precursors of the exported polypeptides or periplasmic contaminants released during lysis because the periplasmic extraction was incomplete.

Translocation of a MalE mutant which is defective for its folding ability

We hypothesized that the appearance of MalE' could be due to the fact that periplasmic folding of MalE interferes with its translocation by AIDA_c. To test this hypothesis, we used MalE31, a previously characterized mutant of MalE with a folding defect (2). MalE31 bears two aminoacids substitutions: Gly → Asp and Ile → Pro at positions 32 and 33 of the mature protein, respectively. It was shown that the *malE31* mutation decreases the *in vitro* refolding rate of MalE by more than 25-fold and that, when overproduced, this protein variant is degraded and forms inclusion bodies in the periplasm of *E. coli* (2-4). However, MalE31 can be completely refolded to a wild-type structure when purified and refolded *in vitro* (24). Thus the mutation only influences the intrinsic folding ability of MalE.

The mutations resulting in MalE31 were introduced by site-directed mutagenesis in the pMalEAIDA_c and pMalEΔlac plasmids using the QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). We showed by immunofluorescence that fixed whole bacterial cells expressing MalE31β could be labelled with anti-MalE antibodies, whereas bacteria expressing MalE31* were not, similarly to what was observed with wild-type MalE (Fig. 2B). This suggested that MalE31 fused to AIDA_c escaped degradation and aggregation in the periplasm, and was translocated to the bacterial surface. We also showed that MalE31 was accessible to externally added proteins by performing a limited trypsin proteolysis on whole cells (Fig. 3B). Fig. 3B further shows that, contrarily to what was seen with MalEβ, no band of 42 kDa could be seen in bacteria expressing MalE31β. Since a protein fragment containing MalE31 did not readily accumulate in the periplasm, our experiments suggest that MalE31 was fully translocated when fused to AIDA_c, contrarily to what was observed with wild-type MalE. Consistent with this hypothesis, it

should be noted that more of the bacteria expressing MalE31 β could be labelled by the anti-MalE antibodies in comparison to bacteria expressing MalE β (compare Figs. 2A and 2B). Overall these results suggest that translocation of MalE31 by AIDA_c was more complete than that of MalE and therefore that the folding of wild-type MalE interfered with its translocation.

One could argue that the comparison of the folding kinetics of MalE and MalE31 is no longer valid when they are fused to AIDA_c. To address this issue, we used plasmids allowing the expression of the alkaline phosphatase (PhoA) fused to the C terminus of MalE or MalE31, respectively (J.M. Betton, manuscript in preparation). The resulting chimeras were soluble or aggregated, respectively (Fig. 5), and the fate of MalE and its mutant had little influence on that of its fusion partner, since PhoA was observed to be active in both cases (J.M. Betton, manuscript in preparation). This shows that the folding of the fusion partners are unaffected by one another.

It could also be argued that the cleavage of MalE' is unrelated to the translocation event directed by AIDA_c. Again we find this is unlikely, since there is no more cleavage between MalE and PhoA than between MalE31 and PhoA (Fig. 5).

We therefore conclude that the cleavage occurring between MalE and AIDA_c in the MalE-AIDA_c fusion is most likely due to the periplasmic folding of MalE interfering with the translocation mediated by AIDA_c

Our results do not preclude that some kind of folding is tolerated by autotransporters, or even that some folding might be necessary for translocation. They strictly indicate that the nature or the result of the folding of MalE is incompatible with transport. The simplest explanation for this interference is that the size of the folded polypeptide blocks the

translocation conduit of the autotransporter. It has been proposed that this conduit is either a pore of 20 Å diameter, formed upon oligomerization of multiple copies of a TU (32), or the lumen of the β barrel of a single TU, with a diameter around 10 Å (18, 22, 25). Folded MalE is an ellipsoid of 30x40x65 Å (26), a size that is indeed incompatible with the dimensions of these channels. In that case, our experiments suggest that native passenger domains have to remain partially unfolded in order to get translocated through these narrow channels. This interpretation might be too simplistic and the nature of the folding of MalE could also be an issue. As pointed out by others (22, 25), the view that the TU is solely responsible for translocation should be revised in light of the recent discovery of an extracytoplasmic machinery centered around Omp85 and involved in the insertion of proteins into the outer membrane, including autotransporters (23, 34, 36). The folding of MalE might cause it to be rejected by the Omp85 machinery and actively sorted to the periplasm. Furthermore, because autotransporters have been shown to be able to display heterologous polypeptides, we assume that passenger domains have no role in their own translocation. Yet we know that intramolecular interactions, such as the one mediated by the autochaperone region are important for translocation. The folding of MalE could alter these critical interactions and thus interfere with translocation.

In conclusion, our results show, by a new approach, that periplasmic folding can interfere with translocation by autotransporters. This suggests that, in order to be translocated, native autotransporter passenger domains have to remain at least partially unfolded, or that they transiently interact in a specific way with their own translocation domain or an external translocation apparatus. More work is required to sort between these hypotheses.

We are greatly indebted to John M. Fairbrother and Elie Dassa for the generous gifts of strains 2787 and ED9. We thank Mario Jacques for his comments on the manuscript. This work was supported by grants from the GREMIP, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (discovery grant 262746), and from the Canada Research Chair and the Canada Foundation for Innovation (project 201414).

Figure legends

FIG. 1: Organization of AIDA-I and of the MaleE-AIDA α fusion

The organization of AIDA-I is represented by showing its signal sequence (SS) in white, the adhesin central domain in light grey and AIDA α in dark grey. AIDA α has 3 subdomains: autochaperone, α -helix (hatched box) and β -barrel. The organization of the chimeric protein MaleE β is represented by showing MaleE signal sequence (SS) in white, the mature portion of MaleE (MaleE) in light grey, and AIDA α in dark grey. The boxes are not shown at scale. The aminoacids of the chimeric protein are indicated at the junction of the different regions. The control protein, MaleE*, is also represented, with the C-terminal extension generated by the procedure used to make the construct.

FIG. 2: Detection of MaleE fused to AIDA α on the surface of whole bacteria

A. ED9 bearing plasmids pMaleE Δ lac (MaleE*) or pMaleEAIDA α (MaleE β), was grown at 30°C until an OD_{600nm} of 0.4 and then induced with 10 μ M IPTG for 3 hours at 30°C. The cultures were then normalized at equal OD_{600nm}. The bacteria were fixed on glass slides and labelled with a rabbit antiserum raised against MaleE. Goat anti-rabbit serum conjugated to rhodamine-red was used as secondary antibodies and the slides were mounted for examination using a phase contrast microscope equipped with epifluorescence and UV excitation modules. The epifluorescence and corresponding phase-contrast fields are shown in the lower and upper images, respectively.

B. ED9 bearing plasmids pMaleE Δ lac with the MaleE31 mutation (MaleE31*) or pMaleEAIDA α with the MaleE31 mutation (MaleE31 β) were grown, fixed, labelled with anti-MaleE antibodies and processed as in A.

FIG. 3: Extracellular protease accessibility of Male fused to AIDAc

A. ED9 bearing plasmids pTrc99A (-), pMale Δ lac (Male*) or pMaleAIDAc (Male β) were grown as described in Fig.2. The bacteria were pelleted and resuspended in PBS in the presence or absence of trypsin (0.1 mg.mL^{-1}). After 30 minutes of incubation on ice, the trypsin was neutralized by addition of PMSF. The samples were then mixed with loading buffer, separated by SDS-PAGE and Male revealed by immunoblotting using a rabbit antiserum against Male. Male' represents a Male-containing fragment resulting from cleavage of Male-AIDAc.

B. ED9 bearing plasmids pMale Δ lac with the Male31 mutation (Male31*) or pMaleAIDAc with the Male31 mutation (Male31 β) were grown, treated and processed as in A.

FIG. 4: Release of a Male-containing fragment in the periplasm of bacteria expressing a Male-AIDAc fusion

A. ED9 bearing plasmids pTrc99A (-), pMale Δ lac (Male*) or pMaleAIDAc (Male β) were grown as described in Fig. 2. A subcellular fractionation was performed as described in the text and the following fractions were collected: culture supernatant (S), cytoplasm (CYT), periplasm (PER), inner membrane (IM) and outer membrane (OM). Total extracts of whole cells (WC) were obtained from an aliquot of the cultures taken prior to the fractionation procedure. Comparable amounts of the samples were separated by SDS-PAGE and Male was revealed by immunoblotting using a rabbit antiserum against Male.

B. ED9 bacteria, bearing plasmids pTrc99A (-), pMalE Δ lac (MalE*) or pMalEAIDAc (MalE β), were grown overnight at 30°C. The overnight cultures were normalized and spotted on MacConkey agar plates containing 2% maltose. The plates were incubated at 37°C for 48 hours. We ascertained that the presence of maltose did not affect translocation of MalE by AIDAc (data not shown) and therefore we interpret the results as being representative of the situation of bacteria grown in LB.

FIG. 5: Fusion of the alkaline phosphatase PhoA has no effect on the cellular localization of MalE or MalE31.

ED9 bearing an empty control plasmid pTrc99A (-), or plasmid allowing expression of a MalE-PhoA fusion (MalEphoA) or a MalE31-PhoA fusion (MalE31phoA), were grown as described in Fig. 2. The cultures were then normalized at equal OD_{600nm}. Whole cells (WC) and periplasmic fractions (P) were obtained as described in Fig. 4. Aggregate fractions (A) were obtained by osmotic lysis of spheroplasts and extraction of the insoluble fractions of the lysates with 6 M urea. Samples of these fractions were resolved by SDS-PAGE and proteins revealed by immunoblotting using a rabbit antiserum against MalE.

References

1. **Benz, I., and M. A. Schmidt.** 1989. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **57**:1506-11.
2. **Betton, J., and M. Hofnung.** 1996. Folding of a mutant maltose-binding protein of *Escherichia coli* which forms inclusion bodies. *J Biol Chem* **271**:8046-52.
3. **Betton, J. M., D. Boscus, D. Missiakas, S. Raina, and M. Hofnung.** 1996. Probing the structural role of an alpha beta loop of maltose-binding protein by mutagenesis: heat-shock induction by loop variants of the maltose-binding protein that form periplasmic inclusion bodies. *J Mol Biol* **262**:140-50.
4. **Betton, J. M., N. Sassoon, M. Hofnung, and M. Laurent.** 1998. Degradation versus aggregation of misfolded maltose-binding protein in the periplasm of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **273**:8897-902.
5. **Brandon, L. D., and M. B. Goldberg.** 2001. Periplasmic transit and disulfide bond formation of the autotransported *Shigella* protein IcsA. *J Bacteriol* **183**:951-8.
6. **Cotter, S. E., N. K. Surana, and J. W. St Geme, 3rd.** 2005. Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. *Trends Microbiol* **13**:199-205.
7. **Desvaux, M., N. J. Parham, and I. R. Henderson.** 2004. The autotransporter secretion system. *Res Microbiol* **155**:53-60.
8. **Henderson, I. R., and J. P. Nataro.** 2001. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* **69**:1231-43.

9. **Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, M. Desvaux, R. C. Fernandez, and D. Ala'Aldeen.** 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:692-744.
10. **Jacob-Dubuisson, F., R. Fernandez, and L. Coutte.** 2004. Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochim Biophys Acta* **1694**:235-57.
11. **Jose, J., and D. Zangen.** 2005. Autodisplay of the protease inhibitor aprotinin in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **333**:1218-26.
12. **Klauser, T., J. Pohlner, and T. F. Meyer.** 1990. Extracellular transport of cholera toxin B subunit using *Neisseria* IgA protease beta-domain: conformation-dependent outer membrane translocation. *Embo J* **9**:1991-9.
13. **Klauser, T., J. Pohlner, and T. F. Meyer.** 1992. Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of *Neisseria* Iga beta-mediated outer membrane transport. *Embo J* **11**:2327-35.
14. **Konieczny, M. P., M. Suhr, A. Noll, I. B. Autenrieth, and M. Alexander Schmidt.** 2000. Cell surface presentation of recombinant (poly-) peptides including functional T-cell epitopes by the AIDA autotransporter system. *FEMS Immunol Med Microbiol* **27**:321-32.
15. **Lattemann, C. T., J. Maurer, E. Gerland, and T. F. Meyer.** 2000. Autodisplay: functional display of active beta-lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. *J Bacteriol* **182**:3726-33.
16. **Maurer, J., J. Jose, and T. F. Meyer.** 1997. Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**:794-804.

17. **Maurer, J., J. Jose, and T. F. Meyer.** 1999. Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *J Bacteriol* **181**:7014-20.
18. **Muller, D., I. Benz, D. Tapadar, C. Buddenborg, L. Greune, and M. A. Schmidt.** 2005. Arrangement of the translocator of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence on the bacterial surface. *Infect Immun* **73**:3851-9.
19. **Ohnishi, Y., M. Nishiyama, S. Horinouchi, and T. Beppu.** 1994. Involvement of the COOH-terminal pro-sequence of *Serratia marcescens* serine protease in the folding of the mature enzyme. *J Biol Chem* **269**:32800-6.
20. **Oliver, D. C., G. Huang, and R. C. Fernandez.** 2003. Identification of secretion determinants of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter. *J Bacteriol* **185**:489-95.
21. **Oliver, D. C., G. Huang, E. Nodel, S. Pleasance, and R. C. Fernandez.** 2003. A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain. *Mol Microbiol* **47**:1367-83.
22. **Oomen, C. J., P. Van Ulsen, P. Van Gelder, M. Feijen, J. Tommassen, and P. Gros.** 2004. Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *Embo J* **23**:1257-66.
23. **Ruiz, N., B. Falcone, D. Kahne, and T. J. Silhavy.** 2005. Chemical conditionality: a genetic strategy to probe organelle assembly. *Cell* **121**:307-17.
24. **Saul, F. A., M. Mourez, B. Vulliez-Le Normand, N. Sassoon, G. A. Bentley, and J. M. Betton.** 2003. Crystal structure of a defective folding protein. *Protein Sci* **12**:577-85.

25. **Skillman, K. M., T. J. Barnard, J. H. Peterson, R. Ghirlando, and H. D. Bernstein.** 2005. Efficient secretion of a folded protein domain by a monomeric bacterial autotransporter. *Mol Microbiol* **58**:945-58.
26. **Spurlino, J. C., G. Y. Lu, and F. A. Quiocho.** 1991. The 2.3-A resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis. *J Biol Chem* **266**:5202-19.
27. **Suhr, M., I. Benz, and M. A. Schmidt.** 1996. Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDAc and evidence for the outer membrane anchoring as a beta-barrel structure. *Mol Microbiol* **22**:31-42.
28. **Suzuki, T., M. C. Lett, and C. Sasakawa.** 1995. Extracellular transport of VirG protein in *Shigella*. *J Biol Chem* **270**:30874-80.
29. **Tani, K., H. Tokuda, and S. Mizushima.** 1990. Translocation of ProOmpA possessing an intramolecular disulfide bridge into membrane vesicles of *Escherichia coli*. Effect of membrane energization. *J Biol Chem* **265**:17341-7.
30. **Veiga, E., V. de Lorenzo, and L. A. Fernandez.** 1999. Probing secretion and translocation of a beta-autotransporter using a reporter single-chain Fv as a cognate passenger domain. *Mol Microbiol* **33**:1232-43.
31. **Veiga, E., V. de Lorenzo, and L. A. Fernandez.** 2004. Structural tolerance of bacterial autotransporters for folded passenger protein domains. *Mol Microbiol* **52**:1069-80.
32. **Veiga, E., E. Sugawara, H. Nikaido, V. de Lorenzo, and L. A. Fernandez.** 2002. Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains. *Embo J* **21**:2122-31.

33. **Velarde, J. J., and J. P. Nataro.** 2004. Hydrophobic residues of the autotransporter EspP linker domain are important for outer membrane translocation of its passenger. *J Biol Chem* **279**:31495-504.
34. **Voulhoux, R., M. Bos, J. Geurtsen, M. Mols, and J. Tommassen.** 2003. Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* **299**:262 - 5.
35. **Welker, E., W. J. Wedemeyer, M. Narayan, and H. A. Scheraga.** 2001. Coupling of conformational folding and disulfide-bond reactions in oxidative folding of proteins. *Biochemistry* **40**:9059-64.
36. **Wu, T., J. Malinverni, N. Ruiz, S. Kim, T. J. Silhavy, and D. Kahne.** 2005. Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell* **121**:235-45.

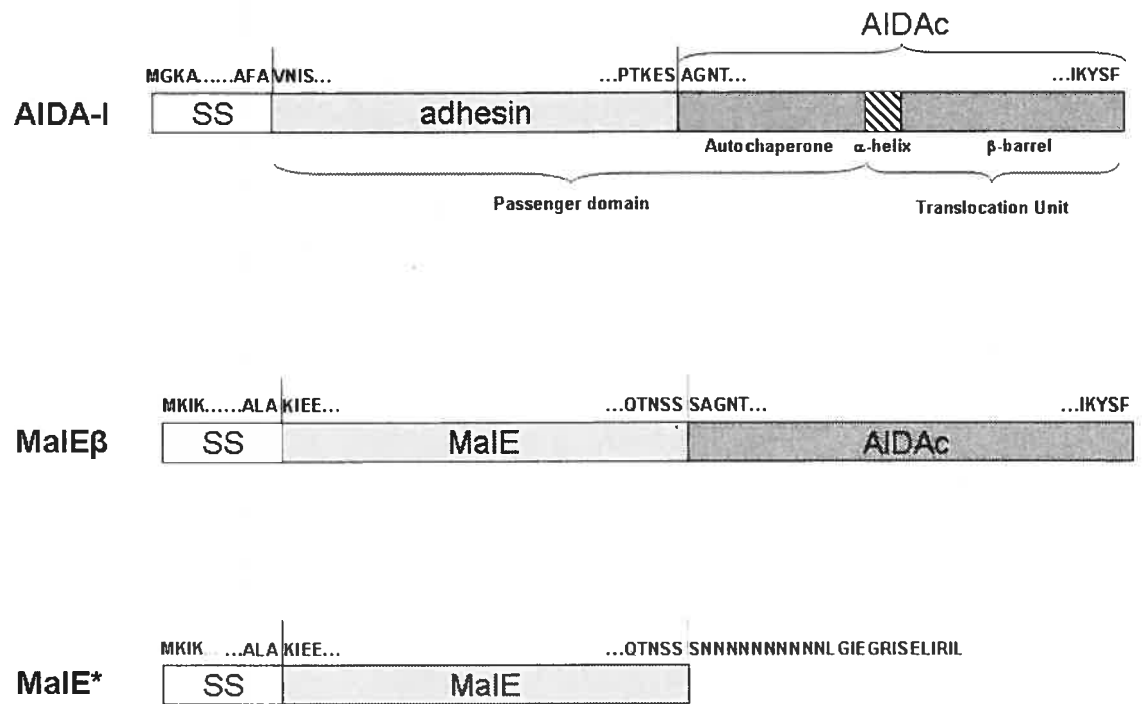


FIG. 1

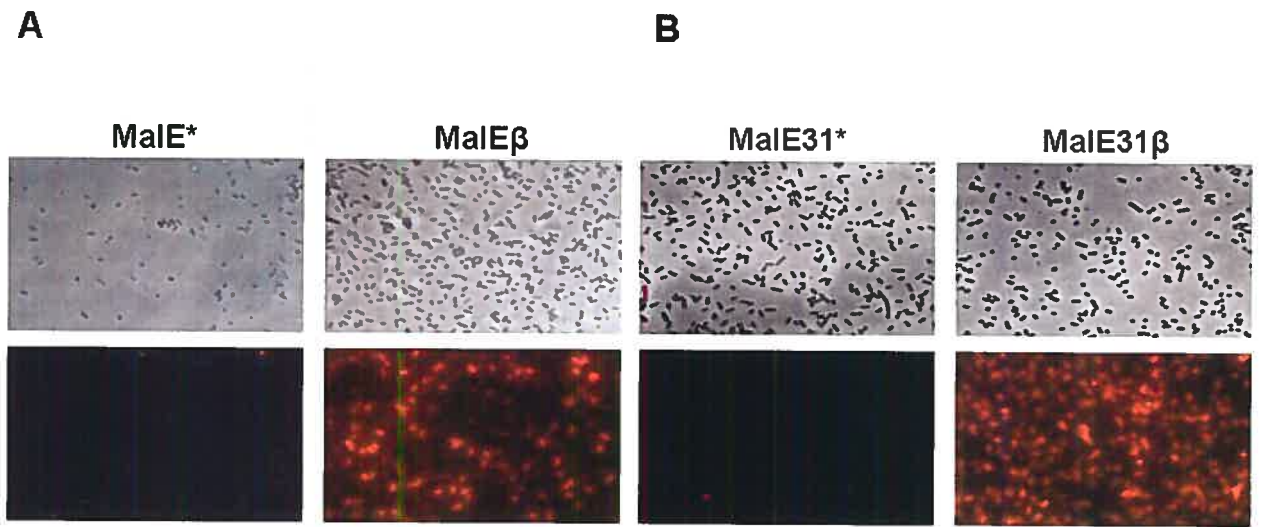


FIG. 2

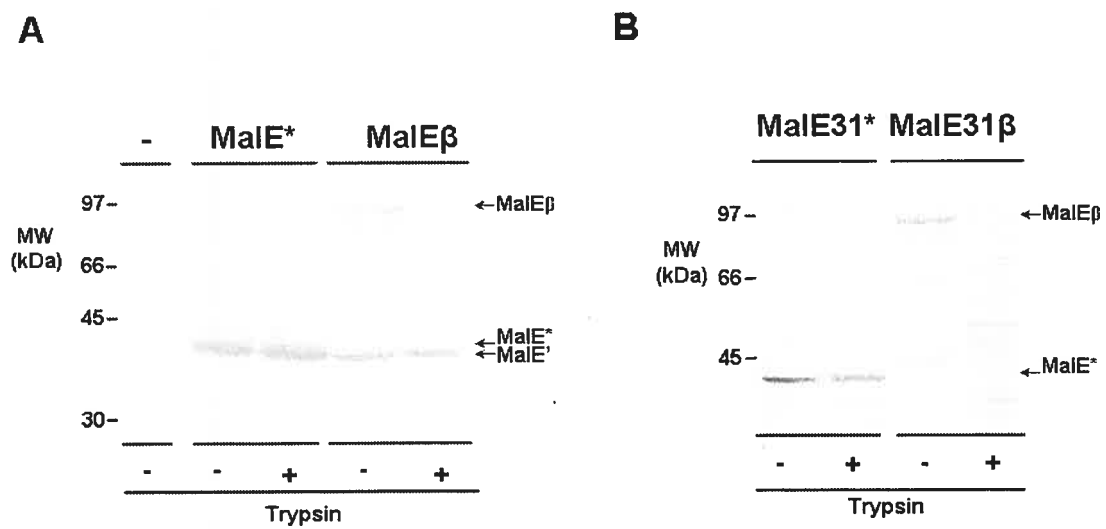
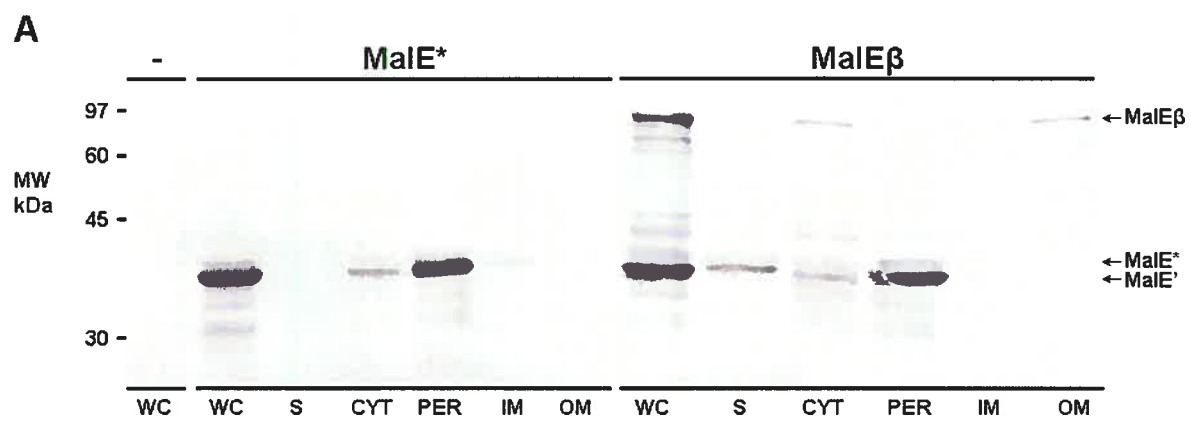


FIG. 3



B

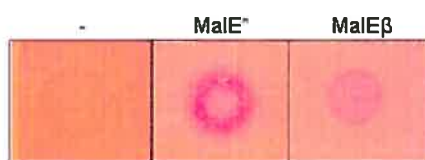


FIG. 4

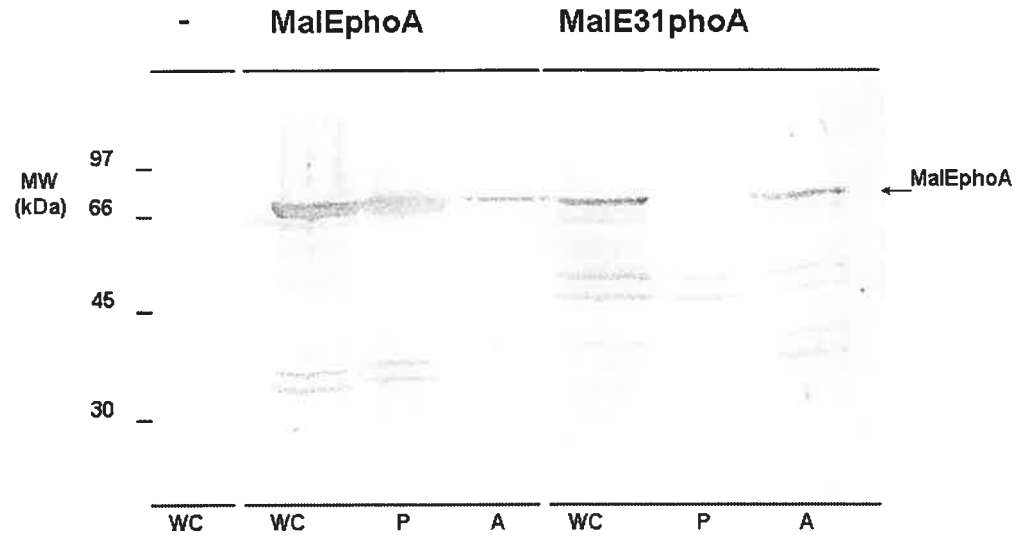


FIG. 5

Article:

Reconstitution of outer membrane translocation by two independently expressed fragments of an autotransporter

(Soumis à Molecular Microbiology)

Frédéric BERTHIAUME et **Nancy RUTHERFORD** sont co-premiers auteurs de cet article. En tant que co-première auteure, j'ai réalisé certaines constructions, réalisé la moitié des expérimentations et participé à la rédaction de l'article.

Reconstitution of outer membrane translocation by two independently expressed fragments of an autotransporter

Frédéric Berthiaume[†], Nancy Rutherford[†], Michael Mourez^{*}

Canada Research Chair on Bacterial Animal Diseases, Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, J2S 7C6, Quebec, Canada

* For correspondence. [REDACTED] Tel. (+1) 450 773 8521 ext 8430; Fax (+1) 450 778 8108. [†] Both authors contributed equally to this work

Running title: Autotransporter insertion and translocation

Keywords: Autotransporter, Two-Partner Secretion, Type V secretion, Outer membrane protein, AIDA-I, *Escherichia coli*

Summary

Autotransporters are simple systems that Gram-negative bacteria employ to secrete proteins to their surfaces or into the extracellular milieu. They consist of an N-terminal passenger domain and a C-terminal translocation unit that is thought to insert into the outer membrane and mediate the secretion of the passenger domain. Despite the apparent simplicity of these secretion systems, their mechanism of translocation remains obscure. To study this mechanism, we fused the *Escherichia coli* periplasmic maltose binding protein, MalE, to AIDA_c, a polypeptide encompassing a C-terminal portion of the passenger domain and the

translocation unit of the AIDA-I autotransporter of *E. coli*. We then genetically split the MalE AIDA_c fusion into two polypeptides at any of four different sites. At two of these sites, when the resulting fragments were co-expressed in the periplasm, they complemented each other and supported translocation of MalE. The reconstitution of translocation from two fragments is surprising since autotransporters are single polypeptides. Our result has therefore functional implications and suggests that the non-covalent interaction of specific regions of the autotransporter in the periplasm represents an intermediate step in the translocation process.

Introduction

Autotransporters are unusually simple secretion systems of Gram-negative bacteria and are mostly involved in the secretion of virulence proteins of pathogenic species (Henderson *et al.*, 2004). After their transport across the inner membrane by the general secretion machinery, these proteins apparently translocate across the outer membrane, without the help of accessory molecules (Jose *et al.*, 1995). The passenger domain, the part of the autotransporter that is translocated, is N-terminal, and its secretion is mediated by the C-terminal domain, termed the translocation unit (TU) (Pohlner *et al.*, 1987).

Structural predictions suggested the existence of two separate regions in the TU: an N-terminal α -helix (Hendrixson *et al.*, 1997; Oliver *et al.*, 2003a) and a C-terminal, membrane-inserted, β -barrel (Klauser *et al.*, 1993a; Loveless and Saier, 1997). These predictions were confirmed by the structure of the TU of the *Neisseria meningitidis* autotransporter NalP (Oomen *et al.*, 2004), which showed a 12-stranded β -barrel with a N-terminal α -helix inserted in its lumen.

After removal of the signal sequence, the mature passenger domain apparently also contains at least two domains: the N-terminal part bears the functionality of the autotransporter, whereas a C-terminal domain has been shown to be involved in the secretion process (Klauser *et al.*, 1993b; Konieczny *et al.*, 2001; Maurer *et al.*, 1997; Ohnishi *et al.*, 1994; Oliver *et al.*, 2003b; Velarde and Nataro, 2004). The latter may facilitate the folding of the passenger domain (Ohnishi *et al.*, 1994; Oliver *et al.*, 2003b) and/or of the β -barrel (Konieczny *et al.*, 2001; Mogensen *et al.*, 2005). It was therefore suggested to act as an intramolecular chaperone and called an autochaperone (Oliver *et al.*, 2003b).

In spite of the relative simplicity of autotransporters, the mechanism of translocation across the outer membrane is not well understood. After its secretion across the inner membrane, an autotransporter has access to the periplasm. There, the passenger domain can fold at least partially (Skillman *et al.*, 2005; Veiga *et al.*, 2004), although, at some level, periplasmic folding becomes incompatible with outer membrane secretion (Jose and Zangen, 2005; Klauser *et al.*, 1990, 1992; Rutherford *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 1995). The passenger domain was initially thought to cross the outer membrane through the lumen of the barrel of the TU, starting with its C terminus and thus making a hairpin in the barrel (Jose *et al.*, 1995; Klauser *et al.*, 1990; Pohlner *et al.*, 1987). This hairpin model was brought into question by the observation that partially folded passenger domains could be translocated (Skillman *et al.*, 2005; Veiga *et al.*, 2004). Indeed, the structure of the TU of NalP shows that the lumen of the barrel is too narrow to accommodate the bulk of a folded polypeptide (Oomen *et al.*, 2004). It was therefore proposed that TUs could form a larger translocation conduit by forming oligomers (Veiga *et al.*, 2002), or that passenger domain translocation could involve the recently discovered outer membrane protein insertion

machinery (Voulhoux *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005). The latter hypothesis seems to be favored in recent studies (Muller *et al.*, 2005; Oomen *et al.*, 2004; Skillman *et al.*, 2005). The observation of intermediates in the translocation pathway could shed light on this mechanism but remains elusive.

In vivo reconstitution of secreted proteins from two complementary fragments has proven valuable in the study of the secretion and the insertion of periplasmic, inner and outer membrane proteins (Betton and Hofnung, 1994; Braun *et al.*, 2003; Koebnik, 1996; Koster and Braun, 1990; Letoffe *et al.*, 2005). By this approach it was shown that the typical β -barrel structure of outer membrane proteins can be reconstituted from complementary fragments of the barrel expressed in the periplasm (Koebnik, 1996). It was also demonstrated that outer membrane proteins consisting of β -barrels and a globular domain inserted in the lumen could be reconstituted upon co-expression of the isolated barrel and globular domains (Braun *et al.*, 2003; Letoffe *et al.*, 2005). In agreement with other studies (Eppens *et al.*, 1997), these observations illustrate the existence of periplasmic folding intermediates on the path of outer membrane proteins insertion. In the current study, we identified an intermediate on the path of autotransporter translocation by reconstituting transport from complementary fragments independently expressed in the periplasm.

Results

Structure prediction of AIDAc

For this study, we used a fusion of the periplasmic maltose binding protein, MalE, to AIDAc, corresponding to the autochaperone domain and translocation unit of the Adhesin Involved in Diffuse Adherence (AIDA-I) (Benz and Schmidt, 1989). This fusion replaces the adhesive portion of AIDA-I with MalE and allows the translocation of MalE across the outer membrane where it is accessible to extracellular antibodies or proteases (Rutherford *et al.*, 2006). We chose this chimeric protein to focus on the translocation mechanism by avoiding potential interference from unknown folding events in the large natural passenger domain. In order to choose the sites where to split AIDAc into two complementary fragments we performed a secondary and tertiary structure prediction using the 3D-PSSM algorithm (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/3dpssm/>). This algorithm combines information from alignment of multiple sequences with molecular threading on known three-dimensional structures (Kelley *et al.*, 2000). The algorithm used the structure of *Bordetella pertussis* pertactin (Emsley *et al.*, 1996) to model the autochaperone domain and the structure of NalP (Oomen *et al.*, 2004) to model the TU.

As shown in Fig. 1a and Fig. 1b, a structure prediction was obtained for most of the AIDAc sequence, except for a 35-amino acids long sequence between residues Thr₉₅₂ and Asn₉₈₆. This region corresponds to the boundary between the α -helix and the autochaperone domain. Indeed, limited proteolytic digestion of AIDAc showed that the last site accessible to Proteinase K was between position Thr₉₅₇ and Ser₉₅₈ (Fig. 1A, (Suhr *et al.*, 1996)). The resulting model of the β -barrel is significantly different from previous structural models

(Konieczny *et al.*, 2001; Maurer *et al.*, 1997). Our model benefited from knowledge of the structure of the translocation unit of NalP, which had not been reported at the time the earlier models were created. The C-terminal end of the α -helix is predicted at Glu₁₀₀₂ in our model, but the N-terminal end could not be modeled accurately. The NalP helix is 30-amino acids long (Oomen *et al.*, 2004), and, assuming a similar length for the helix in AIDAc, we would predict the helix to be located between Thr₉₇₂ and Glu₁₀₀₂, which is in close agreement with a previous prediction (Oliver *et al.*, 2003a). Lastly, for the autochaperone domain, one model predicted only two β -strands (Konieczny *et al.*, 2001), whereas another model noted 8 strands and a high similarity with the observed structure of the homologous region in pertactin (Oliver *et al.*, 2003b). Our model is consistent with the latter.

Expression of complementary fragments of AIDAc

We inserted a short oligonucleotide specifying a restriction site for the enzyme *XhoI* at position 905, 965, 974, 976, 993, 1003 and 1058 (Fig. 1C). This oligonucleotide introduces one or two new amino acids in the AIDAc sequence and we therefore named the corresponding constructs 'X_n', where n represents the codon of insertion of the oligonucleotide (Fig. 1D). At the *XhoI* site we inserted a DNA fragment containing a stop codon, a new pT_{rc} promoter, a Shine-Dalgarno consensus sequence, and the MalE signal sequence (Fig. 1C), resulting in the expression of two complementary fragments that are independently secreted into the periplasm: MalEAIDAcN and AIDAcC. We named these constructs 'P_n' where n represents the codon of insertion of the oligonucleotide (Fig. 1D).

We then tested the expression levels of the constructs by performing a Western blot on total bacterial extracts using anti-MalE antibodies. The X905, X1003, and X1058 constructs had aberrant sizes or altered translocation properties (data not shown). These mutations were therefore not characterized further. The other constructs showed expression of MalEAIDAc or MalEAIDAcN polypeptides with the expected sizes (Fig. 2). The MalEAIDAcN fusions of the Pn constructs were often less well expressed than full length MalEAIDAc and Xn constructs, perhaps indicating that AIDAcN and AIDAcC fragments are less stable than the whole AIDAc. For all constructs a significant amount of polypeptide corresponding to MalE is revealed in the Western blot. This was previously observed with MalEAIDAc and found to be due to the folding of MalE preventing translocation (Rutherford *et al.*, 2006). We verified that in the Pn constructs the MalE fragment is also found in the periplasm (data not shown).

MalE can be translocated in P974 and P976 but not in P965 and P993

We next determined if the constructs could translocate MalE across the outer membrane, so that it would be accessible to externally added antibodies. As shown in Fig. 3, and as previously observed (Rutherford *et al.*, 2006), MalE is accessible to polyclonal anti-MalE antibodies added to whole bacterial cells expressing MalEAIDAc, whereas a control construct expressing periplasmic MalE did not give a signal. MalE was also accessible to external antibodies in the X965, X974, X976 and X993 constructs (Fig. 3 and Table 1), coding for full length MalEAIDAc with mutations caused by the *Xho*I-oligonucleotide insertion. This result suggests that mutations in position 965, 974, 976 and 993 did not dramatically affect translocation. We then tested the independently expressed

complementary fragments of MalEAIDAc. As shown in Fig. 3, whereas MalE was not accessible to the antibodies in P965, a strong fluorescence signal could be observed with P974. Similarly, whereas P993 did not give any signal, MalE in P976 was readily accessible to extracellular antibodies (Table 1). This suggested that complementary AIDAc polypeptides generated by splitting the protein at positions 974 or 976 were able to reconstitute a functional transporter when expressed in the periplasm, whereas fragments generated by splitting the protein at the other positions could not.

In order to confirm this result, we treated whole bacteria expressing the various constructs with trypsin and performed a Western blot with anti-MalE antibodies. As shown in Fig. 4, MalEAIDAc was accessible to the protease in bacteria expressing wild-type MalEAIDAc or the X965 and X974 constructs, but periplasmic MalE remained inaccessible. Fig. 4 shows further that, in the P965 construct, MalEAIDAcN was inaccessible to the externally added protease, whereas it was completely degraded in P974. Similarly we observed that P976 allowed accessibility of MalEAIDAc to trypsin whereas P993 did not (Table 1). This suggested again that MalEAIDAcN and AIDAcC fragments were able to reconstitute a functional transporter in P974 and P976, but not in P965 or P993.

If MalE is unable to be translocated across the outer membrane, it is likely to be periplasmic and therefore should be able to participate in maltose transport. We therefore tested the ability of our constructs to complement a *malE* mutant strain for maltose transport by plating them on MacConkey agar containing 2% maltose. Bacteria expressing periplasmic MalE were able to transport maltose, whereas bacteria expressing MalEAIDAc had insufficient amounts of periplasmic MalE to complement the defect and were unable to transport maltose after 24 hours of incubation (Table 1). In this assay, the P965 and P993 constructs were able to transport maltose, whereas P974 and P976 were not. These results

suggest that in P974 and P976 MalE is translocated into the extracellular milieu, whereas it remains in the periplasm in P965 and P993.

Overall our results are consistent and suggest that in P974 and P976 the two complementary fragments of AIDAc expressed in the periplasm were able to reconstitute a functional transporter, whereas this was not the case in P965 and P993.

Expression of P974 and P976 does not cause gross defects in the outer membrane

Accessibility of MalE to extracellular antibodies and proteases, as seen in P974 and P976, could be due to defects in the integrity of the outer membrane. Such defects have indeed been previously observed with the production of chimeric outer membrane proteins (Georgiou *et al.*, 1996). However, the periplasmic MalE fragment found in bacteria expressing our constructs remained inaccessible to trypsin (Fig. 4), suggesting that the outer membrane was not permeable to the protease. We tested the sensitivity of bacteria expressing MalE, P965, P974 and P976 towards various noxious agents (vancomycin, SDS, bile salts, and polymyxin B) often used to test the existence of a defect in the outer membrane (Nikaido, 2003). As shown in Table 2, no differences in the sensitivities of strain expressing P965, P974 and P976 was observed. These three strains were more sensitive to SDS than bacteria expressing MalE, probably reflecting a perturbation in the envelope due to the outer membrane insertion of AIDAcC. However, since this perturbation was of similar magnitude in the three strains, the accessibility of MalEAIDAcN is not correlated to sensitivity.

Lastly, we incubated bacteria expressing P965, P974 or MalE with antibodies directed against the periplasmic enzyme β -lactamase. The anti- β -lactamase antibodies failed to

recognize the protein in whole bacterial cells but yielded a strong fluorescence signal when bacteria were permeabilized (Fig. S1). This suggested that the periplasm was not readily accessible to externally added antibodies and that β -lactamase did not leak out of bacteria expressing P965 or P974 constructs. Taken together, these experiments are consistent and show that there is no gross outer membrane defect in bacteria expressing P974 and P976.

Expression and insertion of AIDAcC in P965 and P993

Lack of accessibility of MalE:AIDAcN to extracellular antibodies and proteases, as seen in P965 and P993, could be due to the fact that AIDAcC fragments in those constructs are not expressed or inserted in the outer membrane. We therefore tested the presence and insertion of AIDAcC. Since we did not have antibodies against AIDAcC, we prepared outer membrane fractions of bacteria expressing P965, P993 or bearing an empty plasmid, and resolved these extracts by SDS-PAGE before staining with Coomassie blue. As shown in Fig. 5, we observed protein bands with the expected molecular weights of approximately 32 and 34 kDa expressed specifically from the P965 and P993 constructs, respectively. The bands were poorly resolved and appeared fuzzy unless the samples were boiled for 5 minutes prior to denaturing electrophoresis. Moreover the electrophoretic mobility of these proteins was abnormally rapid. These features are characteristic of β -barrel proteins inserted in the outer membrane and were previously observed with AIDAc (Mogensen *et al.*, 2005). This result strongly suggests that P965 and P993 allow the expression of substantial amounts of membrane-inserted AIDAcC and therefore that the lack of translocation of MalE in bacteria expressing P965 and P993 is not due to a lack of

expression or insertion of the AIDAcC fragments. Our results suggest instead that in these constructs AIDAcN and AIDAcC were unable to assemble in the periplasm into a functional transporter.

Translocation of MalE in P974 requires the presence of both AIDAcN and AIDAcC

In order to ascertain that the accessibility of MalE-AIDAcN in P974 was due to an interaction between AIDAcN and AIDAcC, we decided to delete the AIDAcN or the AIDAcC region in P974 and test the ability of these mutants to translocate MalE. When we deleted AIDAcN in P974 (P974 Δ N) or when we truncated most of AIDAcC of P974 (P974 Δ C), MalE was inaccessible to trypsin (Fig. 6A) or to anti-MalE antibodies (Fig. 6B). These results show that the AIDAcC or AIDAcN fragments alone are unable to promote accessibility of MalE to antibodies or protease. Our experiments therefore suggest that accessibility of MalE was due to an interaction between AIDAcN and AIDAcC. Fig. 6B shows further that the reconstitution of the transport of MalE is less efficient than the translocation mediated by MalEAIDAc. This is to be expected since MalE will probably have more time to fold in the MalEAIDAcN fragment of the P974 construct than in MalEAIDAc and therefore be prevented from being translocated to a greater extent (Rutherford *et al.*, 2006).

It is unclear if the interaction between AIDAcN and AIDAcC in the P974 and P976 constructs takes place before or after AIDAcC is inserted in the outer membrane. We constructed two plasmids derived from P974 where MalEAIDAcN is expressed from one plasmid under an IPTG-inducible promoter, and AIDAcC is expressed from a compatible plasmid under an arabinose-inducible promoter. This allows the independent expression of

each fragment. With such a construct we observed that MalEAIDAcN was accessible to trypsin only when co-expressed with AIDAcC and not when it was expressed after AIDAcC (Fig. 6C). Although it is possible that AIDAcC expressed alone could fold aberrantly, this experiment suggests that when AIDAcC is expressed first, it inserts in the outer membrane and then becomes unable to interact with AIDAcN.

Discussion

In this report, we show that it is possible to split the C-terminal part of an autotransporter into two polypeptides, express them separately in the periplasm, and reconstitute translocation across the outer membrane. This observation shows for the first time the existence of a non-covalent interaction between the membrane-embedded domain and the translocated domain of an autotransporter. The interaction might be due to a periplasmic folding intermediate, as observed with β -barrel outer membrane proteins (Eppens *et al.*, 1997). Although possible, we do not favor this hypothesis since membrane-embedded fragments of the non-functional split constructs were correctly inserted in the outer membrane. Thus, we believe instead that our results indicate that an intermediate step takes place in the periplasm on the path to translocation. This step would involve the formation of non-covalent interactions between regions in the C-terminal part of autotransporters, which allow the reconstitution of translocation in our split constructs.

We can only speculate on the structure involved in this non-covalent interaction. Since two adjacent regions of a normally single polypeptide are involved, their interaction would most likely cause a loop to be formed (Fig. 7). Failure of reconstitution in the P965 or P993 constructs could result from the split occurring before or after the region forming the loop

(Fig. 7). Hence, the fact that the reconstitution occurred when fragments were generated at position 976 and not at position 993 suggests that the region between residues 976 and 993 is involved in interactions critical for the reconstitution. This region corresponds to the α -helix of the membrane embedded domain. Similarly, the fact that the reconstitution occurred when fragments were generated at position 974 and not at position 965 suggests that the region between residues 965 and 974 plays a key role. This region is located immediately upstream of the α -helix, at the extreme C terminus of the passenger domain. Its functional importance was highlighted in previous studies with the EspP and Pet *E. coli* autotransporters, which showed that mutations in this region altered secretion (Dutta *et al.*, 2003; Velarde and Nataro, 2004). Also in agreement with these observations, the limit of the minimal TU of AIDA-I was experimentally shown to be located between Leu₉₅₅ and Ala₉₇₅, suggesting that the region immediately upstream of the helix is indispensable for translocation (Maurer *et al.*, 1999).

Put together, our results suggest that the extreme C terminus of the passenger domain and the α -helix interact with one another. Consistent with this view, an interaction between domains of AIDAc was previously observed *in vitro* by comparing the stability or folding of pure AIDAc with or without the so called β 1-region, which comprises the part of AIDAc not embedded in the membrane (Konieczny *et al.*, 2001; Mogensen *et al.*, 2005). It is possible, however, that the C terminus of the passenger domain and the α -helix each interact with other regions in AIDAc. The molecular details of the interaction we postulate therefore remain to be thoroughly tested.

In conclusion, our results shed new light on the mechanism of autotransporter secretion. Indeed, our results suggest that a model in which the passenger domain is passively threaded through the conduit of the barrel of the membrane-embedded domain is unlikely.

Instead, our observations are consistent with a functional interaction between two specific regions of the C-terminal part of the autotransporter, forming a structure strikingly reminiscent of the hairpin model originally postulated for the translocation mechanism (Jose *et al.*, 1995; Klauser *et al.*, 1990; Pohlner *et al.*, 1987). Our results further suggest that this interaction takes place in the periplasm and not in the membrane, supporting the notion that membrane insertion and translocation are concerted events. We propose that such an interaction might be necessary to prime the translocation process, for instance by engaging the passenger domain into the lumen of the barrel. The translocation of the passenger domain could then either proceed spontaneously through the lumen of the barrel or require the Omp85 machinery, as previously hypothesized (Oomen *et al.*, 2004; Skillman *et al.*, 2005).

Finally, it is interesting to note that in the closely related two-partner secretion system (TPS), the passenger and translocation domains are encoded on separate polypeptides (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004). We have therefore apparently converted an autotransporter into a TPS. It should be noted, however, that the interacting parts in the TPS system have recently been identified and are very different from the regions we are highlighting in our study. The secreted polypeptides of TPS systems all bear a highly conserved N-terminal region of 250 residues termed the 'TPS domain' that is essential for secretion and is thought to be the recognition site for the transporter partner (Clantin *et al.*, 2004; Hodak *et al.*, 2006). A 200 residues-long N-terminal domain of the transporter is thought to mediate the recognition of the TPS domain (Hodak *et al.*, 2006; Meli *et al.*, 2006; Surana *et al.*, 2006). Despite the difference in interacting regions, our study suggests that autotransporters and TPS systems may rely on a similar mechanism where an interaction takes place between regions of the transporter and the secreted partner to initiate translocation. This

and the striking observation that the structures of passenger domains of the two systems seem to be based on a similar β -helical fold (Kajava and Steven, 2006), strengthen the notion that these two systems be grouped together into the type V secretion pathway. It should be noted that some “split” autotransporters were previously recognized by data mining, but it was questioned whether these transporters were functional (Henderson *et al.*, 2004). Our results warrant a new investigation of this idea. The study of these split autotransporters might provide the evolutionary “missing link” between the two branches of the type V secretion pathway.

Experimental procedures

Bacterial strains and plasmids

Escherichia coli strain ED9 (*araD*, Δ *lacU169*, *rpsL*, *relA*, *flbB*, *deoC*, *ptsF*, Δ *malE444*), bearing a non polar deletion of the *malE* gene was used in this study (Rutherford *et al.*, 2006). The plasmid pMalEAIDAc allowing the expression of the MalEAIDAc fusion and the pMalE Δ lac control plasmid allowing the expression of periplasmic MalE are derived from the empty vector pMalp2X (New England Biolabs) and their constructions have been previously described (Rutherford *et al.*, 2006). *Xho*I restriction sites were introduced in pMalEAIDAc at specific site by an oligonucleotide-directed mutagenesis performed using the QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) to generate plasmids pMalEAIDAcX905, pMalEAIDAcX965, pMalEAIDAcX974, pMalEAIDAcX976, pMalEAIDAcX993, pMalEAIDAcX1003 and pMalEAIDAcX1058. To generate two complementary fragments of MalEAIDAc, a DNA fragment containing an in frame stop

codon, a new pTrc promoter, a Shine-Dalgarno consensus and MalE signal sequence (Fig. 1C) was inserted at the XhoI site to generate plasmids pMalEAIDAcP965, pMalEAIDAcP974, pMalEAIDAcP976, and pMalEAIDAcP993. This 276 base pairs fragment was generated by PCR from the template plasmid pMalp2X.

The pMalEAIDAcP974 Δ N vector (deletion of the N-terminal fragment of AIDAc from the P974 construct) was generated by cloning an *HpaI* fragment of pMalEAIDAcP974, encompassing MalEAIDAcN, into pMalp2X (New England Biolabs) digested by *HpaI* and *FspI*. The pMalEAIDAcP974 Δ C plasmid (deletion of the C-terminal fragment of AIDAc from the P974 construct) was obtained by cleaving pMalEAIDAcP974 with *HindIII*, purification of the vector without the excised 833 base pairs fragment and religation. All mutated plasmids were verified by sequencing.

From the original P974 construct, MalEAIDAcN and AIDAcC were also cloned in compatible plasmids under different promoters. A fragment from the pMalEAIDAcP974 plasmid digested with *NdeI* and *HpaI* encompassing MalEAIDAcN was cloned in pMalp2X digested with *NdeI* and *XmnI*. This yielded plasmid pMalEAIDAcN, from which MalEAIDAcN is expressed under the IPTG-inducible pTrc promoter. The DNA coding for AIDAcC was PCR-amplified from pMalEAIDAcP974, using primer incorporating appropriate restriction sites in order to clone the fragment in pBAD33 digested with *KpnI* and *XbaI*. This yielded plasmid pAIDAcC, from which AIDAcC is expressed under the arabinose-inducible pBad promoter. These plasmids were introduced in strain MC1061 (MC4100 *araD139* Δ (*ara-leu*)7697) and bacterial cultures were induced at 30°C with 0.4% arabinose for expression of AIDAcC and/or 50 μ M IPTG for expression of MalEAIDAcN. Different successive induction conditions were tested. This was performed by harvesting bacteria after one hour of induction in the first condition, performing two washes in PBS,

and resuspending the bacteria in new medium for one hour of induction in the second condition.

Bacterial growth and induction conditions

Bacteria harboring the different plasmids were grown at 30°C in LB agar plates containing 100 µg.ml⁻¹ of ampicillin. Single colonies were inoculated in liquid LB medium containing 100 µg.ml⁻¹ ampicillin and grown at 30°C until OD₆₀₀ reached 0.4. Bacteria were induced with 50 µM IPTG and incubated further for 3 h at 30°C. To determine the ability to utilize maltose, bacteria were grown on MacConkey plates containing 2% maltose (w/v), ampicillin 100 µg.ml⁻¹ and the plates were incubated for 24 h at 37°C.

Sensitivity of bacteria to antibiotics and membrane destabilizing agents

Sensi-Discs (Becton Dickinson BBL) containing polymyxin B (300 IU) or vancomycin (30 µg) or sterile blank paper discs (Difco laboratories) dipped in solutions of SDS (10% (w/v)), or bile salts (150 mg.ml⁻¹) were used to test the sensitivity of various bacterial strains to these compounds. The discs were placed on a 3 hours-induced culture of the strain which had been diluted into Top agarose (per liter; tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g, MgCl₂ 1 g, agarose 7 g) and spread on LB agar plates containing 100 µg.ml⁻¹ of ampicillin and 50 µM IPTG. The plates were incubated at 30°C for 18 h. The diameter of the zone of inhibition was measured and the diameter of the disc (6 mm) was subtracted.

Accessibility to antibodies and protease

These assays were performed as described previously (Rutherford *et al.*, 2006). For immunofluorescence microscopy, bacteria, grown as described above, were fixed at an OD_{600nm} of 1 in sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 2.5% (w/v) paraformaldehyde and 0.08% (w/v) glutaraldehyde. Fixed bacteria were resuspended in 50 mM glucose, 10 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 and transferred on microscope slides coated with poly L-lysine (1 mg.ml⁻¹). In some controls the bacteria were also permeabilized by addition of 8 µg.ml⁻¹ of lysozyme before transfer on the microscope slides. Fixed bacteria were blocked with PBS containing 2% Bovine Serum Albumin (BSA) and incubated with rabbit polyclonal anti-MalE (New England Biolabs) or anti-β-lactamase (Chemicon International) antibodies. Immune complexes were revealed by incubation with a goat anti-rabbit IgG rhodamine red conjugate (Molecular Probes) and the microscopic slides were examined with a Leica DMR phase contrast microscope (Leica Microsystems) equipped with epifluorescence and UV excitation modules (Chroma Technology Corporation).

For whole cell ELISA, bacteria were grown and induced overnight, then fixed with paraformaldehyde, as above. Fixed bacteria were blocked with PBS-BSA and incubated with rabbit polyclonal anti-MalE antibodies or without antibodies. Immune complexes were revealed by anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Sigma) and incubation with 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB, Sigma). The signal obtained without antibodies was subtracted.

For protease accessibility assays, bacteria grown as described above were harvested and resuspended in PBS and incubated for 30 minutes on ice with or without 0.1 mg.ml^{-1} trypsin (Sigma). The trypsin inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride (Roche) was added to stop the reaction and the samples were processed for electrophoresis and immunoblotting, as described below.

SDS-PAGE and Immunoblotting

Protein samples for immunoblotting were prepared under denaturing and reducing conditions (5 minutes boiling in a buffer containing 2% SDS and 5% 2-mercaptoethanol), and resolved by SDS-PAGE on 10 % acrylamide gels. Gels were transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore) using a semi-dry electrophoresis transfer apparatus and the membrane probed with polyclonal anti-MalE antibodies (New England Biolabs). Immune complex were revealed by anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Sigma) and incubation with TMB. To show the heat modification of the β -barrel, the concentration of SDS used was 1.5% in the sample buffer and the samples were either boiled for 5 minutes or left at room temperature.

Subcellular fractionation

Bacteria were fractionated as described previously (Rutherford et al., 2006). Briefly, bacteria were grown as described above and a sample of the culture was taken at the beginning of the procedure as the whole-cell fraction. Cells were harvested and

resuspended in 10 mM Tris-HCl, pH 8, 0.75 mM sucrose. A solution of lysozyme 4 mg.ml⁻¹, in 100 mM EDTA, pH 8, was added. The resulting spheroplasts were pelleted and the supernatant collected as the periplasm. The spheroplasts were resuspended in Tris Buffer Saline (TBS; 50 mM Tris, pH8, 150 mM NaCl) containing a protease inhibitor cocktail (Complete Mini, Roche) and lysed using an Ultrasonic processor (CPX-750, Cole Parmer). The lysates were then centrifuged for 1 hour at 156,000g in an ultracentrifuge and the pellets resuspended in TBS containing 1% Triton X-100 in order to solubilize the inner membrane. After 30 minutes of incubation on ice, the samples were centrifuged again in an ultracentrifuge as above and the pellet, corresponding to the outer membranes, was resuspended in TBS.

Acknowledgements

We are greatly indebted to Jeremy Mogridge and John Collier for their help in editing the manuscript and to Mario Jacques for helpful comments. This work was supported by financial contributions from the Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC discovery grant 262746), the Canada Research Chair program and the Canada Foundation for Innovation (project 201414).

References

- Benz, I., and Schmidt, M.A. (1989) Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **57**: 1506-1511.
- Betton, J.M., and Hofnung, M. (1994) *In vivo* assembly of active maltose binding protein from independently exported protein fragments. *Embo J* **13**: 1226-1234.
- Braun, M., Endriss, F., Killmann, H., and Braun, V. (2003) *In vivo* reconstitution of the FhuA transport protein of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **185**: 5508-5518.
- Clantin, B., Hodak, H., Willery, E., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., and Villeret, V. (2004) The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 6194-6199.
- Dutta, P.R., Sui, B.Q., and Nataro, J.P. (2003) Structure-function analysis of the enteroaggregative *Escherichia coli* plasmid-encoded toxin autotransporter using scanning linker mutagenesis. *J Biol Chem* **278**: 39912-39920.
- Emsley, P., Charles, I.G., Fairweather, N.F., and Isaacs, N.W. (1996) Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature* **381**: 90-92.
- Eppens, E.F., Nouwen, N., and Tommassen, J. (1997) Folding of a bacterial outer membrane protein during passage through the periplasm. *Embo J* **16**: 4295-4301.
- Georgiou, G., Stephens, D.L., Stathopoulos, C., Poetschke, H.L., Mendenhall, J., and Earhart, C.F. (1996) Display of beta-lactamase on the *Escherichia coli* surface: outer membrane phenotypes conferred by Lpp'-OmpA'-beta-lactamase fusions. *Protein Eng* **9**: 239-247.

- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., and Ala'Aldeen, D. (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 692-744.
- Hendrixson, D.R., de la Morena, M.L., Stathopoulos, C., and St Geme, J.W., 3rd (1997) Structural determinants of processing and secretion of the *Haemophilus influenzae* hap protein. *Mol Microbiol* **26**: 505-518.
- Hodak, H., Clantin, B., Willery, E., Villeret, V., Loch, C., and Jacob-Dubuisson, F. (2006) Secretion signal of the filamentous haemagglutinin, a model two-partner secretion substrate. *Mol Microbiol*.
- Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R., and Coutte, L. (2004) Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 235-257.
- Jose, J., Jahnig, F., and Meyer, T.F. (1995) Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol Microbiol* **18**: 378-380.
- Jose, J., and Zangen, D. (2005) Autodisplay of the protease inhibitor aprotinin in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **333**: 1218-1226.
- Kajava, A.V., and Steven, A.C. (2006) The turn of the screw: Variations of the abundant beta-solenoid motif in passenger domains of Type V secretory proteins. *J Struct Biol*.
- Kelley, L.A., MacCallum, R.M., and Sternberg, M.J. (2000) Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM. *J Mol Biol* **299**: 499-520.
- Klauser, T., Pohlner, J., and Meyer, T.F. (1990) Extracellular transport of cholera toxin B subunit using *Neisseria* IgA protease beta-domain: conformation-dependent outer membrane translocation. *Embo J* **9**: 1991-1999.

- Klauser, T., Pohlner, J., and Meyer, T.F. (1992) Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of *Neisseria* Iga beta-mediated outer membrane transport. *Embo J* **11**: 2327-2335.
- Klauser, T., Kramer, J., Otzelberger, K., Pohlner, J., and Meyer, T.F. (1993a) Characterization of the *Neisseria* Iga beta-core. The essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion. *J Mol Biol* **234**: 579-593.
- Klauser, T., Pohlner, J., and Meyer, T.F. (1993b) The secretion pathway of IgA protease-type proteins in gram-negative bacteria. *Bioessays* **15**: 799-805.
- Koebnik, R. (1996) *In vivo* membrane assembly of split variants of the *E.coli* outer membrane protein OmpA. *Embo J* **15**: 3529-3537.
- Konieczny, M.P.J., Benz, I., Hollinderbaumer, B., Beinke, C., Niederweis, M., and Schmidt, M.A. (2001) Modular organization of the AIDA autotransporter translocator: the N-terminal beta1-domain is surface-exposed and stabilizes the transmembrane beta2-domain. *Antonie Van Leeuwenhoek* **80**: 19-34.
- Koster, W., and Braun, V. (1990) Iron(III) hydroxamate transport of *Escherichia coli*: restoration of iron supply by coexpression of the N- and C-terminal halves of the cytoplasmic membrane protein FhuB cloned on separate plasmids. *Mol Gen Genet* **223**: 379-384.
- Letoffe, S., Wecker, K., Delepierre, M., Delepelaire, P., and Wandersman, C. (2005) Activities of the *Serratia marcescens* heme receptor HasR and isolated plug and beta-barrel domains: the beta-barrel forms a heme-specific channel. *J Bacteriol* **187**: 4637-4645.
- Loveless, B.J., and Saier, M.H., Jr. (1997) A novel family of channel-forming, autotransporting, bacterial virulence factors. *Mol Membr Biol* **14**: 113-123.

- Maurer, J., Jose, J., and Meyer, T.F. (1997) Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 794-804.
- Maurer, J., Jose, J., and Meyer, T.F. (1999) Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *J Bacteriol* **181**: 7014-7020.
- Meli, A.C., Hodak, H., Clantin, B., Locht, C., Molle, G., Jacob-Dubuisson, F., and Saint, N. (2006) Channel properties of TpsB transporter FhaC point to two functional domains with a C-terminal protein-conducting pore. *J Biol Chem* **281**: 158-166.
- Mogensen, J.E., Tapadar, D., Schmidt, M.A., and Otzen, D.E. (2005) Barriers to folding of the transmembrane domain of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. *Biochemistry* **44**: 4533-4545.
- Muller, D., Benz, I., Tapadar, D., Buddenborg, C., Greune, L., and Schmidt, M.A. (2005) Arrangement of the translocator of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence on the bacterial surface. *Infect Immun* **73**: 3851-3859.
- Nikaido, H. (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 593-656.
- Ohnishi, Y., Nishiyama, M., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1994) Involvement of the COOH-terminal pro-sequence of *Serratia marcescens* serine protease in the folding of the mature enzyme. *J Biol Chem* **269**: 32800-32806.
- Oliver, D.C., Huang, G., and Fernandez, R.C. (2003a) Identification of secretion determinants of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter. *J Bacteriol* **185**: 489-495.

- Oliver, D.C., Huang, G., Nodel, E., Pleasance, S., and Fernandez, R.C. (2003b) A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain. *Mol Microbiol* **47**: 1367-1383.
- Oomen, C.J., Van Ulsen, P., Van Gelder, P., Feijen, M., Tommassen, J., and Gros, P. (2004) Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *Embo J* **23**: 1257-1266.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K., and Meyer, T.F. (1987) Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **325**: 458-462.
- Rutherford, N., Charbonneau, M.E., Berthiaume, F., Betton, J.M., and Mourez, M. (2006) The periplasmic folding of a cysteineless autotransporter passenger domain interferes with its outer membrane translocation. *J Bacteriol* **188**: 4111-4116.
- Skillman, K.M., Barnard, T.J., Peterson, J.H., Ghirlando, R., and Bernstein, H.D. (2005) Efficient secretion of a folded protein domain by a monomeric bacterial autotransporter. *Mol Microbiol* **58**: 945-958.
- Suhr, M., Benz, I., and Schmidt, M.A. (1996) Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDA_c and evidence for the outer membrane anchoring as a beta-barrel structure. *Mol Microbiol* **22**: 31-42.
- Surana, N.K., Buscher, A.Z., Hardy, G.G., Grass, S., Kehl-Fie, T., and St Geme, J.W., 3rd (2006) Translocator proteins in the two-partner secretion family have multiple domains. *J Biol Chem* **281**: 18051-18058.
- Suzuki, T., Lett, M.C., and Sasakawa, C. (1995) Extracellular transport of VirG protein in *Shigella*. *J Biol Chem* **270**: 30874-30880.

- Veiga, E., Sugawara, E., Nikaido, H., de Lorenzo, V., and Fernandez, L.A. (2002) Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains. *Embo J* **21**: 2122-2131.
- Veiga, E., de Lorenzo, V., and Fernandez, L.A. (2004) Structural tolerance of bacterial autotransporters for folded passenger protein domains. *Mol Microbiol* **52**: 1069-1080.
- Velarde, J.J., and Nataro, J.P. (2004) Hydrophobic residues of the autotransporter EspP linker domain are important for outer membrane translocation of its passenger. *J Biol Chem* **279**: 31495-31504.
- Voulhoux, R., Bos, M.P., Geurtsen, J., Mols, M., and Tommassen, J. (2003) Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* **299**: 262-265.
- Wu, T., Malinverni, J., Ruiz, N., Kim, S., Silhavy, T.J., and Kahne, D. (2005) Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell* **121**: 235-245.

Table 1: Summary of the characterizations regarding MalE localization

	MalEAIDAc	MalE	965		974		976		993	
			X	P	X	P	X	P	X	P
Trypsin sensitivity^a	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
Immunofluorescence^b	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
Maltose utilization^c	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+

^a, The accessibility of MalE to extracellularly added trypsin was assessed by incubating unpermeabilized whole cells with or without trypsin and assessing the amount of MalEAIDAc polypeptides that could be degraded by the protease as revealed by Western blotting using anti-MalE antibodies, +: MalE was accessible, -: MalE was inaccessible. ^b, The accessibility of MalE to extracellularly added antibodies was assessed by whole-cell ELISA or immunofluorescence microscopy on unpermeabilized bacteria, +: MalE was accessible to antibodies, -: MalE was inaccessible to antibodies. ^c, The presence of MalE in the periplasm was tested by assessing the ability of bacteria expressing the indicated constructs to utilize maltose in MacConkey maltose agar plates, +: bacteria could ferment maltose, -: bacteria could not ferment maltose.

Table 2: Sensitivity towards antibiotics and membrane destabilizing agents

	Diameter of inhibition (mm)			
	SDS	Bile salts	Polymyxin B	Vancomycin
MalE	0.5 ± 0.5	NS	10.0 ± 0.4	NS
P965	8.5 ± 1.8	NS	8.3 ± 0.6	NS
P974	7.3 ± 2.0	NS	8.8 ± 1.1	NS
P976	6.8 ± 1.1	NS	9.5 ± 0.9	NS

An overnight culture of bacteria expressing the indicated construct was diluted in Top Agar and spread on LB plates containing IPTG. Sterile discs containing SDS (10%), bile salts (150 mg.ml⁻¹), polymyxin B (300 IU) or vancomycin (30 µg) were added and the plates were incubated at 30°C for 18 hours. The diameter of inhibition was measured and the diameter of the disc (6 mm) was subtracted. Four independent experiments were performed and the results represent mean ± s.e.m. NS: not sensitive.

Figure legends

Fig. 1 Structural model of AIDAc and expression of complementary fragments

A structural model of AIDAc, a region of the adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I) autotransporter of *E. coli* encompassing the autochaperone region and the translocation unit, was generated using the 3D-PSSM algorithm. A. Predicted secondary structure of AIDAc, E; β -strand, H: α -helix, x: no prediction. The arrow indicates the last site accessible during limited digestion with Proteinase K (Suhr *et al.*, 1996). B. Model of tertiary structure of AIDAc. The positions at which some of the *Xho*I restriction sites were inserted are indicated. C. Schematic representation of the design used to generate the X965, X974, X976 or X993 constructs (Xn) and the P965, P974, P976 or P993 constructs (Pn). *Xho*I restrictions sites were inserted by site-directed mutagenesis and then the sites were used to insert a cassette containing a stop codon, a new promoter and the Male signal sequence. D. The resulting mutations in each construct are indicated.

Fig. 2: Expression of the MaleAIDAc constructs

Whole cell extracts (WC) of bacteria bearing an empty vector (-) or expressing MaleAIDAc or the Xn or Pn constructs were obtained after growth at 30°C until an OD_{600nm} of 0.4 and induction with 50 μ M IPTG for 3 hours at 30°C. The cultures were normalized at equal OD_{600nm} and equal amounts of extracts were resolved by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with polyclonal anti-Male antibodies. The position of MaleAIDAc and MaleAIDAcN are indicated. A Male fragment is also visible and results from its cleavage from AIDAc because of an incompatibility of Male folding with translocation (Rutherford *et al.*, 2006).

Fig. 3: Accessibility of MalE to extracellular antibodies

Bacteria expressing MalE, MalEAIDAc, or the X965, P965, X974 or P974 constructs were grown as described in Fig.2. The bacteria were fixed, transferred on microscope glass slides and labeled with polyclonal anti-MalE antibodies. Goat anti-rabbit serum conjugated to rhodamine red was used as secondary antibody and the slides were mounted for examination using a phase contrast microscope equipped with epifluorescence and UV excitation modules. The epifluorescence and corresponding phase-contrast fields are shown in the right and left images, respectively.

Fig. 4: Accessibility of MalE to extracellular trypsin

Bacteria bearing an empty vector (-) or expressing MalEAIDAc, the X965, P965, X974 or P974 constructs were grown as described in Fig.2. The bacteria were pelleted and resuspended in PBS in the presence or absence of trypsin (0.1 mg.ml^{-1}). After 30 minutes of incubation on ice, the trypsin was neutralized by addition of PMSF. The samples were then mixed with loading buffer, resolved by SDS-PAGE on 10% polyacrylamide gels and MalE revealed by immunoblotting using a rabbit antiserum against MalE.

Fig. 5: Presence of AIDAcC in P993 and P965

Bacteria bearing an empty vector (-), or expressing the P993 or P965 constructs were grown as described in Fig. 2. The outer membrane (OM) fractions were obtained by selective extraction of inner membranes from total membranes using Triton X-100, as described in the Experimental Procedures section. Total extracts of whole cells (WC) were obtained from an aliquot of the cultures taken prior to the fractionation procedure. Protein

samples were either denatured by boiling at 100°C for 5 minutes or incubated at room temperature before separation by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. In total and membrane extracts a 32 or 34 kDa band is clearly visible and correspond to AIDAcC (arrowheads), based on its heat-modifiability. A 45 kDa band is also visible and most likely correspond to MalE (stars), as it is revealed by Western blot using anti-MalE antibodies on the same extracts. The 32 and 34 kDa bands, however, did not react with the anti-MalE antibodies, consistent with the fact that they correspond to AIDAcC and not to a degradation product of MalEAIDAcN.

Fig. 6: Both N and C fragments of AIDAc are required in P974 for MalE accessibility to antibodies and proteases

A. Bacteria bearing an empty vector (-) or expressing P974, P974 Δ N (a construct where AIDAcN is deleted from P974) or P974 Δ C (a construct with a large internal deletion in AIDAcC from P974) were grown and treated with or without trypsin as described in Fig. 4.

B. Bacteria expressing MalEAIDAc, MalE, P974, P974 Δ N or P974 Δ C were grown and fixed as described in Fig. 3. Fixed bacteria were incubated with or without polyclonal anti-MalE antibodies in microfuge tubes and after extensive washings the immune complex remaining on the fixed bacteria were revealed with goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate and incubation with TMB. The signals obtained in the tubes without antibody was subtracted. The experiment was performed 4 times in triplicates and the results are shown as mean \pm s.e.m. C. The pMalEAIDAcN and pAIDAcC plasmids, which allow the expression of MalEAIDAcN under the control of IPTG and of AIDAcC under the control of arabinose, respectively, were used to express MalEAIDAcN after AIDAcC (C \rightarrow N), MalEAIDAcN and AIDAcC after AIDAcC (C \rightarrow N+C), or MalEAIDAcN and AIDAcC

throughout the experiment (N+C→N+C). Cultures were grown and treated with or without trypsin as described in Fig. 4, except that two successive inductions conditions lasting 1 hour and separated by two washes in PBS were used.

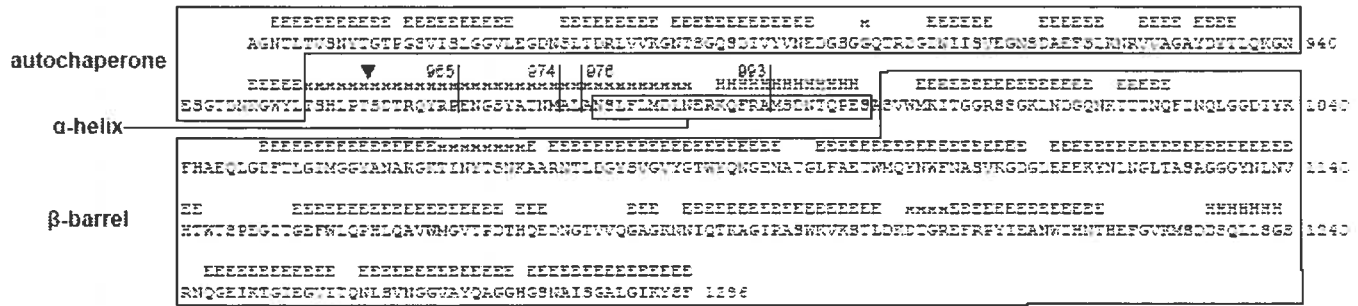
Fig. 7: Interpretation of the complementation results presented in the study

Our results suggest the existence of an interaction between two adjacent regions of AIDAc, encompassing the extreme C terminus of the passenger domain and the helix. This region indicated in orange would form a loop in the periplasm. We hypothesize that this is involved in the translocation mechanism, hence the term secretion region. Constructs P974 or P976 would be split at positions in the loop and therefore could reconstitute translocation when co-expressed, whereas constructs P965 or P993 would be split before or after the loop, respectively, preventing reconstitution. MalE is indicated in blue, the autochaperone region in green and the barrel in red. OM: outer membrane. IM: Inner membrane.

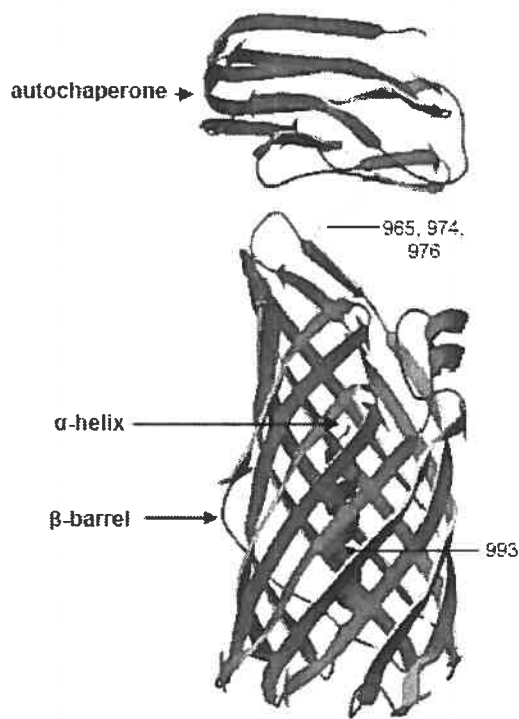
Fig. S1: Lack of accessibility of β -lactamase by extracellular antibodies

Bacteria expressing periplasmic MalE or the P965 or P974 constructs were grown and treated as described in Fig. 3, except that a rabbit polyclonal anti- β -lactamase antiserum was used (left). The experiment was also performed with bacteria that were permeabilized (right).

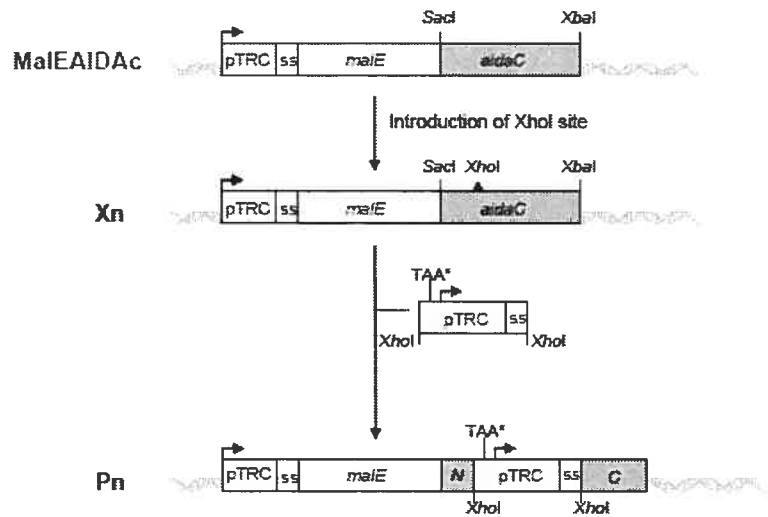
A



B



C



D

Wild type	Xn		Pn		
			N-terminal	C-terminal	
964 RPENG 968	X965	RPLENG	P965	RPLE*	ALALENG
973 NMAL 976	X974	NMLEAL	P974	NMLE*	ALALEAL
974 MALA 977	X976	MALEA	P976	MALE*	ALALEA
992 RAMS 996	X993	RALEMS	P993	RALE*	ALALEMS

Fig 1

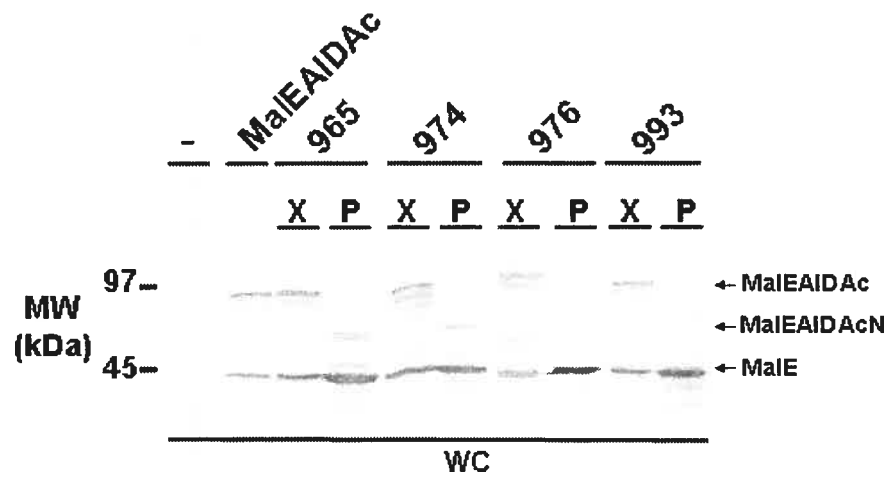


Fig 2

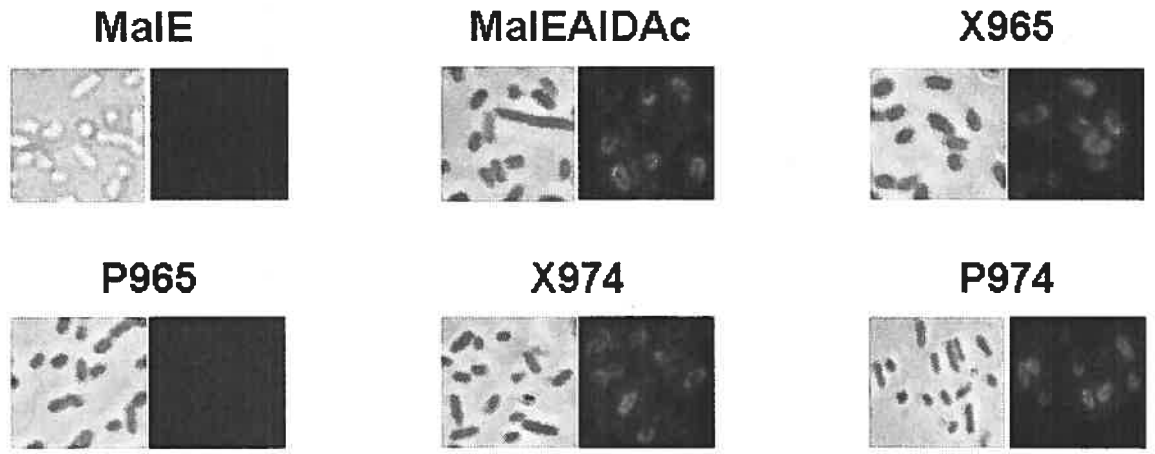


Fig 3

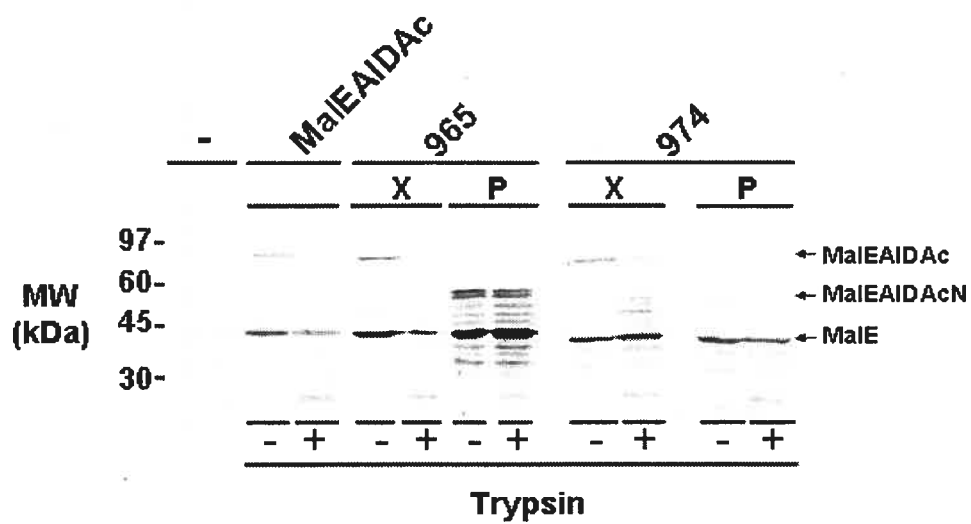


Fig 4

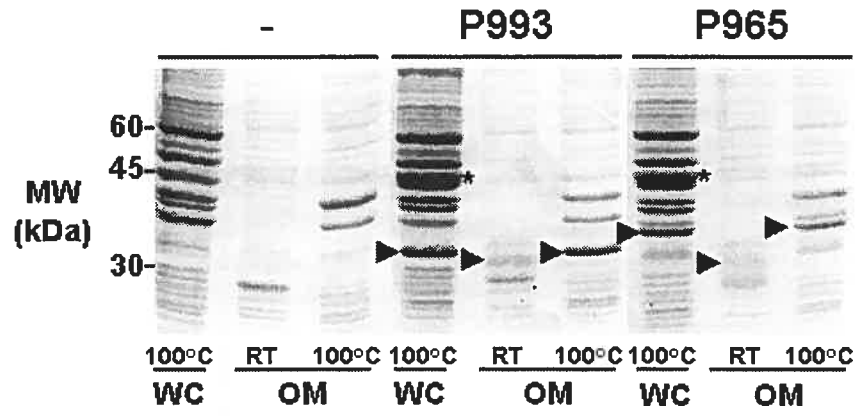


Fig 5

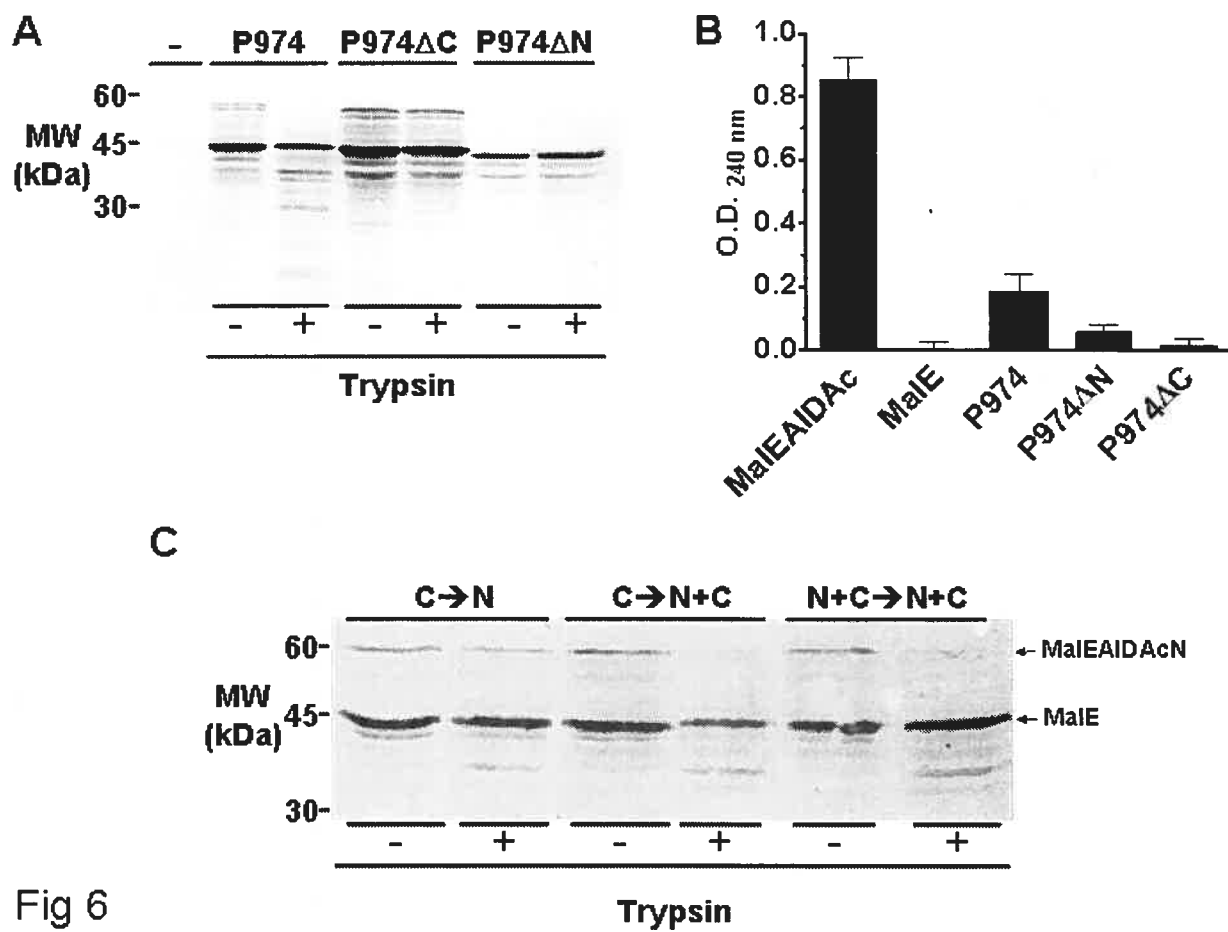


Fig 6

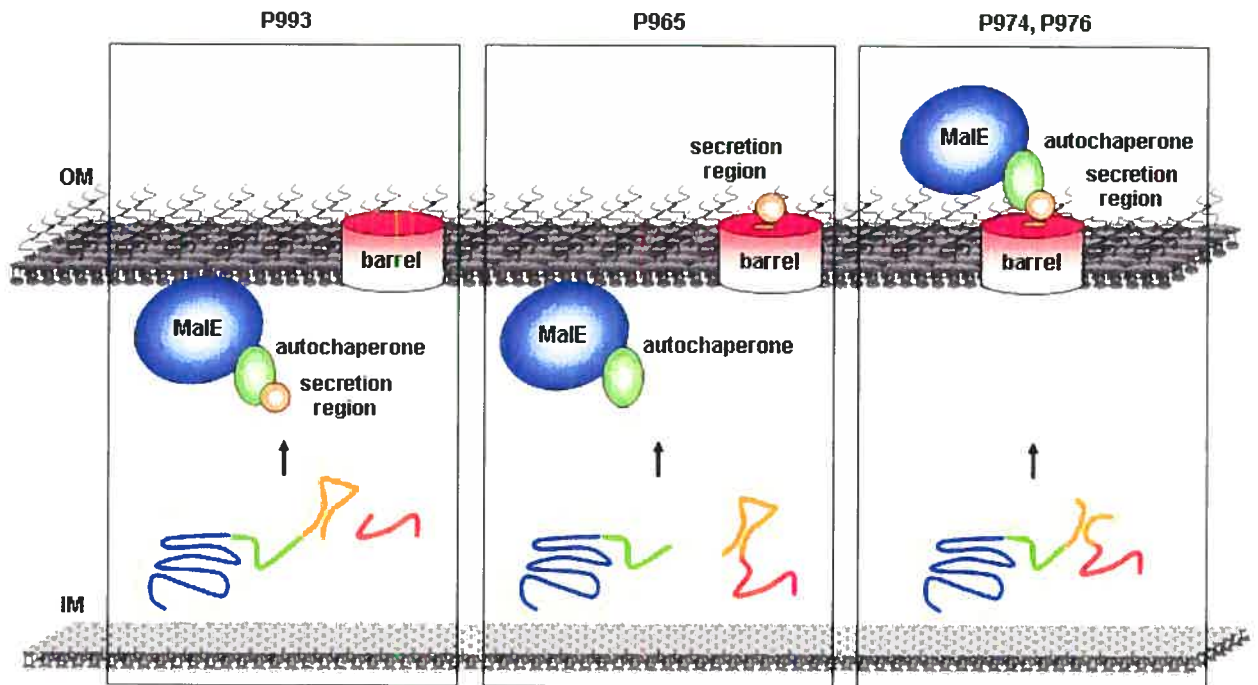


Fig 7

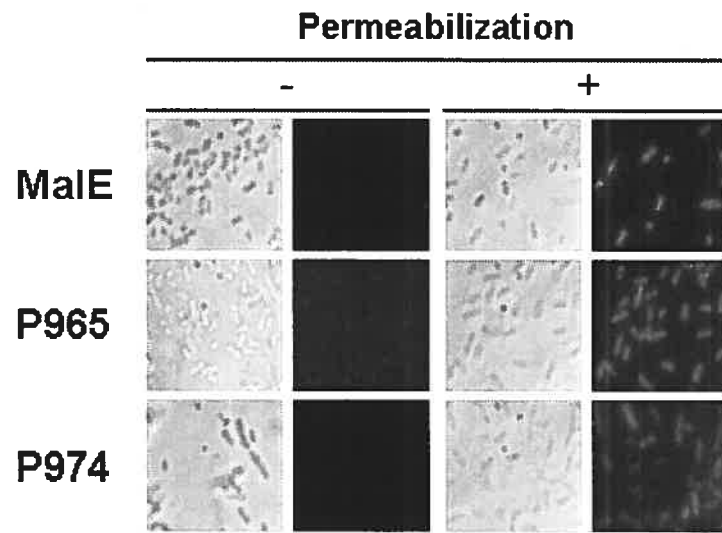


Fig S1

DISCUSSION

Discussion

La sécrétion de protéines à travers l'enveloppe bactérienne est cruciale pour les bactéries, particulièrement pour les bactéries pathogènes. Les bactéries à Gram négatif possèdent deux membranes qui doivent être traversées par les protéines avant de rejoindre soit la couche externe de la ME, soit le milieu extracellulaire [1]. À cette fin, les bactéries à Gram négatif ont développé différents systèmes de sécrétion. Des exemples de systèmes de ce genre sont les systèmes de sécrétion de type II et V, le système chaperone-usher ainsi que, dans certains cas, le système de sécrétion de type IV [120]. Une importante question est de comprendre pourquoi il y a une telle redondance et une telle diversité dans les systèmes de sécrétion effectuant, apparemment, la même tâche. Une réponse pourrait être que les différents systèmes sont requis afin d'accommoder les besoins particuliers des différentes catégories de substrats. Une telle notion apporterait beaucoup sur l'aspect fondamental mais pourrait aussi amener de nouvelles approches permettant le développement de drogues antibactériennes ainsi que le design de systèmes permettant le "display de drogues" ainsi que le "display" de produits ayant des applications biotechnologiques et médicales.

Le système de sécrétion de type V apparaît comme un système très simple et très versatile comparativement aux autres systèmes permettant le transport des protéines du périplasme à la ME ou au milieu extracellulaire [3,4]. Cependant, le mécanisme de translocation du système de sécrétion de type V est toujours sujet au débat. Certains auteurs suggèrent que le domaine passager des ATs doit rester dans une conformation compatible avec la translocation et donc dans un état principalement déplié [3,4]. Ces résultats vont dans le même sens que ce qui a été observé pour les gros domaines extracellulaires N-terminaux des protéines de la ME comme les invasines et l'intimine [121]. D'autres groupes ont montré qu'un polypeptide replié pouvait efficacement être transloqué [13,14]. La récente détermination de la structure d'une UT d'un AT n'a pas apporté beaucoup de support à l'une ou l'autre de ces hypothèses mais a plutôt favorisé un autre modèle, où la translocation nécessiterait une machinerie de la ME centrée autour de Omp85 [54].

Nous avons décidé de déterminer l'effet du repliement sur la translocation en utilisant une nouvelle méthode d'étude. En effet, à notre connaissance, toutes les articles publiés étudiant l'effet du repliement sur la translocation ont utilisé la formation des ponts disulfures comme "marqueur" de repliement [7,8,9,10,11,12,13,14]. Afin de pouvoir comparer l'efficacité de translocation d'un domaine passager déplié versus celle d'un domaine passager replié, les études ont modifié la capacité de ces domaines à créer des ponts disulfures. Les ponts disulfures sont des liens covalents forts qui, par oxydation, réunissent deux cystéines lors de l'acquisition d'une structure et ils sont donc généralement associés avec le repliement de la protéine. La formation de ces ponts peut être prévenue soit en mutant directement les cystéines qui permettent la formation de ces ponts disulfures, soit en changeant l'environnement oxydo-réducteur du périplasma. En effet, le périplasma est un environnement oxydatif, où la formation de ponts disulfures y est naturellement possible. Cependant, la formation de ces liens nécessite l'intervention de plusieurs protéines, notamment DsbA qui en catalyse la formation [102]. Il est donc possible d'empêcher une bactérie de former de ponts disulfures en créant une souche mutante pour la protéine DsbA ou en ajoutant du β -mercaptoéthanol au milieu de culture, ce qui permet de briser les ponts disulfures formés par DsbA [16]. Cependant, toutes ces modifications peuvent avoir des effets globaux incontrôlés sur le périplasma ou sur le domaine passager lui-même en affectant son repliement et donc sa structure. De plus, la présence ou l'absence de ponts disulfures ne peut pas toujours corrélérer avec la présence ou l'absence de structures secondaires ou tertiaires entre les cystéines puisque cela dépend de la distance entre elles. De plus, avec ce genre d'approche il a été reporté que la protéine OmpA était transloquée à travers la MI par le système *sec* dans une conformation repliée, alors qu'il est généralement accepté que ce système exporte des protéines dépliées [122].

Notre premier objectif était donc de mettre au point un système d'étude de la translocation en utilisant un domaine passager hétérologue sans cystéine. Pour ce faire, nous avons utilisé la protéine affine pour le maltose MalE, ainsi que des mutants de MalE ayant des défauts de repliement intrinsèques. En limitant nos manipulations à la modification de l'habileté de repliement des domaines passagers, nous espérons tester l'hypothèse de la nécessité d'une conformation compatible avec la translocation. Les résultats que nous avons obtenus nous

permettent d'affirmer que le domaine passager doit effectivement être dans une conformation compatible avec la translocation afin que celle-ci soit efficace. Nous avons également pu déterminer que cette conformation doit être dépliée. Cependant, nous croyons que ce n'est pas seulement à cause de la taille qu'une protéine repliée ne peut pas être transloquée mais que la "nature" du repliement pourrait aussi avoir un effet. Trois raisons peuvent être envisagées pour expliquer l'interférence du repliement avec la translocation : (i) la taille du polypeptide, une fois replié, doit rester sous une certaine limite pour être compatible avec la taille du canal de translocation, (ii) la forme du polypeptide replié doit aussi respecter les contraintes du canal de translocation et finalement, (iii) les caractéristiques de repliement de certains polypeptides (par exemple, la vitesse de repliement, le recrutement de chaperones ou autres) pourraient les forcer à transiter vers le périplasma et ainsi prévenir leur translocation. La taille semble être critique quel que soit le modèle de translocation considéré, ce qui n'est pas surprenant vu le diamètre limité du pore de translocation. Cependant, les domaines passagers natifs des ATs ont toujours une taille d'au moins 300 aa. Le facteur limitant pourrait donc être la forme du domaine passager plutôt que la taille en elle-même. En effet, des analyses sur les domaines passagers natifs des ATs suggèrent une préférence pour des hélices β [123]. Ces prédictions ont été confirmées par la structure résolue à ce jour de deux domaines passagers d'ATs soit la pertactine de *Bordetella pertussis* [124] et l'hémoglobine protéase de *E. coli* [125] (Figure 7). Le même type de repliement est retrouvé dans les deux structures, il consiste en une hélice β droite parallèle. Cette hélice a une forme cylindrique avec un diamètre de 20 à 30 Å et une longueur de 100 à 140 Å. Cependant, dans les deux structures, des boucles additionnelles ou des domaines complets augmentent considérablement le diamètre du cylindre, jusqu'à 80 Å. Toutes les informations disponibles semblent suggérer que des domaines d'environ 20 Å pourraient être transloqués, même repliés, mais que les domaines plus gros comme ceux des domaines passagers natifs des ATs devraient rester dépliés ou du moins partiellement dépliés pour être transloqués. Conséquemment, il serait possible qu'un mécanisme existe afin de prévenir le repliement prématuré dans le périplasma et/ou qu'un couplage précis existe entre le repliement et la translocation. Le repliement en hélice β typique des domaines passagers des ATs pourrait être adapté à ce mécanisme putatif.

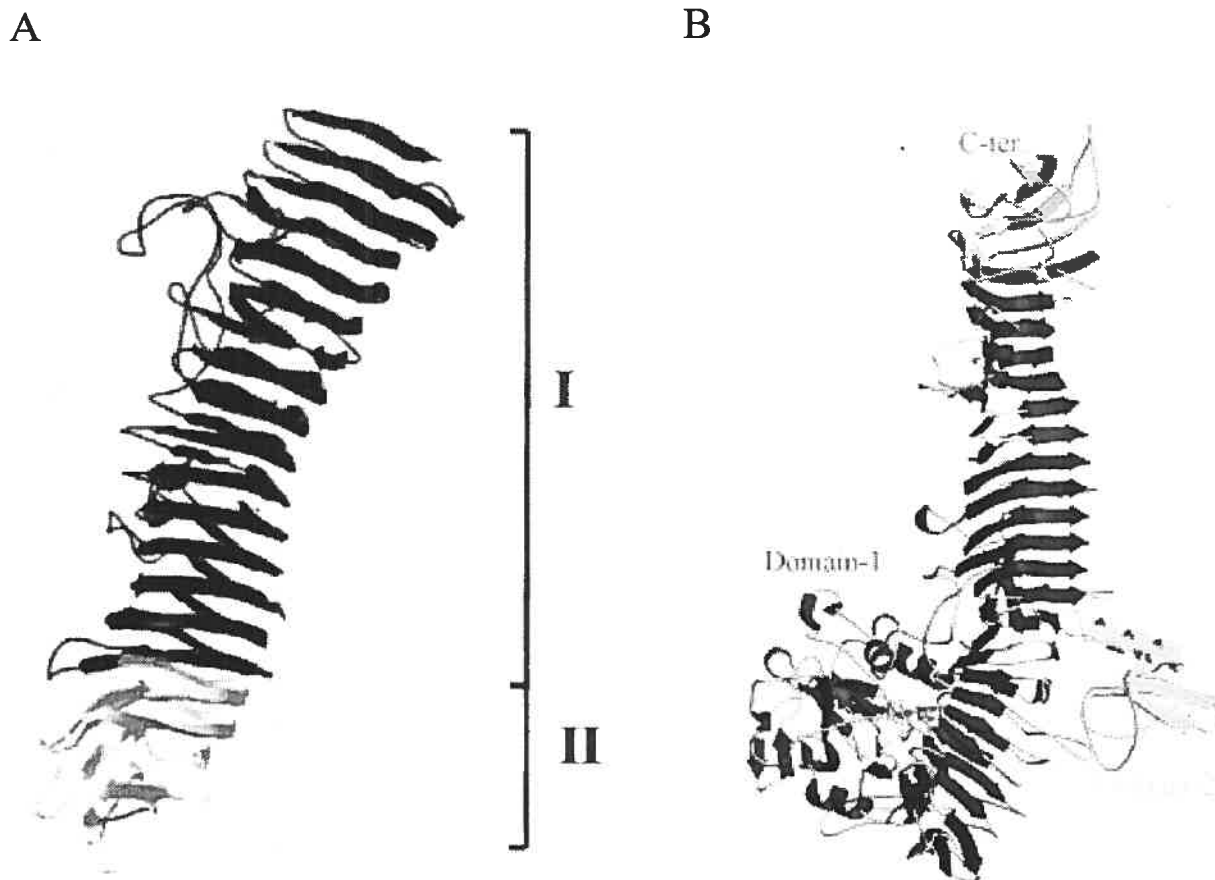


Figure 7: Structures cristallographiques du domaine passager de deux autotransporteurs: (A) La pertactine de *B. pertussis*. Le domaine I correspond au domaine passager et le domaine II correspond au domaine autochaperone, (B) Structure complète du domaine passager de l'hémoglobine protéase de *E. coli*. Le domaine 1 représente le domaine protéase et le domaine 2 représente le "chitinase b-like domain". Figures adaptés de (A) Emsley P, et al. (1996) et de (B) Otto BR, et al. (2005).

Comme toutes les protéines de la ME, les ATs sont composés d'une tonneau β qui s'insère dans la membrane [3]. Le repliement des tonneaux débute dans le périplasma à cause de la présence des aa hydrophobes. La suite du repliement est intimement couplée à l'insertion dans la ME tel que démontré pour la porine OmpA de *E. coli* [20]. Les tonneaux β des ATs ne font à priori pas exception et il est logique de penser qu'ils commencent leur repliement

dans le périplasme. Nous avons voulu savoir s'il y avait d'autres interactions entre les différents domaines d'un AT.

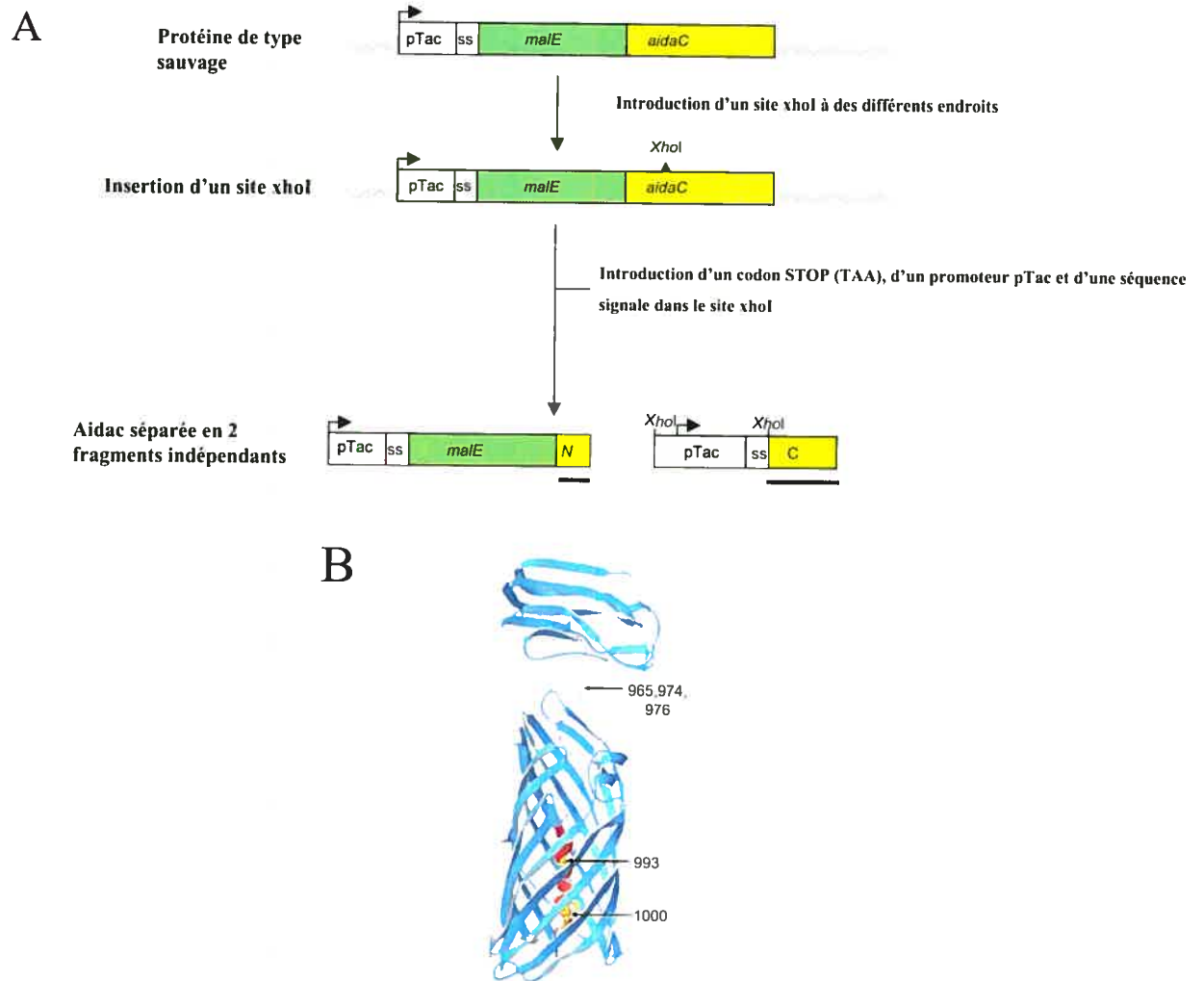


Figure 8: Construction de fragments indépendants complémentaires de la protéine MalEAidac. (A) Représentation schématique du design utilisé afin de générer les différentes constructions (soit juste avec l'insertion du site XhoI soit la protéine séparée en deux fragments). Les sites de restriction XhoI ont été insérés par mutagenèse dirigée et ensuite utilisés afin d'insérer dans le bon cadre de lecture, une cassette contenant un codon stop, un promoteur et la séquence signal de MalE (B) Modèle de la structure tertiaire de Aidac. Les positions où les sites de restriction XhoI ont été insérés sont indiquées.

Nous avons donc testé la présence d'une interaction en considérant qu'elle résulterait d'un certain repliement. Nous avons mis au point un système consistant à séparer Aidac en deux domaines indépendants avec le domaine N-terminal fusionné à MalE (Figure 8A). Nous avons utilisé la séquence prédite de Aidac afin de sélectionner les différents sites de séparation (Figure 8B). Nous avons réussi à identifier un site entre le domaine autochaperone et l'UT où la reconstitution est possible. Nous avons donc identifié un site d'interaction probable suggérant un repliement, du moins partiel, entre le domaine autochaperone et l'UT. Cette interaction rappelle la situation des tonneaux β des PME qui commencent leur repliement dans le périplasma, avant l'insertion dans la ME [126]. De plus, cela avait déjà été postulé pour Aidac pour lequel il a été observé des différences de stabilité *in vitro* et de repliement de la protéine pure, selon que le domaine autochaperone soit absent ou présent [44].

Cependant, nous croyons que l'interaction avec l'UT se fait par la toute fin de l'extrémité C-terminale du domaine autochaperone, région située immédiatement avant le début de l'hélice α . Cela est cohérent avec les études précédentes qui ont démontré que l'unité minimale de translocation ne comprenait pas le domaine autochaperone et que sa présence n'était pas nécessaire [42,51]. Sans donnée structurale, il est difficile de délimiter avec précision les domaines et nous pensons que l'extrémité C-terminale du domaine autochaperone ait pu être incluse dans l'unité minimale de translocation. Cela serait aussi consistant avec l'impossibilité de reconstituer les deux fragments indépendants lorsqu'on sépare le domaine autochaperone un peu moins près du C-terminal. Dans le même ordre d'idée, il semblerait que ce soit l'extrémité N-terminale de l'hélice qui soit important dans cette interaction puisque nous n'avons pas observé de reconstitution en coupant plus loin dans la séquence de l'hélice. Nos résultats semblent donc indiquer qu'il y aurait un repliement périplasmique non seulement du tonneau β lui-même mais aussi de l'extrémité C-terminale du domaine autochaperone avec l'extrémité N-terminale de l'UT. De plus, lorsque nous avons effectué une prédiction de la structure tertiaire de Aidac (Figure 8) (voir deuxième article contenu dans ce mémoire) par alignements de séquences, nous avons observé une région entre le domaine autochaperone et l'hélice α prédits qui ne s'alignait avec aucune structure contenue dans la base de données. Cette région pourrait être le

domaine permettant l'interaction entre le domaine autochaperone et l'UT, et lorsqu'on coupe avant ou après cette structure, la reconstitution ne semble pas possible.

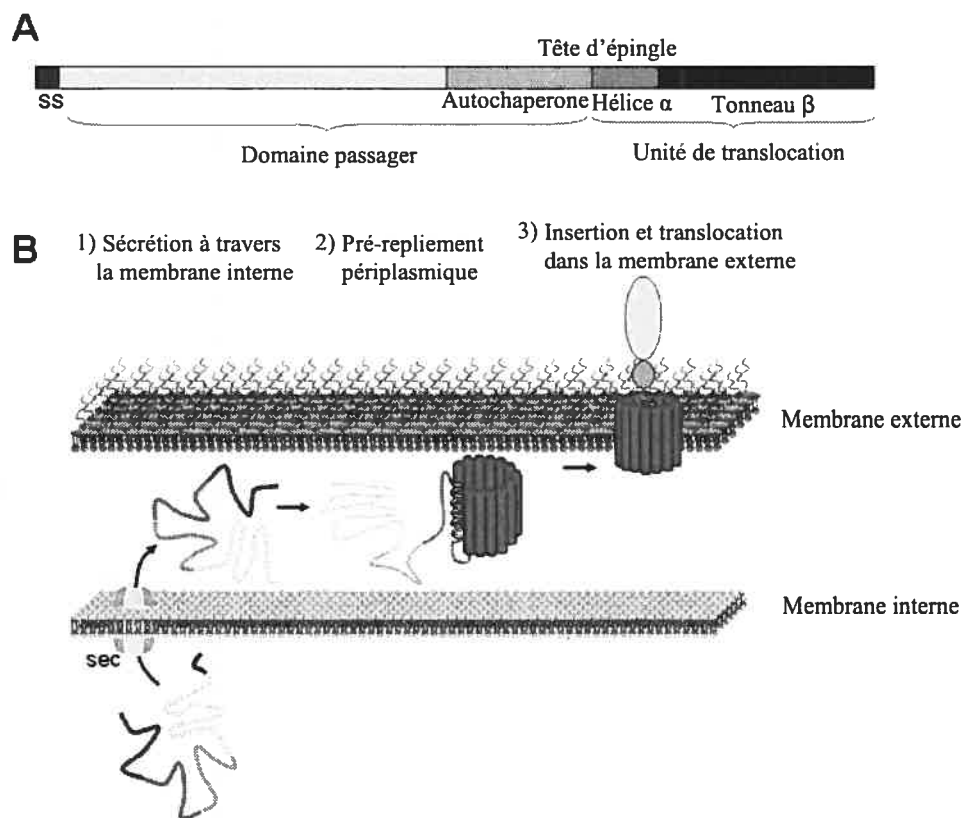


Figure 9: Nouveau modèle pour le mécanisme des ATs. (A). Nous avons identifié un site d'interaction situé entre le domaine autochaperone et l'UT. Nous suggérons que ce domaine d'interaction forme une structure en tête d'épingle qui est essentielle à la translocation. Ce domaine est identifié comme « tête d'épingle ». L'unité de translocation comprend le tonneau β ainsi que l'hélice α . SS, séquence signal. (B) Notre nouveau modèle comprend les étapes habituelles mais nous avons ajouté un intermédiaire périplasmique où le tonneau β ainsi que le nouveau domaine formant une structure en tête d'épingle se replient.

Cette interaction pourrait résulter en la formation d'une structure en tête d'épingle qui pourrait participer à la translocation. Nous avons élaboré un nouveau modèle de translocation puisque nous avons identifié pour la première fois l'existence d'une interaction

non-covalente entre le domaine inséré dans la membrane et le domaine transloqué qui inclue le domaine passager ainsi que le domaine autochaperone. De plus, nos résultats favorisent l'hypothèse que l'insertion et la translocation sont des événements simultanés puisque l'interaction que nous avons observée a lieu dans le périplasma et non à la membrane. La figure 9 représente le modèle que nous proposons: une fois dans le périplasma, le tonneau ainsi que le domaine entre l'UT et le domaine autochaperone commencent à se replier. Ensuite, la protéine s'insère dans la ME et le domaine passager est transloqué soit spontanément soit grâce à la machinerie Omp85.

Le domaine autochaperone pourrait interagir avec le domaine passager et participer à son repliement [43,127] et/ou fournir l'énergie nécessaire à la translocation [4] comme ce fût déjà proposé. Nos résultats de reconstitution sont d'autant plus intéressants que les ATs sont classés dans la même famille que les TPS [3,4]. Les TPS ont la même organisation structurale que les ATs à l'exception que les deux domaines sont codés par deux polypeptides différents. Dans le cas des TPS, une reconnaissance entre les domaines est donc essentielle [5]. Nous avons donc transformé un AT en TPS et démontré que chez les ATs, il y a aussi une reconnaissance entre deux domaines. Malgré la différence dans la taille des régions interagissant entre elles, nos résultats suggèrent que les ATs ainsi que les TPS ont une mécanique de fonctionnement similaire où une interaction prend place entre le domaine transporteur et la partie sécrétée.

CONCLUSION

Conclusion

Les études sur les ATs permettent d'augmenter nos connaissances fondamentales sur les systèmes de sécrétion. Cela permettra peut-être un jour de comprendre pourquoi une telle diversité existe au sein des systèmes de sécrétion. De plus, plus nous posséderons d'informations sur le mécanisme des ATs, plus il sera facile de les utiliser à leur plein potentiel dans les domaines médical et biotechnologique. En effet, comme mentionné dans la recension de la littérature, les ATs sont d'excellents candidats pour le "surface display", entre autre pour le développement de vaccins, l'expression d'enzymes hétérologues d'intérêts biotechnologiques ainsi que la sélection de bibliothèques de peptides ou de protéines.

Au cours de mes études, j'ai pu démontrer que le repliement du domaine passager est incompatible avec la translocation à la surface par un AT. Notre étude utilisait un domaine passager ne contenant pas de cystéine, par opposition à toutes les études précédentes concernant l'étude de l'effet du repliement sur la translocation. Nous croyons que cette approche est plus adaptée pour étudier l'effet du repliement parce qu'elle ne modifie en rien l'état naturel de la bactérie. En effet, les études précédentes utilisaient des approches qui pouvaient avoir des effets généraux incontrôlés sur la bactérie et/ou sur le domaine passager lui-même. Ces résultats ont été obtenus en utilisant une protéine périplasmique comme domaine passager malgré le fait que cette protéine soit de plus petite taille que les domaines passagers natifs des ATs. Il semble donc que le domaine passager doive adopter une conformation qui soit compatible avec la translocation et que, afin de maintenir cette conformation, il pourrait bénéficier de l'intervention de chaperones périplasmiques [14], et/ou de l'effet intramoléculaire du domaine autochaperone [43]. Nous croyions donc que non seulement la taille mais aussi le type de repliement sont des critères importants. Il a été observé que tous les domaines passagers natifs des ATs ont une structure prédite d'hélice parallèle β droite et que cette structure doit être adaptée à la translocation [123]. Le domaine passager que nous avons utilisé, MalE, est beaucoup plus petit en taille que les domaines passagers natifs. Par contre, sa structure semble beaucoup moins adaptée à ce mécanisme.

Contrairement à ce que nous avons observé concernant le repliement du domaine passager, nous avons démontré que le domaine autochaperone ainsi que l'UT se repliaient. En effet, nous avons identifié un endroit entre le domaine autochaperone et l'UT permettant la reconstitution de Aidac séparé en deux fragments indépendants. Cette reconstitution pourrait signifier que ces deux domaines se replient ensemble dans le périplasma. Le tonneau β serait, comme tous les tonneaux qui s'insèrent dans la ME, replié en partie dans le périplasma avant l'insertion finale dans la ME. L'observation d'une interaction entre le domaine autochaperone et l'UT suggère que cette région pourrait constituer un domaine indispensable à la translocation. Ce domaine pourrait adopter une structure en tête d'épingle et ainsi aider à diriger la translocation. Nous avons donc proposé un nouveau modèle où l'intermédiaire périplasmique est dans un certain état de repliement. Cependant, comme mentionné plus haut, ce repliement doit rester compatible avec la translocation. Finalement, il semblerait que le mécanisme des ATs que l'on croyait si simple comporte quelques restrictions. D'autres études sont nécessaires afin d'approfondir les mécanismes d'insertion et de translocation.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

1. Henderson IR, Nataro JP: **Virulence functions of autotransporter proteins.** *Infect Immun* 2001, **69**:1231-1243.
2. Cotter SE, Surana NK, St Geme JW, 3rd: **Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins.** *Trends Microbiol* 2005, **13**:199-205.
3. Desvaux M, Parham NJ, Henderson IR: **The autotransporter secretion system.** *Res Microbiol* 2004, **155**:53-60.
4. Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D: **Type V protein secretion pathway: the autotransporter story.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2004, **68**:692-744.
5. Jacob-Dubuisson F, Fernandez R, Coutte L: **Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1694**:235-257.
6. de Keyzer J, van der Does C, Driessen AJ: **The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex.** *Cell Mol Life Sci* 2003, **60**:2034-2052.
7. Klauser T, Pohlner J, Meyer TF: **Extracellular transport of cholera toxin B subunit using *Neisseria* IgA protease beta-domain: conformation-dependent outer membrane translocation.** *Embo J* 1990, **9**:1991-1999.
8. Klauser T, Pohlner J, Meyer TF: **Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of *Neisseria* Iga beta-mediated outer membrane transport.** *Embo J* 1992, **11**:2327-2335.
9. Suzuki T, Lett MC, Sasakawa C: **Extracellular transport of VirG protein in *Shigella*.** *J Biol Chem* 1995, **270**:30874-30880.
10. Brandon LD, Goldberg MB: **Periplasmic transit and disulfide bond formation of the autotransported *Shigella* protein IcsA.** *J Bacteriol* 2001, **183**:951-958.
11. Konieczny MP, Suhr M, Noll A, Autenrieth IB, Alexander Schmidt M: **Cell surface presentation of recombinant (poly-) peptides including functional T-cell epitopes by the AIDA autotransporter system.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000, **27**:321-332.
12. Lattemann CT, Maurer J, Gerland E, Meyer TF: **Autodisplay: functional display of active beta-lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter.** *J Bacteriol* 2000, **182**:3726-3733.
13. Veiga E, de Lorenzo V, Fernandez LA: **Probing secretion and translocation of a beta-autotransporter using a reporter single-chain Fv as a cognate passenger domain.** *Mol Microbiol* 1999, **33**:1232-1243.
14. Veiga E, de Lorenzo V, Fernandez LA: **Structural tolerance of bacterial autotransporters for folded passenger protein domains.** *Mol Microbiol* 2004, **52**:1069-1080.
15. Jose J, Zangen D: **Autodisplay of the protease inhibitor aprotinin in *Escherichia coli*.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **333**:1218-1226.
16. Jose J, Kramer J, Klauser T, Pohlner J, Meyer TF: **Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to**

- the *Escherichia coli* cell surface via the Iga beta autotransporter pathway. *Gene* 1996, **178**:107-110.
17. Skillman KM, Barnard TJ, Peterson JH, Ghirlando R, Bernstein HD: **Efficient secretion of a folded protein domain by a monomeric bacterial autotransporter.** *Mol Microbiol* 2005, **58**:945-958.
 18. Benz I, Schmidt MA: **Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*.** *Infect Immun* 1989, **57**:1506-1511.
 19. Brandon LD, Goehring N, Janakiraman A, Yan AW, Wu T, Beckwith J, Goldberg MB: **IcsA, a polarly localized autotransporter with an atypical signal peptide, uses the Sec apparatus for secretion, although the Sec apparatus is circumferentially distributed.** *Mol Microbiol* 2003, **50**:45-60.
 20. Kleinschmidt JH, den Blaauwen T, Driessen AJ, Tamm LK: **Outer membrane protein A of *Escherichia coli* inserts and folds into lipid bilayers by a concerted mechanism.** *Biochemistry* 1999, **38**:5006-5016.
 21. Letoffe S, Wecker K, Delepierre M, Delepelaire P, Wandersman C: **Activities of the *Serratia marcescens* heme receptor HasR and isolated plug and beta-barrel domains: the beta-barrel forms a heme-specific channel.** *J Bacteriol* 2005, **187**:4637-4645.
 22. Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, et al.: **The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12.** *Science* 1997, **277**:1453-1474.
 23. Perna NT, Plunkett G, 3rd, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA, et al.: **Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.** *Nature* 2001, **409**:529-533.
 24. Welch RA, Burland V, Plunkett G, 3rd, Redford P, Roesch P, Rasko D, Buckles EL, Liou SR, Boutin A, Hackett J, et al.: **Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:17020-17024.
 25. Nataro JP, Kaper JB: **Diarrheagenic *Escherichia coli*.** *Clin Microbiol Rev* 1998, **11**:142-201.
 26. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL: **Pathogenic *Escherichia coli*.** *Nat Rev Microbiol* 2004, **2**:123-140.
 27. Girard V, Mourez M: **Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: structural and functional features.** *Res Microbiol* 2006, **157**:407-416.
 28. Torres AG, Zhou X, Kaper JB: **Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells.** *Infect Immun* 2005, **73**:18-29.
 29. Gruenheid S, Sekirov I, Thomas NA, Deng W, O'Donnell P, Goode D, Li Y, Frey EA, Brown NF, Metalnikov P, et al.: **Identification and characterization of NleA, a non-LEE-encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.** *Mol Microbiol* 2004, **51**:1233-1249.
 30. Mellies JL, Navarro-Garcia F, Okeke I, Frederickson J, Nataro JP, Kaper JB: **espC pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin.** *Infect Immun* 2001, **69**:315-324.
 31. Nataro JP, Deng Y, Maneval DR, German AL, Martin WC, Levine MM: **Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence**

- to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun* 1992, **60**:2297-2304.
32. Czczulin JR, Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R, Kothary MH, Navarro-Garcia F, Nataro JP: **Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*.** *Infect Immun* 1997, **65**:4135-4145.
 33. Cookson ST, Nataro JP: **Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*.** *Microb Pathog* 1996, **21**:421-434.
 34. Yamamoto T, Kaneko M, Changchawalit S, Serichantalergs O, Ijuin S, Echeverria P: **Actin accumulation associated with clustered and localized adherence in *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea.** *Infect Immun* 1994, **62**:2917-2929.
 35. Delepelaire P: **Type I secretion in gram-negative bacteria.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1694**:149-161.
 36. Filloux A: **The underlying mechanisms of type II protein secretion.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1694**:163-179.
 37. Voulhoux R, Ball G, Ize B, Vasil ML, Lazdunski A, Wu LF, Filloux A: **Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway.** *Embo J* 2001, **20**:6735-6741.
 38. Ghosh P: **Process of protein transport by the type III secretion system.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2004, **68**:771-795.
 39. Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson WC, Heidelberg JF, Mekalanos JJ: **Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the Dictyostelium host model system.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:1528-1533.
 40. Pohlner J, Halter R, Beyreuther K, Meyer TF: **Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease.** *Nature* 1987, **325**:458-462.
 41. Klauser T, Kramer J, Otzelberger K, Pohlner J, Meyer TF: **Characterization of the *Neisseria* Iga beta-core. The essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion.** *J Mol Biol* 1993, **234**:579-593.
 42. Oliver DC, Huang G, Fernandez RC: **Identification of secretion determinants of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter.** *J Bacteriol* 2003, **185**:489-495.
 43. Oliver DC, Huang G, Nodel E, Pleasance S, Fernandez RC: **A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain.** *Mol Microbiol* 2003, **47**:1367-1383.
 44. Mogensen JE, Tapadar D, Schmidt MA, Otzen DE: **Barriers to folding of the transmembrane domain of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence.** *Biochemistry* 2005, **44**:4533-4545.
 45. Sijbrandi R, Urbanus ML, ten Hagen-Jongman CM, Bernstein HD, Oudega B, Otto BR, Luirink J: **Signal recognition particle (SRP)-mediated targeting and Sec-dependent translocation of an extracellular *Escherichia coli* protein.** *J Biol Chem* 2003, **278**:4654-4659.
 46. Peterson JH, Szabady RL, Bernstein HD: **An unusual signal peptide extension inhibits the binding of bacterial presecretory proteins to the signal recognition particle, trigger factor and the SecYEG complex.** *J Biol Chem* 2006.

47. Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP: **The great escape: structure and function of the autotransporter proteins.** *Trends Microbiol* 1998, **6**:370-378.
48. Szabady RL, Peterson JH, Skillman KM, Bernstein HD: **An unusual signal peptide facilitates late steps in the biogenesis of a bacterial autotransporter.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:221-226.
49. Wedemeyer WJ, Welker E, Narayan M, Scheraga HA: **Disulfide bonds and protein folding.** *Biochemistry* 2000, **39**:4207-4216.
50. Ruiz N, Silhavy TJ: **Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope.** *Curr Opin Microbiol* 2005, **8**:122-126.
51. Maurer J, Jose J, Meyer TF: **Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions.** *J Bacteriol* 1999, **181**:7014-7020.
52. Loveless BJ, Saier MH, Jr.: **A novel family of channel-forming, autotransporting, bacterial virulence factors.** *Mol Membr Biol* 1997, **14**:113-123.
53. Hendrixson DR, de la Morena ML, Stathopoulos C, St Geme JW, 3rd: **Structural determinants of processing and secretion of the *Haemophilus influenzae* hap protein.** *Mol Microbiol* 1997, **26**:505-518.
54. Oomen CJ, van Ulsen P, van Gelder P, Feijen M, Tommassen J, Gros P: **Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter.** *Embo J* 2004, **23**:1257-1266.
55. Veiga E, Sugawara E, Nikaido H, de Lorenzo V, Fernandez LA: **Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains.** *Embo J* 2002, **21**:2122-2131.
56. Muller D, Benz I, Tapadar D, Buddenborg C, Greune L, Schmidt MA: **Arrangement of the translocator of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence on the bacterial surface.** *Infect Immun* 2005, **73**:3851-3859.
57. Voulhoux R, Bos MP, Geurtsen J, Mols M, Tommassen J: **Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly.** *Science* 2003, **299**:262-265.
58. Wu T, Malinverni J, Ruiz N, Kim S, Silhavy TJ, Kahne D: **Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*.** *Cell* 2005, **121**:235-245.
59. Fink DL, Cope LD, Hansen EJ, Geme JW, 3rd: **The *Hemophilus influenzae* Hap autotransporter is a chymotrypsin clan serine protease and undergoes autoproteolysis via an intermolecular mechanism.** *J Biol Chem* 2001, **276**:39492-39500.
60. Egile C, d'Hauteville H, Parsot C, Sansonetti PJ: **SopA, the outer membrane protease responsible for polar localization of IcsA in *Shigella flexneri*.** *Mol Microbiol* 1997, **23**:1063-1073.
61. Suhr M, Benz I, Schmidt MA: **Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDA_c and evidence for the outer membrane anchoring as a beta-barrel structure.** *Mol Microbiol* 1996, **22**:31-42.
62. Fang Y, Ngeleka M, Middleton DM, Simko E: **Characterization and immunodetection of AIDA-I adhesin isolated from porcine *Escherichia coli*.** *Vet Microbiol* 2005, **109**:65-73.

63. Benz I, Schmidt MA: **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* 1992, **6**:1539-1546.
64. Mogensen JE, Kleinschmidt JH, Schmidt MA, Otzen DE: **Misfolding of a bacterial autotransporter.** *Protein Sci* 2005, **14**:2814-2827.
65. Moormann C, Benz I, Schmidt MA: **Functional substitution of the TibC protein of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains for the autotransporter adhesin heptosyltransferase of the AIDA system.** *Infect Immun* 2002, **70**:2264-2270.
66. Wentzel A, Christmann A, Adams T, Kolmar H: **Display of passenger proteins on the surface of *Escherichia coli* K-12 by the enterohemorrhagic *E. coli* intimin EaeA.** *J Bacteriol* 2001, **183**:7273-7284.
67. Lee SY, Choi JH, Xu Z: **Microbial cell-surface display.** *Trends Biotechnol* 2003, **21**:45-52.
68. Samuelson P, Gunneriusson E, Nygren PA, Stahl S: **Display of proteins on bacteria.** *J Biotechnol* 2002, **96**:129-154.
69. Kramer U, Rizos K, Apfel H, Autenrieth IB, Lattemann CT: **Autodisplay: development of an efficacious system for surface display of antigenic determinants in *Salmonella* vaccine strains.** *Infect Immun* 2003, **71**:1944-1952.
70. Jose J: **Autodisplay: efficient bacterial surface display of recombinant proteins.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, **69**:607-614.
71. Jose J, von Schwichow S: **Autodisplay of active sorbitol dehydrogenase (SDH) yields a whole cell biocatalyst for the synthesis of rare sugars.** *Chembiochem* 2004, **5**:491-499.
72. Jose J, Bernhardt R, Hannemann F: **Cellular surface display of dimeric Adx and whole cell P450-mediated steroid synthesis on *E. coli*.** *J Biotechnol* 2002, **95**:257-268.
73. Chen W, Georgiou G: **Cell-Surface display of heterologous proteins: From high-throughput screening to environmental applications.** *Biotechnol Bioeng* 2002, **79**:496-503.
74. Wentzel A, Christmann A, Kratzner R, Kolmar H: **Sequence requirements of the GPNG beta-turn of the *Ecballium elaterium* trypsin inhibitor II explored by combinatorial library screening.** *J Biol Chem* 1999, **274**:21037-21043.
75. Charbit A, Boulain JC, Ryter A, Hofnung M: **Probing the topology of a bacterial membrane protein by genetic insertion of a foreign epitope; expression at the cell surface.** *Embo J* 1986, **5**:3029-3037.
76. Agterberg M, Adriaanse H, Tommassen J: **Use of outer membrane protein PhoE as a carrier for the transport of a foreign antigenic determinant to the cell surface of *Escherichia coli* K-12.** *Gene* 1987, **59**:145-150.
77. Xu Z, Lee SY: **Display of polyhistidine peptides on the *Escherichia coli* cell surface by using outer membrane protein C as an anchoring motif.** *Appl Environ Microbiol* 1999, **65**:5142-5147.
78. Chang HJ, Sheu SY, Lo SJ: **Expression of foreign antigens on the surface of *Escherichia coli* by fusion to the outer membrane protein traT.** *J Biomed Sci* 1999, **6**:64-70.
79. Etz H, Minh DB, Schellack C, Nagy E, Meinke A: **Bacterial phage receptors, versatile tools for display of polypeptides on the cell surface.** *J Bacteriol* 2001, **183**:6924-6935.

80. Freudl R, MacIntyre S, Degen M, Henning U: **Cell surface exposure of the outer membrane protein OmpA of *Escherichia coli* K-12.** *J Mol Biol* 1986, **188**:491-494.
81. Jung HC, Lebeault JM, Pan JG: **Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*.** *Nat Biotechnol* 1998, **16**:576-580.
82. Westerlund-Wikstrom B: **Peptide display on bacterial flagella: principles and applications.** *Int J Med Microbiol* 2000, **290**:223-230.
83. Stentebjerg-Olesen B, Pallesen L, Jensen LB, Christiansen G, Klemm P: **Authentic display of a cholera toxin epitope by chimeric type 1 fimbriae: effects of insert position and host background.** *Microbiology* 1997, **143 (Pt 6)**:2027-2038.
84. Bingle WH, Nomellini JF, Smit J: **Cell-surface display of a *Pseudomonas aeruginosa* strain K pilin peptide within the paracrystalline S-layer of *Caulobacter crescentus*.** *Mol Microbiol* 1997, **26**:277-288.
85. Lee VT, Schneewind O: **Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections.** *Genes Dev* 2001, **15**:1725-1752.
86. Ruiz-Perez F, Leon-Kempis R, Santiago-Machuca A, Ortega-Pierres G, Barry E, Levine M, Gonzalez-Bonilla C: **Expression of the *Plasmodium falciparum* immunodominant epitope (NANP)(4) on the surface of *Salmonella enterica* using the autotransporter MisL.** *Infect Immun* 2002, **70**:3611-3620.
87. Rizos K, Lattemann CT, Bumann D, Meyer TF, Aebischer T: **Autodisplay: efficacious surface exposure of antigenic UreA fragments from *Helicobacter pylori* in *Salmonella* vaccine strains.** *Infect Immun* 2003, **71**:6320-6328.
88. Zhu C, Ruiz-Perez F, Yang Z, Mao Y, Hackethal VL, Greco KM, Choy W, Davis K, Butterton JR, Boedeker EC: **Delivery of heterologous protein antigens via hemolysin or autotransporter systems by an attenuated ler mutant of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*.** *Vaccine* 2006, **24**:3821-3831.
89. Becker S, Theile S, Heppeler N, Michalczyk A, Wentzel A, Wilhelm S, Jaeger KE, Kolmar H: **A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes.** *FEBS Lett* 2005, **579**:1177-1182.
90. McCafferty J, Jackson RH, Chiswell DJ: **Phage-enzymes: expression and affinity chromatography of functional alkaline phosphatase on the surface of bacteriophage.** *Protein Eng* 1991, **4**:955-961.
91. Klemm P, Schembri MA: **Bacterial adhesins: function and structure.** *Int J Med Microbiol* 2000, **290**:27-35.
92. Charbit A, Molla A, Saurin W, Hofnung M: **Versatility of a vector for expressing foreign polypeptides at the surface of gram-negative bacteria.** *Gene* 1988, **70**:181-189.
93. Georgiou G, Stephens DL, Stathopoulos C, Poetschke HL, Mendenhall J, Earhart CF: **Display of beta-lactamase on the *Escherichia coli* surface: outer membrane phenotypes conferred by Lpp'-OmpA'-beta-lactamase fusions.** *Protein Eng* 1996, **9**:239-247.
94. Kjaergaard K, Hasman H, Schembri MA, Klemm P: **Antigen 43-mediated autotransporter display, a versatile bacterial cell surface presentation system.** *J Bacteriol* 2002, **184**:4197-4204.

95. Valls M, de Lorenzo V: **Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution.** *FEMS Microbiol Rev* 2002, **26**:327-338.
96. Yang TH, Pan JG, Seo YS, Rhee JS: **Use of *Pseudomonas putida* EstA as an anchoring motif for display of a periplasmic enzyme on the surface of *Escherichia coli*.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:6968-6976.
97. Mogensen JE, Otzen DE: **Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins.** *Mol Microbiol* 2005, **57**:326-346.
98. Luirink J, Sinning I: **SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1694**:17-35.
99. Dalbey RE, Chen M: **Sec-translocase mediated membrane protein biogenesis.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1694**:37-53.
100. Holland IB: **Translocation of bacterial proteins--an overview.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1694**:5-16.
101. Neumann-Haefelin C, Schafer U, Muller M, Koch HG: **SRP-dependent co-translational targeting and SecA-dependent translocation analyzed as individual steps in the export of a bacterial protein.** *Embo J* 2000, **19**:6419-6426.
102. Collet JF, Bardwell JC: **Oxidative protein folding in bacteria.** *Mol Microbiol* 2002, **44**:1-8.
103. Miot M, Betton JM: **Protein quality control in the bacterial periplasm.** *Microb Cell Fact* 2004, **3**:4.
104. Schafer U, Beck K, Muller M: **Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins.** *J Biol Chem* 1999, **274**:24567-24574.
105. Spiess C, Beil A, Ehrmann M: **A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein.** *Cell* 1999, **97**:339-347.
106. Duguay AR, Silhavy TJ: **Quality control in the bacterial periplasm.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1694**:121-134.
107. Ades SE: **Control of the alternative sigma factor sigmaE in *Escherichia coli*.** *Curr Opin Microbiol* 2004, **7**:157-162.
108. Laird MW, Kloser AW, Misra R: **Assembly of LamB and OmpF in deep rough lipopolysaccharide mutants of *Escherichia coli* K-12.** *J Bacteriol* 1994, **176**:2259-2264.
109. de Cock H, Tommassen J: **Lipopolysaccharides and divalent cations are involved in the formation of an assembly-competent intermediate of outer-membrane protein PhoE of *E.coli*.** *Embo J* 1996, **15**:5567-5573.
110. de Cock H, Pasveer M, Tommassen J, Bouveret E: **Identification of phospholipids as new components that assist in the *in vitro* trimerization of a bacterial pore protein.** *Eur J Biochem* 2001, **268**:865-875.
111. Bos MP, Tommassen J: **Biogenesis of the Gram-negative bacterial outer membrane.** *Curr Opin Microbiol* 2004, **7**:610-616.
112. Dippel R, Boos W: **The maltodextrin system of *Escherichia coli*: metabolism and transport.** *J Bacteriol* 2005, **187**:8322-8331.
113. Spurlino JC, Lu GY, Quioco FA: **The 2.3-A resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis.** *J Biol Chem* 1991, **266**:5202-5219.

114. Duplay P, Szmelcman S, Bedouelle H, Hofnung M: **Silent and functional changes in the periplasmic maltose-binding protein of *Escherichia coli* K12. I. Transport of maltose.** *J Mol Biol* 1987, **194**:663-673.
115. Betton J, Hofnung M: **Folding of a mutant maltose-binding protein of *Escherichia coli* which forms inclusion bodies.** *J Biol Chem* 1996, **271**:8046-8052.
116. Betton JM, Hofnung M: ***In vivo* assembly of active maltose binding protein from independently exported protein fragments.** *Embo J* 1994, **13**:1226-1234.
117. Braun M, Endriss F, Killmann H, Braun V: ***In vivo* reconstitution of the FhuA transport protein of *Escherichia coli* K-12.** *J Bacteriol* 2003, **185**:5508-5518.
118. Koebnik R: ***In vivo* membrane assembly of split variants of the *E.coli* outer membrane protein OmpA.** *Embo J* 1996, **15**:3529-3537.
119. Koster W, Braun V: **Iron(III) hydroxamate transport of *Escherichia coli*: restoration of iron supply by coexpression of the N- and C-terminal halves of the cytoplasmic membrane protein FhuB cloned on separate plasmids.** *Mol Gen Genet* 1990, **223**:379-384.
120. Stathopoulos C, Hendrixson DR, Thanassi DG, Hultgren SJ, St Geme JW, 3rd, Curtiss R, 3rd: **Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in gram-negative pathogens: an evolving story.** *Microbes Infect* 2000, **2**:1061-1072.
121. Adams TM, Wentzel A, Kolmar H: **Intimin-mediated export of passenger proteins requires maintenance of a translocation-competent conformation.** *J Bacteriol* 2005, **187**:522-533.
122. Tani K, Tokuda H, Mizushima S: **Translocation of ProOmpA possessing an intramolecular disulfide bridge into membrane vesicles of *Escherichia coli*. Effect of membrane energization.** *J Biol Chem* 1990, **265**:17341-17347.
123. Junker M, Schuster CC, McDonnell AV, Sorg KA, Finn MC, Berger B, Clark PL: **Pertactin beta-helix folding mechanism suggests common themes for the secretion and folding of autotransporter proteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:4918-4923.
124. Emsley P, Charles IG, Fairweather NF, Isaacs NW: **Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin.** *Nature* 1996, **381**:90-92.
125. Otto BR, Sijbrandi R, Luirink J, Oudega B, Heddle JG, Mizutani K, Park SY, Tame JR: **Crystal structure of hemoglobin protease, a heme binding autotransporter protein from pathogenic *Escherichia coli*.** *J Biol Chem* 2005, **280**:17339-17345.
126. Eppens EF, Nouwen N, Tommassen J: **Folding of a bacterial outer membrane protein during passage through the periplasm.** *Embo J* 1997, **16**:4295-4301.
127. Ohnishi Y, Nishiyama M, Horinouchi S, Beppu T: **Involvement of the COOH-terminal pro-sequence of *Serratia marcescens* serine protease in the folding of the mature enzyme.** *J Biol Chem* 1994, **269**:32800-32806.

ANNEXES

Annexes

Annexe 1: Effet du repliement sur la translocation: utilisation d'un mutant qui doit se replier afin d'être transloqué

Méthodologie

Comme expliqué dans l'introduction, la possibilité de séparer MalE en deux fragments complémentaires a été identifiée par une insertion aléatoire d'oligonucléotides contenant le site de reconnaissance de l'enzyme de restriction *Bam*HI. Nous avons utilisé une construction avec un fragment N-terminal couvrant les aa 1 à 303 de la protéine MalE mature et un fragment C-terminal couvrant les aa 309 à 369. La perte des aa 304 à 308 est due à la construction et n'affecte pas la protéine. Le fragment N-terminal est appelé MalE303_N (1 à 303) et le fragment C-terminal MalE303_C (309 à 369) tandis que les deux fragments co-exprimés sont appelés MalE303. L'ADN codant pour MalE303 a été obtenu à partir du vecteur pSSN303SSC [116], un plasmide dans lequel le gène de MalE est sous le contrôle du promoteur *pmal* inductible avec du maltose. Dans ce plasmide, un codon stop TAA, un promoteur *ptac*, un site de liaison au ribosome, un codon start ATG ainsi qu'une seconde copie de la séquence signal de MalE ont été insérés après l'aa en position 303.

Ensuite, afin de construire une fusion entre MalE303 et Aidac (domaine autochaperone, hélice α et tonneau β), un fragment d'ADN codant pour la partie C-terminale de MalE303_N, le promoteur *ptac* ainsi que la partie N-terminale de MalE303_C a été amplifié par PCR et sous-cloné dans MalEAidac (MalE β) dans les sites de restrictions *Bg*III-*Sac*I résultant en une fusion appelée MalE303Aidac (MalE303 β). Dans cette construction, les deux fragments sont sous le contrôle d'un promoteur *ptac* inductible par l'IPTG et le fragment MalE303_C est fusionné à Aidac. Les oligonucléotides utilisés pour amplifier le gène codant pour MalE303 afin de faire la fusion à Aidac sont les suivants: 5' ATATATAGATCTGCTGCCGAACCGCC 3'; 5' ATATATGAGCTCGAATTAGTCTGCGGTCTTTCAGGGC 3'. Un schéma des constructions est représenté à la figure 10. Il est possible de vérifier si les deux fragments se sont reconstitués pour former la protéine MalE dans le périplasme, en évaluant la capacité d'une souche *malE* à utiliser le maltose. Les phénotypes sont observés sur gélose MacConkey maltose 2 % comme décrit dans le premier article contenu dans ce mémoire. L'accessibilité des constructions à des

protéases extracellulaires a aussi été testée sur des bactéries entières comme décrit dans le premier article de ce mémoire.

Résultats

Nous avons utilisé une protéine devant se replier afin d'être transloquée entièrement. Cette protéine, appelée MalE303, correspond à MalE séparé en deux fragments complémentaires qui sont transportés dans le périplasma de manière indépendante et qui peuvent se réassocier et former une protéine fonctionnelle capable de transporter le maltose. Nous avons aussi fusionné le gène codant pour MalE303 à celui codant pour Aidac afin de générer la protéine MalE303Aidac (MalE303 β). Dans cette construction, comme le fragment N-terminal est indépendant, il doit s'associer avec le fragment C-terminal, qui lui est fusionné à Aidac, afin d'être transloqué. La présence du fragment N-terminal à la surface signifierait donc que le repliement du domaine passager est compatible avec la translocation puisque pour que les deux fragments soient associés ils doivent se replier, du moins partiellement.

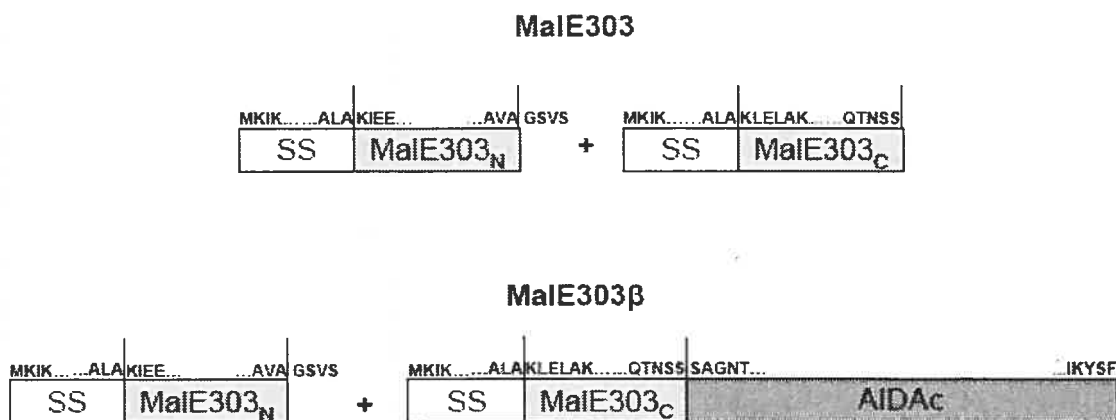


Figure 10: Organisation des fragments complémentaires de MalE et de leur fusion avec Aidac. L'organisation de MalE303 et celle de la protéine chimérique MalE303 β sont représentées en montrant la séquence signal (SS) en blanc, les deux fragments de MalE (MalE303_N et MalE303_C) en gris pâle et l'unité de translocation de AIDA (Aidac) en gris foncé. Les acides aminés sont indiqués à la jonction des différentes régions par le code à une lettre.

Comme les deux fragments de MalE303 réassociés peuvent transporter la maltose, il est possible de déterminer s'ils se sont associés et sont toujours présents dans le périplasme en évaluant le phénotype sur gélose MacConkey contenant 2 % de maltose. Comparativement aux phénotypes obtenus pour MalE* ainsi que pour MalE303, le phénotype obtenu pour MalE303Aidac (MalE303 β) nous montre que les deux fragments ne se sont pas associés dans le périplasme afin de former une protéine mature et fonctionnelle puisque la bactérie n'est pas capable d'utiliser la maltose (Figure 11).

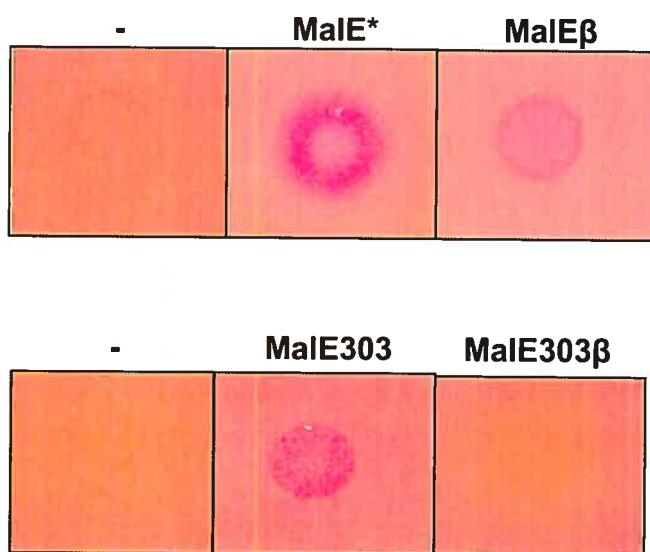


Figure 11: Phénotypes des constructions sur géloses MacConkey. Phénotypes sur géloses MacConkey contenant 2 % (p/v) de maltose après 24 hrs à 37°C. MalE303Aidac (MalE303 β) est incapable d'utiliser la maltose contrairement à MalE*, MalE303 ainsi qu'à MalEAidac (MalE β). MalE* correspond à MalE sans la fusion à lacZa provenant du plasmide (voir premier article de ce mémoire).

Nous avons donc testé la présence des fragments à la surface de la bactérie par l'accessibilité à des protéases extracellulaires (Figure 12). La figure 12 montre que pour MalE303, le fragment N-terminal n'était pas accessible aux protéases, ce qui est normal puisque cette protéine est périplasmique, comme démontré par le phénotype sur gélose MacConkey. Le fragment C-terminal n'est pas visible sur gel à cause de sa trop petite taille. Pour MalE303Aidac (MalE303 β), nous avons pu observer un fragment de 55 kDa accessible aux protéases extracellulaires

correspondant à la taille de MalE303_CAidac démontrant que ce fragment a été transloqué par Aidac.

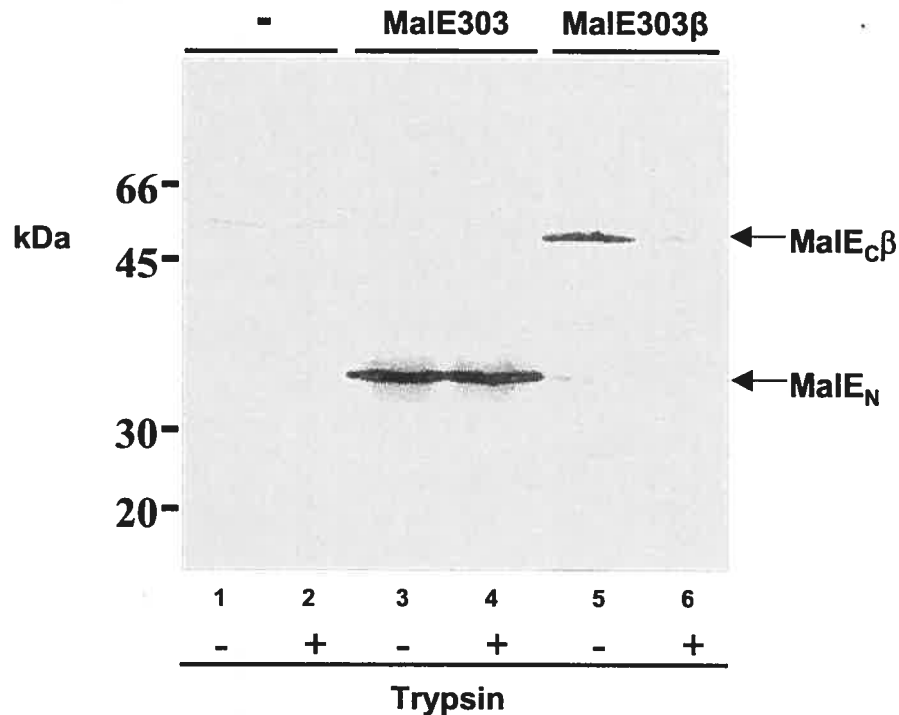


Figure 12: Test d'accessibilité aux protéases extracellulaires. MalE303 n'est pas accessible aux protéases extracellulaires. Dans la construction MalE303Aidac (MalE303β), le fragment MalE303_C est accessible et donc transloqué. Le fragment MalE303_N n'est pas visible. Ceci est consistant avec le fait que le fragment est instable lorsqu'il ne peut pas se réassocier avec le fragment C-terminal, comme démontré par Betton and Hofnung. (1994).

Le fragment MalE303_N de MalE303Aidac (MalE303β) n'a pas pu être observé en immunobuvardage suggérant qu'il ne s'est pas réassocié avec MalE303_C et qu'il n'a pas pu être transloqué. En effet, il a déjà été démontré que le fragment MalE303_N seul dans le périplasma est instable et est rapidement dégradé expliquant qu'il ne soit pas visible par immunobuvardage [116]. Notre observation suggère donc que dans la construction MalE303Aidac (MalE303β), le fragment MalE303_N ne peut être transloqué avec le fragment MalE303_C en tant que complexe replié ou partiellement replié et donc seul dans le périplasma il est rapidement dégradé. Cette

conclusion est cohérente avec nos résultats précédents car elle suggère que MalE ne peut être transloquée sous une forme repliée.

Annexe 2: Construction d'un mutant négatif d'insertion et de translocation

Méthodologie

Le plasmide contenant la fusion MalEAidac a été utilisé afin de construire un mutant de Aidac. La transcription des 10 derniers aa en C-terminal de Aidac a été abolie grâce à l'insertion, par mutagenèse dirigée, d'un codon stop. Le kit commercial de mutagenèse dirigée QUICKCHANGE de STRATAGENE a été utilisé avec l'amorce suivante: 5' GGGAGCAATGCCATCTCATGAGCACTGGGGATAAAATACAGC 3' et son complémentaire. Cette amorce change deux paires de bases qui permettent d'introduire un codon stop ainsi que d'abolir un site de restriction *BspE1* et d'ajouter un site *BspH1*. Les caractéristiques de ce mutant appelé MalEAidac Δ 10 ont été déterminées en testant le phénotype sur gélose MacConkey maltose, l'accessibilité à des protéases ainsi qu'à des anticorps extracellulaires comme décrit dans le premier article contenu dans ce mémoire. De plus, un fractionnement cellulaire a été réalisé comme décrit dans la section "Materials and Methods" du deuxième article de ce mémoire. Avec la fraction de ME obtenue lors du fractionnement, un gradient de sucrose ainsi qu'un coussin de sucrose ont été réalisés afin de séparer la ME des agrégats. Le gradient de sucrose a été obtenu par la superposition de 350 μ l de sucrose 55 % (p/v) dans de l'HEPES 10 mM pH 7.4, de 300 μ l de sucrose 42 % (p/v) ainsi que de 250 μ l de sucrose 24 % (p/v). Le culot de ME a été resuspendu dans un tampon HEPES 10 mM pH 7.4 et centrifugé à basse vitesse afin d'enlever les débris. Cent μ l de la fraction de ME ont été déposés sur le gradient de sucrose et le gradient a été centrifugé à 156 000 g durant 1 h. Les fractions ont été récupérées par aliquot de 100 μ l et traitées afin de procéder à un immunobuvardage comme décrit dans le premier article contenu dans ce mémoire. Le matériel est fractionné dans les différentes couches de sucrose selon la densité de chacun des composés. Pour le coussin de sucrose, le principe est le même sauf que la ME est retrouvée entre les deux couches de sucrose tandis que les agrégats sont retrouvés au fond du tube. Deux ml de sucrose 60 % (p/v) ont été déposés dans un tube et le culot de ME a été resuspendu dans 1 ml de sucrose 20 % (p/v) qui a été déposé sur les 2 ml dans le tube. Le coussin a été centrifugé à 156 000 g durant 10 min et les échantillons ont été récoltés en fractions de 300 μ l.

Résultats

Dans le but de construire un mutant négatif d'insertion et de translocation, nous avons décidé de muter l'UT. Plusieurs articles ont démontré que la seule partie essentielle d'un AT est le domaine de translocation ou UT qui comprend le tonneau β et l'hélice α . Comme le domaine β est prédit pour s'insérer dans la ME en formant un tonneau de 12 brins β antiparallèles, nous avons supposé que tous les aa étaient nécessaires afin que toutes les interactions permettant la formation du tonneau soient maintenues. Ce mutant ne devrait s'insérer que partiellement dans la ME et ne devrait pas transloquer. Les résultats d'accessibilité extracellulaire de MalE à des anticorps ainsi qu'à des protéases nous ont permis de confirmer que la translocation de MalE par Aidac Δ 10 était abolie puisque MalE n'était pas accessible. Nous avons ensuite tenté de vérifier si MalE Aidac Δ 10 était localisée dans la ME de la bactérie. Nous avons procédé à des fractionnements cellulaires et confirmé sa localisation dans la ME. Cependant, nous savons que lors d'un fractionnement cellulaire, les agrégats sont retrouvés dans la fraction de ME. Nous avons donc tenté de séparer la ME des agrégats par gradient de sucrose et par coussin de sucrose mais les résultats n'ont pas été concluants (résultats non montrés). Finalement, nous avons conclu que le mutant MalEAidac Δ 10 ne permettait plus la translocation de MalE mais était tout de même associé à la ME. Nous n'avons pas cherché à comprendre plus précisément le mutant mais nous l'avons utilisé comme un mutant négatif de translocation.

Annexe 3: Construction de mutants de délétions graduelles dans le domaine autochaperone

Méthodologie

Nous avons testé différents types de fusions de MalE à Aidac afin de voir laquelle permet une meilleure production de la protéine. La première construction appelée MalEAidaC1 correspond à la fusion MalEAidac (voir le premier article contenu dans ce mémoire) mais ici Aidac a été cloné en *XbaI* et non en *XbaI* et *SacI* dans le plasmide pMalp2x. Cette fusion résulte en l'ajout d'un "linker" d'asparagine contenu dans le plasmide entre MalE et Aidac. La deuxième ainsi que la troisième construction correspondent à des délétions dans le domaine autochaperone de Aidac. Ces constructions ont aussi été clonées en *XbaI* et comprennent donc aussi le "linker" d'asparagine. Les amorces utilisées afin d'amplifier Aidac sont respectivement pour AidaC1, C2 et C3 : 5' TAT ATA TCT AGA GCA GGT AAT ACT CTT ACC GTG T 3' 5' TAT ATA TCT AGA GAT GGG TAT TAA TAT TAT TTC TGT AGA GGG 3' 5' TAT ATA TCT AGA GGA TGG TAT TTA ACC AGT CAT CTT CC 3'. La même amorce inverse a été utilisée pour les trois constructions : 5' TTA ATT TCT AGA TTA TCA GAA GCT GTA TTT TAT CCC 3'. La présence de ces différentes constructions a été comparée à celle de MalEAidac par des extraits totaux ainsi que par des fractionnements cellulaires comme décrit dans le premier article de ce mémoire. Les résultats ont été ensuite visualisés par immunobuvardage en utilisant un anticorps contre MalE.

Résultats

MalEAidac et MalEAidaC1 ont été exprimées dans différentes souches. Dans la souche que nous avons choisi d'utiliser, ED9 (génotype voir article 1), la construction MalEAidac était la mieux produite. La production des protéines MalEAidaC2 et MalEAidaC3 a été comparée avec celle de la protéine MalEAidac. Les résultats ont démontrés que la meilleure fusion était celle ne comprenant pas de "linker" et où le domaine autochaperone était présent au complet correspondant à la fusion MalEAidac. Pour MalEAidaC1, nous avons pensé que la présence du

"linker" aurait pu augmenter l'efficacité de production ainsi que diminuer le clivage entre MalE et Aidac en donnant un peu plus d'espace au domaine passager pour lui permettre d'adopter une conformation compatible avec la translocation. En effet, nous avons observé un important taux de clivage entre MalE et Aidac dans une fusion sans "linker" (voir premier article contenu dans ce mémoire). Pour MalEAidaC2 ainsi que MalEAidaC3, d'après la littérature, nous nous attendions à avoir un mauvais rendement. En effet, comme mentionné dans la section "Recension de la littérature", il a déjà été démontré que le domaine autochaperone n'est pas nécessaire mais qu'il augmente la stabilité de la protéine [43,44]. Il n'est donc pas surprenant qu'en enlevant une partie de ce domaine, on diminue la quantité de protéine. La présence du "linker" d'asparagine n'a pas permis de rétablir la perte du domaine autochaperone suggérant que ce dernier ait un rôle bien particulier.

Annexe 4: Mesure du stress cytoplasmique et périplasmique engendré par les différentes protéines

Méthodologie

Les plasmides codant pour MalE Δ lacZ, MalE31 Δ lacZ, MalEAidac ainsi que MalE31Aidac (décrits dans le premier article contenu dans ce mémoire) ont été transformés dans les souches SR1458 et SR1364. Ces deux souches portent respectivement une fusion entre le promoteur de DegP et le gène codant pour la β -galactosidase et le promoteur de Lon (protéase cytoplasmique) et le gène codant pour la β -galactosidase (SR1458, pdegP::LacZ, SR1364 plon::LacZ). Afin de mesurer l'induction du stress, les cultures bactériennes induites et normalisées ont été laissées sur glace durant 20 min. Dans un tube en verre de 5ml ont été mélangés 0.9ml de tampon Z froid (0.06 M Na₂HPO₄, 0.04 M NaH₂PO₄, 0.01 M KCl, 0.001 M MgSO₄, 0.05 M β -mercaptoéthanol, pH 7) ainsi que 0.1 ml de culture bactérienne. Ensuite, 10 μ l de chloroforme ont été ajoutés au mélange et le tout a été vortexé. Vingt μ l d'une solution de SDS 4 % (p/v) ont été ajoutés et le mélange a été vortexé à nouveau. Les tubes ont été placés dans un bain à 28°C et la réaction a été lancée par l'ajout de 0.2 ml d'ONPG (4mg.ml⁻¹). Après environ 15 à 20 minutes, 0.5 ml de Na₂CO₃ 1 M ont été ajoutés afin d'arrêter la réaction. Les densités optiques (DO) ont été prises à 420 nm ainsi qu'à 550 nm. Les résultats sont exprimés en unité Miller qui se calculent comme suit : Unité Miller = 1000 x (DO₄₂₀ - 1.75 x DO₅₅₀) / temps de réaction x volume de culture utilisé x DO₆₀₀). Les résultats pour la souche SR1364 ne sont pas montrés.

Résultats

Comme expliqué dans la partie "Recension de la littérature", la présence de protéines mal repliées dans le périplasma induit une réponse de stress. Nous avons voulu tester si nos protéines induisaient un stress chez la bactérie en regardant l'activité de deux promoteurs contrôlant la production de protéases produites en présence de protéines mal repliées (Figure 13). La protéine MalE Δ lacZ induit une réponse au stress très faible, ce qui est normal puisque la protéine MalE est

une protéine périplasmique naturelle de *E.coli*. La bactérie n'est donc pas stressée par la présence de cette protéine et la faible activation que l'on peut voir pourrait venir du fait que la protéine est surexprimée.

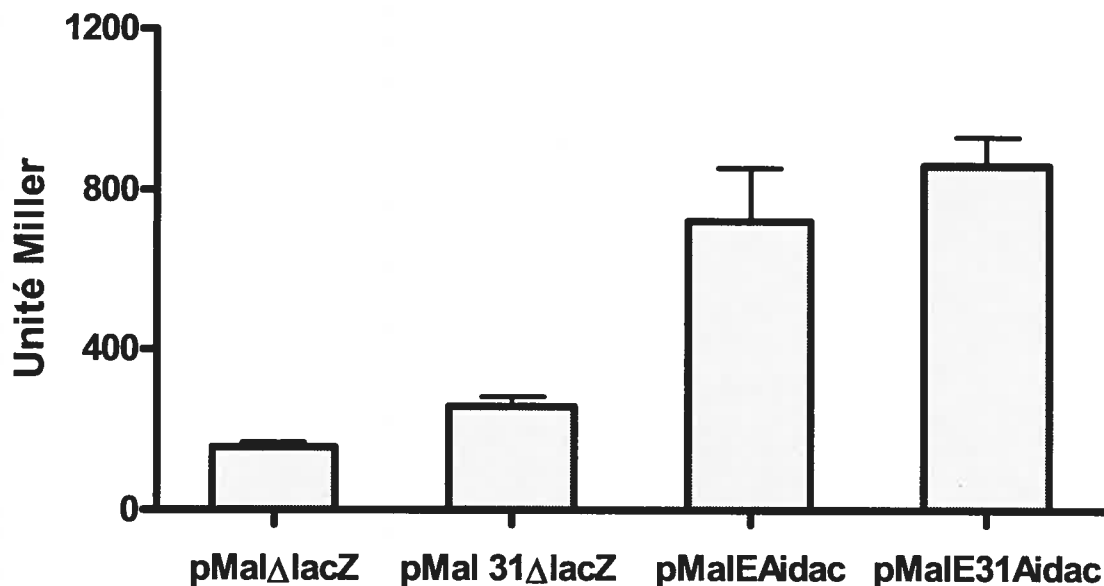


Figure 13: Dosage du stress périplasmique. En utilisant une fusion entre le promoteur de *degP* et *lacZ* dans la souche SR1458 (SR1458: *pdegp::LacZ*) nous avons pu doser le stress périplasmique de nos constructions. Le dosage a été effectué pour les constructions suivantes: *MalE Δ lacZ*, *MalE31 Δ lacZ*, *MalEAidac*, *MalE31Aidac*. Les dosages de l'activité de la β -galactosidase ont été effectués en triplicata et sont exprimés en unité Miller.

Pour *MalE31*, les résultats obtenus concordent avec la littérature, c'est-à-dire une faible activation de la réponse au stress mais qui est tout de même activée par le fait que *MalE31* s'agrège dans le périplasme [115]. Les résultats obtenus pour *MalEAidac* et *MalE31Aidac* sont plus surprenants

puisque l'activation pour MalE31Aidac est aussi importante que celle pour MalEAidac. Comme environ 50 % du MalE fusionné à Aidac est clivé et relargué dans le périplasme (voir figure 3 du premier article), la réponse au stress aurait pu être plus importante due à une accumulation dans la ME de tonneaux β sans domaine passager. Cela ne semble pas être le cas puisque même lorsque la translocation est efficace, dans le cas de MalE31Aidac, la réponse au stress semble être la même. Dans les deux cas, la réponse au stress pourrait provenir du fait que le domaine passager n'est pas le domaine passager natif de l'AT AIDA-I. En effet, si le système est bien adapté pour transloquer un certain type de protéine, il se peut qu'en n'utilisant pas ce type de protéine cela cause un stress à la bactérie malgré le fait que la translocation pour MalE31Aidac soit efficace.

Annexe 5: Mutagenèse aléatoire de Aidac par analogues nucléotidiques

Méthodologie

Le gène codant pour Aidac contenu dans le plasmide pMalEAidac a été amplifié par PCR. Le mélange de PCR contenait plasmide, amorces, dNTP, polymérase ainsi que différentes concentrations de l'analogue nucléotidique 6H, 8H-3,4-Dihydro-pyrimido[4,5-c] [1,2]oxazin-7-one-8-β-D-2'-deoxy-ribofuranosid-5'-triphosphate (dPTP) (0, 0.02, 0.2, 2 μM dPTP). Les produits de cette PCR ont été purifiés à l'aide d'un kit QIAGEN et ensuite utilisés pour faire une deuxième PCR. Le mélange de cette deuxième PCR était composé entre autre de plasmides codants pour MalEAidac ainsi que des fragments d'ADN codant pour Aidac obtenus lors de la première PCR et utilisés ici comme amorce. Les produits de la deuxième PCR ont été incubés avec 1 μl d'enzyme *Dpn1* à 37°C durant 1 h puis purifiés à l'aide du kit QIAGEN. Deux μl ont été dialysés sur membrane de nitrocellulose (Millipore) durant 30 min et transformés par électroporation dans des bactéries *E.coli* TG1α (*F'*, *traD36*, *proAB*, *lacIC*, *lacZ ΔM15*, *supE*, *thi¹*, *Δ (lac-proAB)*, *Δ(mcrB-hsdSM (Fl^e Mle^e)*). Les bactéries contenant le plasmide ont été étalées sur gélose LB (Luria-Bertani) ampicilline (100μg.ml⁻¹) et incubées 24 hrs à 30°C. Plusieurs colonies ont ensuite été "piquées" sur géloses LB ampicilline (100μg.ml⁻¹), incubées à 30°C et après 24 hrs, "repiquées" sur gélose MacConkey ampicilline (100μg.ml⁻¹) maltose 2 % (p/v) et incubées 18 hrs à 37°C. Les colonies rouges ont été "repiquées" une dernière fois sur gélose MacConkey ampicilline (100μg.ml⁻¹) maltose 2 % (p/v) afin de confirmer le phénotype. Les colonies rouges ont ensuite étéensemencées en bouillon LB de 5 ml contenant 100μg.ml⁻¹ d'ampicilline et incubé à 30°C durant 24 hrs avec agitation. Des extraits totaux ont ensuite été effectués comme expliqué dans le deuxième article contenu dans ce mémoire.

Résultats

La mutagenèse aléatoire par analogue nucléotidique permet l'introduction de mutations dans un gène d'intérêt. Le dPTP peut s'incorporer à la place des T et des C et changer de forme une fois incorporé (il peut être un T et devenir un C et vice versa) créant ainsi des mutations lors de la

transcription. Le dPPTP a été utilisé afin de muter le gène codant pour Aidac. Les gènes mutés de Aidac ont ensuite été utilisés pour amplifier le plasmide codant pour MalAidac afin d'introduire les mutations dans le plasmide. Les plasmides n'ayant pas insérés le gène Aidac muté ont été détruits grâce à l'enzyme *Dpn1* qui reconnaît la méthylation présente seulement chez les plasmides provenant d'une bactérie et non de la PCR. Cette technique de mutagenèse est simple et surtout permet l'obtention rapide de mutants. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à optimiser la technique afin d'obtenir des mutants intéressants. Nous cherchions des mutations ne permettant plus la translocation du domaine passager et donc des mutants qui auraient un phénotype rouge sur MacConkey. Notre protéine semble tellement sensible à cette technique que nous obtenions à chaque essai un pourcentage anormalement élevé de mutants rouges. Nous avons fait séquencer plusieurs de ces mutants. Dans plusieurs cas, nous avons de deux à trois mutations par kb, ce qui rendait l'interprétation de l'effet d'une seule mutation impossible. Nous avons testé plusieurs paramètres afin de réduire le nombre de mutation par kb mais tous nos essais ont échoués.

Annexe 6: Mutagenèse du chromosome par insertion aléatoire de transposons

Méthodologie

Le kit commercial pour mutagenèse par transposons EZ-Tn5TM <R6K_γori/KAN-2>Tnp TransposomeTM Kit de Epicentre a été utilisé afin de muter le chromosome entier de la bactérie *E.coli* ED9 (génotype, voir premier article). Un μl de transposon a été électroporé dans 50 μl de bactéries ED9 et immédiatement après, 1 ml de milieu SOC (400 ml d'eau, 10 g de tryptone, 2.5 g d'extraits de levure, 0.25 g de NaCl, 5 ml de KCl 250 mM, 2.5 ml de MgCl₂ 2 M, 10 ml de glucose 1 M, pH 7) a été ajouté aux bactéries et le tout a été délicatement mélangé. Ensuite, les bactéries ont été incubées durant 1 h à 37°C avec agitation. Des dilutions (1:10, 1:100) ont été effectuées avant d'étaler les bactéries sur gélose LB kanamycine (50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) et les géloses ont ensuite été incubées à 37°C durant 24 hrs. Les colonies ont ensuite été raclées avec une quantité de LB en fonction de la quantité de colonies. Le volume total a été centrifugé à 3700 g durant 15 min, resuspendu dans 1x volume initial d'eau froide, centrifugé à 3700 g durant 15 min, resuspendu dans la moitié du volume initial, avec de l'eau, centrifugé à 3700 g durant 15 min, resuspendu dans 1/50ème du volume initial, avec du glycérol 10 % (p/v) froid, centrifugé à 3700 g durant 30 min et resuspendu dans 1/330ème du volume initial, avec du glycérol 10 % (p/v) froid. Deux μl de plasmide codant pour MalE_{Aidac} ainsi que 100 μl de LB ont été ajoutés à 50 μl de ces bactéries et la totalité du mélange a été étalé sur gélose LB ampicilline (100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$), kanamycine (50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) par petit volume et incubé à 30°C durant 24 hrs. Les colonies ont ensuite été "piquées" sur gélose MacConkey ampicilline (100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) maltose 2 % (p/v) et incubées à 37°C durant 18 hrs. Les colonies rouges ont été "repiquées" sur gélose MacConkey ampicilline (100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) maltose 2 % (p/v) afin de confirmer le phénotype rouge. Les colonies rouges ont étéensemencées en bouillon LB contenant 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ d'ampicilline ainsi que 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de kanamycine, incubées à 30°C durant 24 hrs avec agitation. Les plasmides ont été extraits grâce au kit commercial de QIAGEN QIAprep® Spin Miniprep Kit et ensuite transformés par électroporation dans une souche ED9 ne contenant pas de transposon afin de confirmer que le phénotype rouge ne provenait pas du plasmide. Les bactéries transformées ont ensuite été étalées sur géloses LB ampicilline (100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) et incubées à 30°C durant 24 hrs.

Plusieurs colonies ont ensuite été "piquées" sur gélose MacConkey ampicilline ($100\mu\text{g.ml}^{-1}$) maltose 2 % (p/v). Les mutants qui, par insertion de transposon, avaient un phénotype rouge ne provenant pas du plasmide ont ensuite été testés pour leur capacité à transloquer MalE à la surface par protéolyse (voir premier article inclus dans ce mémoire). Nous avons aussi testé des colonies qui étaient plus blanches et qui avaient mieux poussées que le témoin positif MalEAidac. Ainsi nous cherchions une mutation qui aurait pu augmenter l'efficacité de la translocation. Le phénotype des mutants blancs a aussi été confirmé et ils ont ensuite été testés par protéolyse.

Résultats

Grâce à cette mutagenèse aléatoire par transposon, nous cherchions à identifier, dans le chromosome de la souche ED9, des facteurs extragéniques participant à la translocation des ATs. En effet, de part la possibilité du criblage sur gélose MacConkey, nous pouvons trouver des mutants pour lesquels MalE reste bloquée dans le périplasma et peut donc participer au transport du maltose. Nous pouvons aussi trouver des mutants où la translocation est plus efficace que pour MalEAidac en cherchant des colonies blanches. La technique de crible que j'ai mise au point semble bien fonctionner. Cependant, au total je n'ai obtenu que 976 insertions alors que pour couvrir la totalité du génome de *E. coli*, il en aurait fallu au minimum 4000. Pour notre crible, nous devons utiliser la souche de *E. coli* ED9 qui contient une mutation non polaire dans le gène de *malE*. Cependant, cette souche a une efficacité de translocation assez faible par comparaison à d'autres souches de *E. coli*. Ainsi, il est difficile d'obtenir beaucoup de colonies lorsqu'on utilise ED9 pour transformer le transposon. J'ai tout de même utilisé les 976 mutants que j'ai obtenus et j'ai donc transformés les bactéries contenant le transposon avec le plasmide codant pour la protéine MalEAidac. Pour couvrir les 976 insertions présentes au départ, il faut obtenir environ 10 000 colonies après cette deuxième transformation. À la suite de la transformation avec le plasmide, j'ai obtenu environ 11 500 colonies et j'en ai testé environ 5000. Pour être certaine de couvrir toutes les insertions de départ, il faudrait que j'en repique encore 5000.

Sur les 5000 mutants testés sur MacConkey, j'ai obtenu 81 mutants rouges et 50 mutants blancs. Tous ces mutants ont été confirmés et testés par protéolyse. Tous les mutants testés étaient accessibles et/ou la quantité de MalE présente au périplasma était la même que pour MalEAidac

suggérant que la translocation n'était pas réduite ni améliorée. Tous les mutants obtenus étaient donc inintéressants mais la technique de mutagenèse a été correctement mise au point et l'expérience pourra donc être poursuivie.

Annexe 7: Revue bibliographique publiée dans la revue scientifique *Microbial Cell Factories*

Surface display of proteins by Gram-negative bacterial autotransporters

Surface display of proteins by Gram-negative bacterial autotransporters

Nancy Rutherford*, Michael Mourez

Canada Research Chair on Bacterial Animal Diseases, Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada

* Corresponding author

Email addresses:

Nancy Rutherford

Michael Mourez

Abstract

Expressing proteins of interest as fusions to proteins of the bacterial envelope, also called bacterial surface display, is a powerful technique with many biotechnological and medical applications. Autotransporters have recently emerged as a good tool for such a goal. These proteins are composed of an N-terminal signal peptide, followed by a passenger domain and a translocator domain that mediates the outer membrane translocation of the passenger. The natural passenger domain of autotransporters can be replaced by heterologous proteins that become displayed at the bacterial surface by the translocator domain. The simplicity and versatility of this system has made it very attractive. However, while studying the translocation mechanism of autotransporters, some limits to their efficiency have appeared. As bacterial surface display has many advantages over other display systems and because of the increasing interest in its applications, it is important to better understand the mechanism of translocation of autotransporters in order to employ them to their full potential. This review will focus on these issues and describe practical considerations regarding the use of autotransporters for bacterial surface display.

Review

Using a secretion system for bacterial surface display

The display of proteins on the surface of biological organisms is of major interest in biotechnology and medicine. The most common applications of surface display include the presentation of proteins for the development of vaccines, the expression of heterologous enzymes of biotechnological interests, and the selection of libraries of peptides or proteins such as single-chain antibodies. Surface display consists in genetically fusing a protein of interest to another protein that will allow its presentation at the surface of an organism [1]. Bacterial display thus requires a mechanism that mediates the export of the proteins of interest from the cytoplasm to the outer layers of the envelope [2]. Both Gram-positive and Gram-negative bacteria might be used for surface display [3]. Gram-negative bacteria, however, possess two membranes that proteins need to cross in order to reach the extracellular milieu. To achieve this function, they have acquired different secretion systems that many bacteria already use to deliver virulence factors [4]. Naturally these systems represent interesting candidates as tools for surface display. Proteins are exported across the inner membrane by either the general secretion (*sec*) or by the twin arginine translocation (*tat*) pathways [5, 6]. In parallel, there are five major secretion systems that allow translocation across the outer membrane or across both the inner and outer membrane simultaneously. The type I secretion system permits secretion of proteins directly from the cytoplasm to the extracellular milieu and is made of three proteins [7]: (i) an inner membrane transporter (belonging to the ATP-binding cassette family), (ii) a periplasmic adaptor protein anchored into the inner membrane and (iii) an outer membrane protein. The system is *sec*-independent and there is no periplasmic intermediate. The type II secretion system, also called the main terminal branch of the *sec* pathway, permits the translocation in the extracellular

medium of proteins exported in the periplasm by the *sec* pathway [8]. The type II secretion system, however, can also export proteins secreted by the *tat* pathway [9]. This system is complex and involves at least a dozen proteins situated in the inner membrane, the periplasm and the outer membrane. The type III secretion system is another complex structure made up of up to 20 different proteins also found in each layer of the bacterial envelope [10]. The system functions as a molecular syringe delivering bacterial virulence proteins from the bacterial cytoplasm directly into the extracellular milieu or the cytosol of plant or animal cells. The type IV secretion system is structurally and functionally similar to its type III counterpart [11]. It acts as a syringe that permits the transfer of DNA and proteins substrates from the cytosol of a bacterial cell to that of another. In some instances, the type IV system achieves delivery into the extracellular milieu or into the cytosol of animal cells. The type IV secretion machinery is complex and involves more than a dozen protein components located in the inner membrane, the periplasm and the outer membrane. Finally, and by contrast, the last system known to date, called the type V secretion system, appears very simple [12, 13]. In this system, proteins are secreted from the periplasm into the extracellular medium or to the extracellular side of the outer membrane by a single protein domain.

The type V secretion system is divided into three groups, the autotransporter (AT) system (type Va), the two-partner secretion system or TPS (type Vb) and the trimeric autotransporters (type Vc). AT are single polypeptides that contain two domains: one which is secreted across the outer membrane and another one which mediates this translocation step. TPS systems are similar to AT, except that the two domains are synthesized as two independent polypeptides [14]. Trimeric autotransporters are also self-translocating proteins but they require trimerization in order to do so [15]. The translocation mechanism of AT is peculiarly flexible and it was quickly observed to be largely unaffected by the nature of the passenger domain. Few systems are as

simple and amenable and, for these reasons, AT became attractive tools for surface display [16, 17]. However, even if the autotransporter mechanism seems peculiarly well suited for surface display, it appears that there are some limits to its tolerance. This review will summarize the autotransporters translocation mechanism with its restrictions and, consequently, detail the parameters to take into consideration when contemplating the use of autotransporters as surface display systems.

Autotransporters

The first autotransporter discovered was the *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease [18]. Since then, many autotransporters have been identified. Most are involved in the virulence of bacterial pathogens and take part in various processes such as adhesion, aggregation, invasion, biofilm formation, serum resistance and cytotoxicity [19, 20]. Autotransporters share a distinctive organization (Figure 1A, [13]). At their N terminus they have a *sec*-dependent signal peptide followed by a passenger domain comprising the functional part of the protein. The passenger domain is translocated through the outer membrane thanks to a C-terminal region called the translocation unit (TU, [21]). TU are composed of two subdomains: The C-terminal 250 to 300 aminoacids that are predicted to form a β -barrel inserted in the outer membrane and, immediately before that, a 25 aminoacids linker region predicted to adopt an α -helical conformation [22]. Finally, there is a last domain found at the C terminus of the passenger domain and called the autochaperone domain [23]. This autochaperone domain is dispensable for translocation but increases its efficiency, either by stabilizing the β -barrel [24], or by promoting the folding of the passenger domain [23].

The mechanism of translocation is thought to be conserved among the different autotransporters and to contain four steps: (i) inner membrane translocation, (ii) periplasmic

transport, (iii) insertion into and translocation across the outer membrane, and (iv) processing of the passenger domain (Figure 1B).

a) Translocation across the inner membrane

Autotransporters exhibit an N-terminal sequence bearing most of the typical features of *sec*-dependent signal peptides [5]. Accordingly, the translocation of some autotransporters across the inner membrane was shown to be mediated by SRP and/or SecY, two components of the *sec* machinery [25-27]. Some autotransporters, such as the group of serine proteases autotransporters of *enterobacteriaceae*, have an unusually long signal peptide with an N-terminal extension [28]. It has been proposed that this signal sequence could prevent the protein from adopting a conformation incompetent with the translocation across the inner membrane [25]. It has also been suggested that the long sequence signal might prevent the protein from adopting a conformation in the periplasm that is incompetent for translocation across the outer membrane [29]. The N-terminal extension of the signal peptide might perform this function by associating with an unknown cytoplasmic factor or by adopting a conformation altering its affinity for the secretion machinery [27].

b) Periplasmic transport

After crossing the inner membrane, the protein exists as a periplasmic intermediate [12]. Many studies have tried to elucidate the folding state of the passenger domain prior to translocation across the outer membrane, in this intermediary state. These studies have largely resorted to replacing original passenger domains with heterologous proteins and monitoring or affecting their folding [30-39]. The earliest experiments were performed using the B subunit of the cholera toxin (CtxB) fused to the TU of the IgA protease of *N. gonorrhoeae*. CtxB contains cysteines that can

become disulphide bonded in the periplasm. It was initially shown that the translocation of CtxB is affected when it is able to form disulphide bonds, and that the protein was blocked in the periplasm [30, 31]. Indeed, CtxB mutants without cysteine were translocated more efficiently. A similar effect was observed when adding β -mercaptoethanol in the growth medium or when using *dsbA* mutant strains, conditions that prevent the formation of disulphide bonds in the periplasm [35]. Disulphide bond formation is a slow step on the path of protein folding and the presence of such bonds is often used as a surrogate marker for folding. These experiments were therefore interpreted as indicative of an incompatibility between periplasmic folding and outer membrane translocation in autotransporters. In other experiments, PhoA, a periplasmic protein containing cysteines, was fused to the TU of the IcsA autotransporter of *Shigella flexneri* [33]. The translocation of PhoA across the bacterial outer membrane was incomplete and could be increased when it was not allowed to form disulphide bonds in the periplasm, confirming the results observed with CtxB. Similar experiments were performed with various combinations of TU and cysteine-containing heterologous passenger domains, endorsing the same conclusions [34].

Recent studies, however, showed that single-chain antibody fragments (ScFv) fused to the TU of the IgA protease of *N. gonorrhoeae* can be found in an active conformation on the bacterial surface [36, 37]. Disulphide bond formation is necessary for a ScFv to adopt a correctly folded conformation and it was shown that the disulphide bond could be formed in the periplasm. Thus it was concluded that the protein was folded prior to translocation, contradicting previous observations. More experiments soon followed, suggesting that folded polypeptides could indeed be translocated across the outer membrane by autotransporters. For instance, a study using a fusion between the TU of the *Escherichia coli* adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I) and the B subunit of the *E. coli* heat

labile enterotoxin as the passenger domain, showed that the presence of a disulphide bond had little effects on the translocation efficiency [38]. In another study, the native passenger domain of IcsA was shown to contain a disulphide bond in the periplasm prior to translocation [40]. Lastly, another study using fusions between CtxB and the TU of EspP, an *E. coli* autotransporter, showed that translocation of a folded or at least partially folded passenger domain was possible [39].

All those experiments were performed using disulphide bond formation as an indicator of folding and by manipulating the ability to form those bonds in order to assess the effect of folding on translocation. The absence or presence of disulphide bonds, however, can not always correlate with the folding state of a protein [41]. Furthermore, manipulating the ability to form disulphide bonds by mutating the cysteines of passenger domains or by changing the periplasmic redox environment can have uncontrolled effects on the protein or induce bacterial stress responses [42]. This can complicate the interpretations of these studies when they try to strictly evaluate the impact of folding on translocation. A recent study using MalE, a periplasmic protein without cysteine, fused to the TU of AIDA-I showed that the folding of the passenger domain interferes with translocation by using MalE variants with intrinsic folding defects [43].

Putting the published observations together, it seems likely that AT can accommodate some degree of periplasmic folding prior to translocation but that the nature or the extent of the folding must remain compatible with the mechanism of translocation. We can envision different reasons why folding would interfere with translocation: (i) the overall size of the folded polypeptide could have to remain under a certain limit to accommodate the size of the translocation conduit, (ii) the shape of the folded polypeptide might have to respect some constraints of the conduit or (iii) the folding characteristics of some polypeptides (such as speed, recruitment of chaperones or others) could force their active sorting to the periplasm and prevent their translocation. Size seems to have critical importance because of the limited diameter of the

pore, regardless of the translocation model considered. However, natural passenger domains of autotransporters are always polypeptides of at least 300 aminoacids. It might thus be more the shape of the passenger domains rather than the size *per se* that must be considered. Indeed, analysis of natural passenger domains of autotransporters suggested a preference towards β -helix [44], a prediction confirmed by the structures of the two passenger domains of autotransporters solved to date, that of *Bordetella pertussis* pertactin [45], and that of *E. coli* haemoglobin protease [46]. Both structures share a main fold consisting of an extended right-handed parallel β -helix. This helix has a cylindrical shape with a diameter of 20 to 30 angströms and a length of 100 to 140 angströms. In both structures, however, additional protruding loops or whole domains considerably extend the diameter of the cylinder to sizes up to 80 angströms. Collectively, the available observations suggest that domains of about 20 angströms in size could be translocated even folded but that bigger domains such as the ones found in native autotransporter passenger domains have to remain at least partially unfolded in order to be translocated. Consequently, it is likely that a mechanism exists preventing premature incompatible folding in the periplasm and/or that a precise coupling between folding and translocation exists. The typical β -helical fold of AT might be uniquely adapted to this putative mechanism.

c) Insertion into and translocation across the outer membrane

It is commonly admitted that the crossing of the outer membrane by AT can be separated into two steps [31]: first the insertion of the TU in the outer membrane and then translocation of the passenger domain at the cell surface. Many different models have been proposed to detail those steps (Figure 2, [13]). The models are mainly based on the observations regarding periplasmic folding of the passenger domain, and the structural studies of the TU. In some AT, the limits of the TU were experimentally mapped and its structure was predicted to consist in an α -helix and a

β -barrel. Recently, the crystal structure of the TU of the NalP autotransporter of *Neisseria meningitidis* was obtained [47], confirming earlier studies. The structure consists in a twelve-stranded β -barrel and an α -helix inserted in the β -barrel lumen with the N terminus of the α -helix, linking to the passenger domain, localized at the extracellular side of the outer membrane. The largest dimension of the pore of the β -barrel can be estimated at about 10 angströms. Such a size is only compatible with the hypothesis that the translocation of the passenger domains involves the movement of unfolded polypeptides through the lumen of the β -barrel. Interestingly, according to this hypothesis, the folding of the translocating polypeptide once it reaches the extracellular milieu could also provide the energy for translocation. Two models have been proposed based on this hypothesis. One model suggests that the passenger domain is translocated starting with its C terminus, the autochaperone domain. This would result in the formation of a hairpin structure and thus the model was called “hairpin model” (Figure 2A). However, the size of the pore can at best accommodate only two unfolded polypeptide chains simultaneously, suggesting that the α -helix does not fold before the translocation is completed. An alternative model suggests that the passenger domain is translocated starting with its N terminus. This model, called the “threading model” (Figure 2B), might alleviate the steric problem of the hairpin model because only one polypeptide would be in the pore during translocation. However, this model seems unlikely because it implies the recognition of the N-terminus by the TU, whereas unrelated heterologous passenger domain can also be translocated.

None of these models, however, can take into account the translocation of even partially folded polypeptides because of the narrow lumen of one β -barrel. Another model, a “multimeric model” (Figure 2C), was proposed, based on the observation that TUs of autotransporters could form ring-like structures visualized by electron microscopy [48]. The size of the central cavity of

these ring structures was estimated at around 20 angströms. This size is large enough to allow translocation of folded small proteins, of partially folded larger proteins, or of multidomain proteins for which individual domain could be sequentially translocated. The multimeric model therefore solves the steric problems of the hairpin or threading models. This model, however, is inconsistent with the structure of the TU of NalP for which no oligomer was observed [47]. It is also inconsistent with the observation that the α -helix, which is connected to the passenger domain, is located inside the lumen of the β -barrel and not outside, as the multimeric model would require [47]. Furthermore, if passenger domains are translocated folded it is unclear what the energy source for the translocation would be. Lastly, two studies have recently demonstrated that the TU of AIDA-I and EspP are not multimeric [39, 49].

The previous models entail important steric and/or mechanistic problems. An alternative model, called the “Omp85 model” (Figure 2D), hypothesizes that translocation of AT involves an extracytoplasmic machinery. Omp85 is an essential protein present in all Gram-negative bacteria and was suggested to promote the insertion of integral outer membrane proteins, including the TU of autotransporters [50]. In this task, Omp85 might cooperate with other periplasmic proteins such as SkpA, SurA, and others [51]. Since these essential proteins are implicated in the insertion of outer membrane proteins, some of which contain extracellular loops representing up to half of the protein, it was suggested that the same machinery could be involved in the translocation of passenger domains. It is however difficult to differentiate the contribution of Omp85 in the insertion of the TU and in the translocation of the passenger domain. The “Omp85 model” thus remains untested.

In conclusion, the contradictory results obtained while studying the mechanism of translocation across the outer membrane have been confusing and, to this date, no satisfying

model has emerged to account for all the observations. The outer membrane translocation step thus remains mysterious. More molecular structures of the translocation unit as well as *in vitro* and *in vivo* biochemical studies on folding and translocation are eagerly awaited.

d) Processing of the passenger domain

In many AT, the passenger domain is cleaved after translocation. Then, the passenger domain can be released in the extracellular milieu or remain associated non-covalently with the outer membrane. This is for instance the case of the *Haemophilus influenzae* adhesin Hap, for which the cleavage is mediated by a domain of the passenger domain bearing a serine protease catalytic site and acting in *trans* [52]. In some other instances, the cleavage might be performed by an accessory outer membrane protease. This is for instance the case with the protease SopA of *S. flexneri* that cleaves the AT IcsA [53]. In some AT, however, no protease catalytic site has been identified and no accessory protein has been found responsible for their cleavage post-translocation. This is the case, for instance, of the *E. coli* AIDA-I adhesin [54]. The cleavage in those cases could be due to local structural constraints.

Using autotransporters as a tool for surface display

Bacterial surface display has found many uses in the past few years. Displaying single or multiple epitopes, as well as complete proteins, on the bacterial surface can yield recombinant vaccines that can possibly be taken orally [1, 2, 55]. Such recombinant bacteria can also be used for the production of antigens or antibodies necessary in the design of diagnostic tools. Bacterial surface display has also been used in the high throughput screening of peptide and enzyme libraries [56]. Bacteria can also display functional recombinant enzymes at their surfaces and can thus be used as “biofactories” that can be used in many biotechnological applications [1, 2, 17].

When the displayed enzyme can be easily released such constructs also represent good starting material in purification processes. Bacterial surface display has advantages compared to other surface display systems such as phage display. Compared with phage, bacteria are self-replicative and are bigger organisms that allow stable presentation of larger proteins. Furthermore, proteins expressed at the cell surface of bacteria can be analyzed by optical methods such as Fluorescence Assisted Cell Sorting, in addition to the other screens performed with phages [17].

Many systems exist for the display of foreign polypeptides at the surface of bacteria, all of which rely on the fusion to a carrier protein [2, 3, 57]. These proteins obviously have to be able to transport a foreign protein at the cell surface but they should also permit the display of correctly folded and stable polypeptides. Some carrier proteins, such as flagellin or pilin, need their N and C termini to remain free in order to interact correctly with other proteins promoting their export. In those cases, the display strategy is to insert foreign proteins in permissive loops of these carriers. Similarly, some carrier integral outer membrane proteins have both N and C termini located in the periplasm, forcing the use of permissive loops. Heterologous polypeptides displayed in those loops must therefore have their N and C termini in spatial proximity so as not to distort the connectivity of permissive loop to too great an extent. Even though linkers can be added to partially alleviate this problem, such constraints limit the applicability of display systems using permissive loops. Furthermore the cloning in permissive loops is often incompatible with the release of the displayed polypeptide. In some systems the fusion can be made to the N or C terminus of the carrier protein. One example of such a carrier system is the chimera resulting from the fusion between the leader peptide and the first nine aminoacids of *E. coli* outer membrane lipoprotein Lpp and a portion of the outer membrane protein OmpA [58]. In this construct, the chimera has its C terminus facing the extracellular milieu, allowing the display of heterologous proteins. However, in this system, as well as in many others, the displayed

protein affects the integrity of the carrier protein or the resulting fusion causes toxicity issues in the strain expressing it [59]. As a consequence, most carriers are limited to the display of polypeptides of typically less than 100 aminoacids.

In this context, autotransporters have two main advantages. First, they are simple systems that allow proteins to be transported from the cytoplasm to the cell surface as an N-terminal fusion. And second, the autotransporters are natural bacterial outer membrane proteins displaying large proteins and they therefore accommodate bigger recombinant polypeptides without toxicity, even at relatively high production yields. Consequently, the autotransporters have been widely used for display (Table 1). However, as detailed above, the recent progress made in our understanding of the structure and function of autotransporters highlights important details to be considered when contemplating the use of autotransporters as display systems:

- First, the nature of the passenger domain greatly influences the efficiency of the translocation. As described above, the presence of cysteines and, more generally, the ability to fold in the periplasm could interfere with translocation. Recombinant proteins that fold quickly in the periplasm will likely be prevented from translocating if they are not restricted to a small size or to a certain shape. If the protein to be displayed contains cysteines, their location in the protein should be considered. If cysteines are close in the sequence of the protein, it is possible that the formation of a disulphide bond does not require the protein to adopt an extended tertiary structure and therefore does not affect translocation. However, translocation often seems to be enhanced when the protein does not contain any disulphide bond. If the cysteines cannot be replaced by other aminoacids, the use of a *dsbA* strain or the addition of β -mercaptoethanol in the growth medium could increase the efficiency of surface display. These conditions might however prevent the normal folding of the displayed protein or cause some toxicity.

- Second, the nature of the signal sequence allowing translocation across the inner membrane should also be considered. As stated above, some AT exhibit peculiarly long signal sequences. Even though the role of the latter is not definitely established, it seems to be necessary for correct translocation, at least for native passenger domains. When using the TU from an AT bearing a long signal sequence it might therefore be necessary to keep such a signal in order to optimize translocation efficiency.

- Third, even though the TU is the minimal part of the AT required for translocation across the outer membrane, the autochaperone domain was shown to improve secretion. Since some studies argue that this effect is mediated in part by interactions of the autochaperone domain with the TU, keeping the autochaperone domain in the construction of AT-based display vectors might ensure optimal translocation efficiency. Additionally, in some models, the autochaperone folding is thought to provide the energy driving translocation.

- And lastly, as described above, in some AT the passenger domain stays linked to the outer membrane whereas in others it is cleaved and released in the extracellular milieu. Depending on the application, one or the other option can be chosen. In the case where the protein of interest is to be released, the protease responsible for the cleavage should be provided in *trans* and the construct should bear the cleavage site freely accessible. The choice of the host strain might thus have an impact in this regard as the presence of the extracellular proteases, such as OmpT for example, is known to cleave some AT that have lost their natural passenger domains.

Conclusions

Using secretion systems or secreted proteins naturally present in bacteria as tools for surface display of foreign polypeptides represents an attractive prospect for many biotechnological applications. However, the complexity of most secretion systems and the structural constraints bearing on secreted proteins can be a disadvantage. The more complex the proteins are and the more steps involved in their secretion there are, the more chances there are to prevent critical interactions and to block efficient secretion. By contrast, AT of Gram-negative bacteria stand out with their simplicity and versatility. AT tolerate the replacement of their N-terminal passenger domain by a variety of heterologous proteins, with apparently few constraints on the nature of the polypeptides to be displayed. As our understanding of the molecular mechanism of the biogenesis of AT gets more detailed, some new considerations are emerging when considering these proteins as display systems. Folding of the polypeptide to be displayed in the periplasm prior to translocation can have some important effects on translocation, either because of the size or the shape attained by the heterologous protein. The presence of AT-specific signal sequence and of an autochaperone domain can also have dramatic consequences on translocation. Lastly, it should be kept in mind that many AT are cleaved after translocation and released in the extracellular milieu. These considerations should not be viewed as limitations of the AT display system. Indeed, AT have already proven to be extremely efficient as carrier proteins and it can be expected that, as our understanding of these proteins grows, we will be able to make the most out of their exploitation.

Authors' contributions

Nancy Rutherford and Michael Mourez have contributed equally to this review.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial help of the GREMIP, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (discovery grant 262746), of the Canada Research Chair program and the Canada Foundation for Innovation (project 201414).

List of abbreviations

AIDA-I: Adhesin involved in diffuse adherence

AT: Autotransporter

CtxB: Cholera toxin B subunit

Sec: General secretion machinery

ScFv: Single chain antibody variable fragment

Tat: Twin arginine translocation

TPS: Two-partner secretion

TU: Translocation Unit

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Figure Legends

Figure 1: Organization and biogenesis of autotransporters

A. The typical organization of an autotransporter comprising an N-terminal signal sequence (SS), a passenger domain and a translocation unit.

B. The biogenesis of an autotransporter has four main steps: translocation across the inner membrane, periplasmic transport, insertion into and translocation across the outer membrane and processing of the passenger domain.

Figure 2: Mechanistic models of outer membrane translocation by autotransporters

A. Hairpin model. B. Threading model. C. Multimeric model. D. Omp85 model.

Table 1: Heterologous proteins fused to TU of autotransporters and their surface display applications

Passenger domain	TU	Application	References
Cholera toxin B subunit (CtxB)	EspP	Translocation studies	[39]
Shiga toxin B subunit (StxB)	MisL	Vaccination	[60]
Epitope, <i>Plasmodium falciparum</i>	MisL	Vaccination	[60, 61]
Aprotinin	Aida-I	Biocatalysis	[34]
OspG	Aida-I	Translocation studies	[49]
Sorbitol dehydrogenase	Aida-I	Biocatalysis	[62]
Urease A subunit, <i>Helicobacter pylori</i>	Aida-I	Biocatalysis	[63]
Epitope, <i>Y. enterocolytica</i>	Aida-I	Vaccination	[55]
Invasin of <i>M. tuberculosis</i>	Aida-I	Study of displayed protein	[64]
Bovine adrenodoxin (Adx)	Aida-I	Biocatalysis	[65]
β -lactamase	Aida-I	Translocation studies	[32]
Heat labile enterotoxin B subunit (LTB)	Aida-I	Translocation studies	[38]
Epitope, HIV	Aida-I	Translocation studies	[16]
Cholera toxin B subunit (CtxB)	Aida-I	Translocation studies	[16]
Human cathepsin G inhibitor	Aida-I	Translocation studies	[16]
Lipolytic enzymes	EstA	Biocatalysis, Random screening	[66]
β -lactamase	EstA	Biocatalysis	[67]
FimH lectin domain	Ag43	Translocation studies	[68]
Various epitopes	Ag43	Translocation studies	[69]
MalE	IcsA	Vaccination	[69]
PhoA	IcsA	Translocation studies	[33]
Pseudoazurin	Ssp	Translocation studies	[33]
Fos and Jun leucine zipper domains	IgA protease	Translocation studies	[70]
Single-chain antibody (scFv)	IgA protease	Translocation studies	[71]
Anti-coronavirus ScFv	IgA protease	Translocation studies	[36]
Cholera toxin B subunit (CtxB)	IgA protease	Drug delivery	[72]
Mouse metallotionein	IgA protease	Translocation studies	[30]
		Biocatalysis	[73]

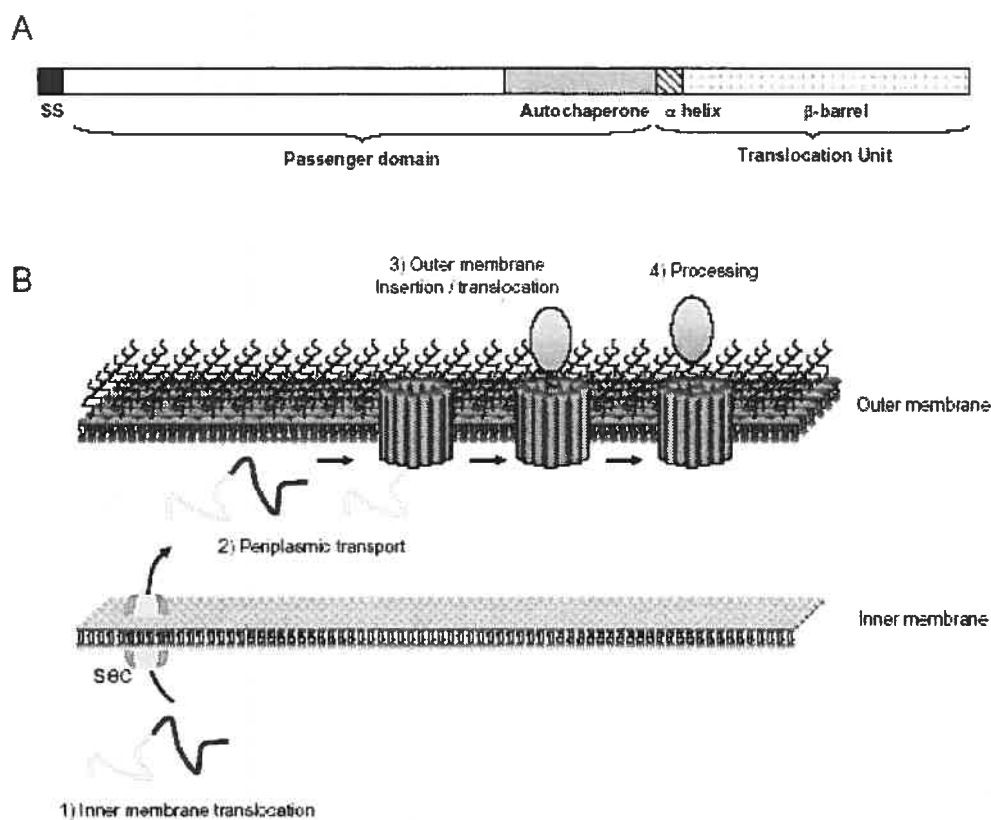


Figure 1

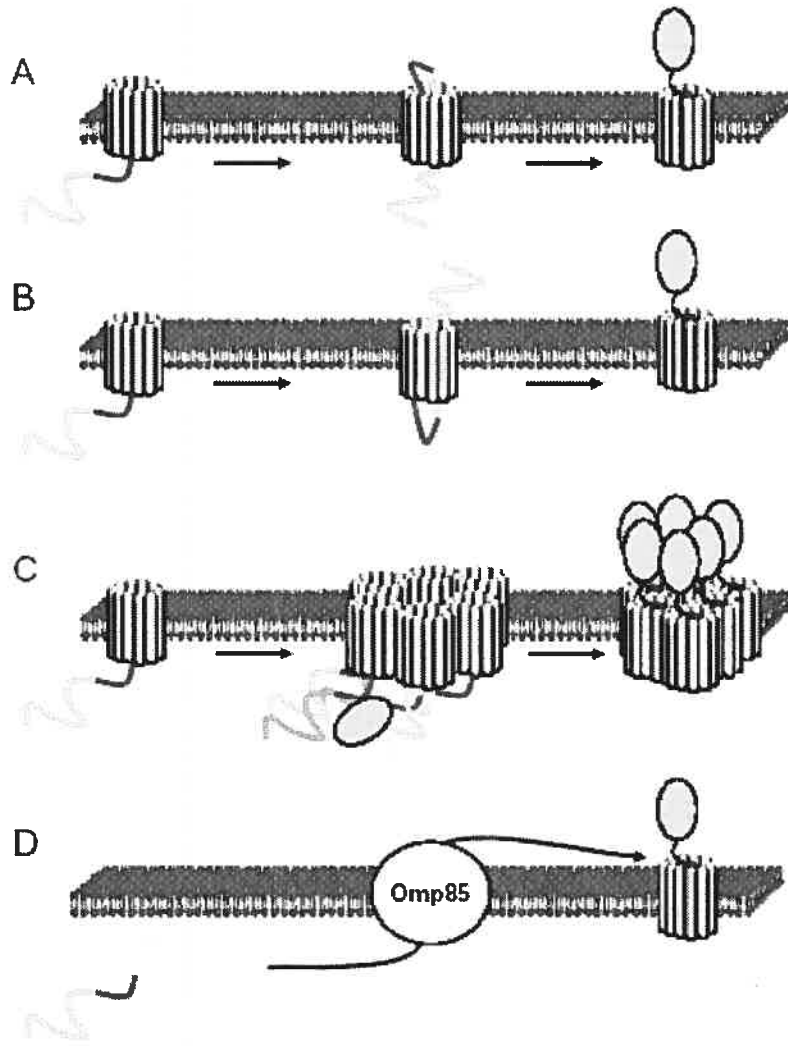


Figure 2

References

1. Lee SY, Choi JH, Xu Z: **Microbial cell-surface display.** *Trends Biotechnol* 2003, **21**(1):45-52.
2. Samuelson P, Gunneriusson E, Nygren PA, Stahl S: **Display of proteins on bacteria.** *J Biotechnol* 2002, **96**(2):129-154.
3. Desvaux M, Dumas E, Chafsey I, Hebraud M: **Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure.** *FEMS Microbiol Lett* 2006, **256**(1):1-15.
4. Lee VT, Schneewind O: **Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections.** *Genes Dev* 2001, **15**(14):1725-1752.
5. de Keyzer J, van der Does C, Driessen AJ: **The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex.** *Cell Mol Life Sci* 2003, **60**(10):2034-2052.
6. Palmer T, Sargent F, Berks BC: **Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway.** *Trends Microbiol* 2005, **13**(4):175-180.
7. Delepelaire P: **Type I secretion in gram-negative bacteria.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1694**(1-3):149-161.
8. Filloux A: **The underlying mechanisms of type II protein secretion.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1694**(1-3):163-179.
9. Voulhoux R, Ball G, Ize B, Vasil ML, Lazdunski A, Wu LF, Filloux A: **Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway.** *Embo J* 2001, **20**(23):6735-6741.
10. Ghosh P: **Process of protein transport by the type III secretion system.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2004, **68**(4):771-795.
11. Christie PJ: **Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1694**(1-3):219-234.
12. Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D: **Type V protein secretion pathway: the autotransporter story.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2004, **68**(4):692-744.
13. Desvaux M, Parham NJ, Henderson IR: **The autotransporter secretion system.** *Res Microbiol* 2004, **155**(2):53-60.
14. Jacob-Dubuisson F, Fernandez R, Coutte L: **Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1694**(1-3):235-257.
15. Cotter SE, Surana NK, St Geme JW, 3rd: **Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins.** *Trends Microbiol* 2005, **13**(5):199-205.
16. Maurer J, Jose J, Meyer TF: **Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 1997, **179**(3):794-804.
17. Jose J: **Autodisplay: efficient bacterial surface display of recombinant proteins.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, **69**(6):607-614.
18. Pohlner J, Halter R, Beyreuther K, Meyer TF: **Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease.** *Nature* 1987, **325**(6103):458-462.
19. Henderson IR, Nataro JP: **Virulence functions of autotransporter proteins.** *Infect Immun* 2001, **69**(3):1231-1243.

20. Girard V, Mourez M: **Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: Structural and functional features.** *Res Microbiol*, in press.
21. Klauser T, Kramer J, Otzelberger K, Pohlner J, Meyer TF: **Characterization of the *Neisseria Iga* beta-core. The essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion.** *J Mol Biol* 1993, **234**(3):579-593.
22. Oliver DC, Huang G, Fernandez RC: **Identification of secretion determinants of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter.** *J Bacteriol* 2003, **185**(2):489-495.
23. Oliver DC, Huang G, Nodel E, Pleasance S, Fernandez RC: **A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain.** *Mol Microbiol* 2003, **47**(5):1367-1383.
24. Mogensen JE, Tapadar D, Schmidt MA, Otzen DE: **Barriers to folding of the transmembrane domain of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence.** *Biochemistry* 2005, **44**(11):4533-4545.
25. Sijbrandi R, Urbanus ML, ten Hagen-Jongman CM, Bernstein HD, Oudega B, Otto BR, Luirink J: **Signal recognition particle (SRP)-mediated targeting and Sec-dependent translocation of an extracellular *Escherichia coli* protein.** *J Biol Chem* 2003, **278**(7):4654-4659.
26. Brandon LD, Goehring N, Janakiraman A, Yan AW, Wu T, Beckwith J, Goldberg MB: **IcsA, a polarly localized autotransporter with an atypical signal peptide, uses the Sec apparatus for secretion, although the Sec apparatus is circumferentially distributed.** *Mol Microbiol* 2003, **50**(1):45-60.
27. Peterson JH, Szabady RL, Bernstein HD: **An unusual signal peptide extension inhibits the binding of bacterial presecretory proteins to the signal recognition particle, trigger factor and the SecYEG complex.** *J Biol Chem* 2006.
28. Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP: **The great escape: structure and function of the autotransporter proteins.** *Trends Microbiol* 1998, **6**(9):370-378.
29. Szabady RL, Peterson JH, Skillman KM, Bernstein HD: **An unusual signal peptide facilitates late steps in the biogenesis of a bacterial autotransporter.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(1):221-226.
30. Klauser T, Pohlner J, Meyer TF: **Extracellular transport of cholera toxin B subunit using *Neisseria Iga* protease beta-domain: conformation-dependent outer membrane translocation.** *Embo J* 1990, **9**(6):1991-1999.
31. Klauser T, Pohlner J, Meyer TF: **Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of *Neisseria Iga* beta-mediated outer membrane transport.** *Embo J* 1992, **11**(6):2327-2335.
32. Lattemann CT, Maurer J, Gerland E, Meyer TF: **Autodisplay: functional display of active beta-lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter.** *J Bacteriol* 2000, **182**(13):3726-3733.
33. Suzuki T, Lett MC, Sasakawa C: **Extracellular transport of VirG protein in *Shigella*.** *J Biol Chem* 1995, **270**(52):30874-30880.
34. Jose J, Zangen D: **Autodisplay of the protease inhibitor aprotinin in *Escherichia coli*.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **333**(4):1218-1226.
35. Jose J, Kramer J, Klauser T, Pohlner J, Meyer TF: **Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the *Escherichia coli* cell surface via the *Iga* beta autotransporter pathway.** *Gene* 1996, **178**(1-2):107-110.

36. Veiga E, de Lorenzo V, Fernandez LA: **Probing secretion and translocation of a beta-autotransporter using a reporter single-chain Fv as a cognate passenger domain.** *Mol Microbiol* 1999, **33**(6):1232-1243.
37. Veiga E, de Lorenzo V, Fernandez LA: **Structural tolerance of bacterial autotransporters for folded passenger protein domains.** *Mol Microbiol* 2004, **52**(4):1069-1080.
38. Konieczny MP, Suhr M, Noll A, Autenrieth IB, Alexander Schmidt M: **Cell surface presentation of recombinant (poly-) peptides including functional T-cell epitopes by the AIDA autotransporter system.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000, **27**(4):321-332.
39. Skillman KM, Barnard TJ, Peterson JH, Ghirlando R, Bernstein HD: **Efficient secretion of a folded protein domain by a monomeric bacterial autotransporter.** *Mol Microbiol* 2005, **58**(4):945-958.
40. Brandon LD, Goldberg MB: **Periplasmic transit and disulfide bond formation of the autotransported *Shigella* protein IcsA.** *J Bacteriol* 2001, **183**(3):951-958.
41. Wedemeyer WJ, Welker E, Narayan M, Scheraga HA: **Disulfide bonds and protein folding.** *Biochemistry* 2000, **39**(23):7032.
42. Ruiz N, Silhavy TJ: **Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope.** *Curr Opin Microbiol* 2005, **8**(2):122-126.
43. Rutherford N, Charbonneau M, Berthiaume F, Betton J, Mourez M: **The periplasmic folding of a cysteine-less autotransporter passenger domain interferes with its outer membrane translocation.** *J Bacteriol*, in press.
44. Junker M, Schuster CC, McDonnell AV, Sorg KA, Finn MC, Berger B, Clark PL: **Pertactin beta-helix folding mechanism suggests common themes for the secretion and folding of autotransporter proteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(13):4918-4923.
45. Emsley P, Charles IG, Fairweather NF, Isaacs NW: **Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin.** *Nature* 1996, **381**(6577):90-92.
46. Otto BR, Sijbrandi R, Luirink J, Oudega B, Heddle JG, Mizutani K, Park SY, Tame JR: **Crystal Structure of Hemoglobin Protease, a Heme Binding Autotransporter Protein from Pathogenic *Escherichia coli*.** *J Biol Chem* 2005, **280**(17):17339-17345.
47. Oomen CJ, Van Ulsen P, Van Gelder P, Feijen M, Tommassen J, Gros P: **Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter.** *Embo J* 2004, **23**(6):1257-1266.
48. Veiga E, Sugawara E, Nikaido H, de Lorenzo V, Fernandez LA: **Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains.** *Embo J* 2002, **21**(9):2122-2131.
49. Muller D, Benz I, Tapadar D, Buddenborg C, Greune L, Schmidt MA: **Arrangement of the translocator of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence on the bacterial surface.** *Infect Immun* 2005, **73**(7):3851-3859.
50. Voulhoux R, Bos MP, Geurtsen J, Mols M, Tommassen J: **Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly.** *Science* 2003, **299**(5604):262-265.
51. Wu T, Malinverni J, Ruiz N, Kim S, Silhavy TJ, Kahne D: **Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*.** *Cell* 2005, **121**(2):235-245.

52. Fink DL, Cope LD, Hansen EJ, Geme JW, 3rd: **The *Hemophilus influenzae* Hap autotransporter is a chymotrypsin clan serine protease and undergoes autoproteolysis via an intermolecular mechanism.** *J Biol Chem* 2001, **276**(42):39492-39500.
53. Egile C, d'Hauteville H, Parsot C, Sansonetti PJ: **SopA, the outer membrane protease responsible for polar localization of IcsA in *Shigella flexneri*.** *Mol Microbiol* 1997, **23**(5):1063-1073.
54. Suhr M, Benz I, Schmidt MA: **Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDA_c and evidence for the outer membrane anchoring as a beta-barrel structure.** *Mol Microbiol* 1996, **22**(1):31-42.
55. Kramer U, Rizos K, Apfel H, Autenrieth IB, Lattemann CT: **Autodisplay: development of an efficacious system for surface display of antigenic determinants in *Salmonella* vaccine strains.** *Infect Immun* 2003, **71**(4):1944-1952.
56. Chen W, Georgiou G: **Cell-Surface display of heterologous proteins: From high-throughput screening to environmental applications.** *Biotechnol Bioeng* 2002, **79**(5):496-503.
57. Lee HW, Byun SM: **The pore size of the autotransporter domain is critical for the active translocation of the passenger domain.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **307**(4):820-825.
58. Francisco JA, Earhart CF, Georgiou G: **Transport and anchoring of beta-lactamase to the external surface of *Escherichia coli*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**(7):2713-2717.
59. Georgiou G, Stephens DL, Stathopoulos C, Poetschke HL, Mendenhall J, Earhart CF: **Display of beta-lactamase on the *Escherichia coli* surface: outer membrane phenotypes conferred by Lpp'-OmpA'-beta-lactamase fusions.** *Protein Eng* 1996, **9**(2):239-247.
60. Zhu C, Ruiz-Perez F, Yang Z, Mao Y, Hackethal VL, Greco KM, Choy W, Davis K, Butterson JR, Boedeker EC: **Delivery of heterologous protein antigens via hemolysin or autotransporter systems by an attenuated ler mutant of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*.** *Vaccine* 2005.
61. Ruiz-Perez F, Leon-Kempis R, Santiago-Machuca A, Ortega-Pierres G, Barry E, Levine M, Gonzalez-Bonilla C: **Expression of the *Plasmodium falciparum* immunodominant epitope (NANP)(4) on the surface of *Salmonella enterica* using the autotransporter MisL.** *Infect Immun* 2002, **70**(7):3611-3620.
62. Jose J, von Schwichow S: **Autodisplay of active sorbitol dehydrogenase (SDH) yields a whole cell biocatalyst for the synthesis of rare sugars.** *Chembiochem* 2004, **5**(4):491-499.
63. Rizos K, Lattemann CT, Bumann D, Meyer TF, Aebischer T: **Autodisplay: efficacious surface exposure of antigenic UreA fragments from *Helicobacter pylori* in *Salmonella* vaccine strains.** *Infect Immun* 2003, **71**(11):6320-6328.
64. Casali N, Konieczny M, Schmidt MA, Riley LW: **Invasion activity of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide presented by the *Escherichia coli* AIDA autotransporter.** *Infect Immun* 2002, **70**(12):6846-6852.
65. Jose J, Bernhardt R, Hannemann F: **Cellular surface display of dimeric Adx and whole cell P450-mediated steroid synthesis on *E. coli*.** *J Biotechnol* 2002, **95**(3):257-268.

66. Jose J, Betscheider D, Zangen D: **Bacterial surface display library screening by target enzyme labeling: Identification of new human cathepsin G inhibitors.** *Anal Biochem* 2005, **346**(2):258-267.
67. Becker S, Theile S, Heppeler N, Michalczyk A, Wentzel A, Wilhelm S, Jaeger KE, Kolmar H: **A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes.** *FEBS Lett* 2005, **579**(5):1177-1182.
68. Yang TH, Pan JG, Seo YS, Rhee JS: **Use of *Pseudomonas putida* EstA as an anchoring motif for display of a periplasmic enzyme on the surface of *Escherichia coli*.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**(12):6968-6976.
69. Kjaergaard K, Hasman H, Schembri MA, Klemm P: **Antigen 43-mediated autotransporter display, a versatile bacterial cell surface presentation system.** *J Bacteriol* 2002, **184**(15):4197-4204.
70. Shimada K, Ohnishi Y, Horinouchi S, Beppu T: **Extracellular transport of pseudoazurin of *Alcaligenes faecalis* in *Escherichia coli* using the COOH-terminal domain of *Serratia marcescens* serine protease.** *J Biochem (Tokyo)* 1994, **116**(2):327-334.
71. Veiga E, de Lorenzo V, Fernandez LA: **Autotransporters as scaffolds for novel bacterial adhesins: surface properties of *Escherichia coli* cells displaying Jun/Fos dimerization domains.** *J Bacteriol* 2003, **185**(18):5585-5590.
72. Veiga E, De Lorenzo V, Fernandez LA: **Neutralization of enteric coronaviruses with *Escherichia coli* cells expressing single-chain Fv-autotransporter fusions.** *J Virol* 2003, **77**(24):13396-13398.
73. Valls M, Atrian S, de Lorenzo V, Fernandez LA: **Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil.** *Nat Biotechnol* 2000, **18**(6):661-665.

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Nancy Rutherford		
Sigle du programme M.Sc	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Microbiologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Nancy RUTHERFORD, Marie-Eve CHARBONNEAU, Frédéric BERTHIAUME, Jean-Michel BETTON, Michael MOUREZ	
Titre The periplasmic folding of a cysteine-less autotransporter passenger domain interferes with its outer membrane translocation	
Revue Journal of Bacteriology	Date de publication Juin 2006

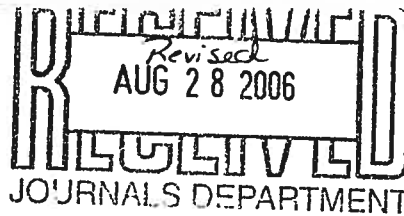
DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Frédéric BERTHIAUME, Nancy RUTHERFORD, Michael MOUREZ	
Titre In vivo reconstitution of outer membrane translocation by two fragments of an autotransporter independently expressed in the periplasm of Escherichia coli	
Revue Molecular Microbiology	Date de publication soumis

DÉCLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>À titre de coauteurs des articles identifiés ci-dessus, nous autorisons le microfilmage du mémoire et nous sommes d'accord que Nancy Rutherford inclut ces articles dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Étude de la biogenèse d'un autotransporteur d'Escherichia coli appelé Adhesin Invo</i>	
Coauteur Michael Mourez	Date 24/07/2006
Coauteur Frédéric Berthiaume	Date 26/06/2006
Coauteur Marie-Eve Charbonneau	Date 04/07/2006
Coauteur Jean-Michel Betton	Date 19/06/2006

¹Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001



28-08-2006,

To:
Journals Dept, American Society for Microbiology
1752 N Street, N. W.,
Washington DC, 20036-2904, USA

Subject: answer to "Your permissions/Reprint order/Photocopy request dated: 8/25/06 "

My name is Nancy Rutherford and I work as a MSc student in Dr Mourez's laboratory at the University of Montreal. I am the first author of the following article:

"The periplasmic folding of a cysteineless autotransporter passenger domain interferes with its outer membrane translocation."

Rutherford N., M-E. Charbonneau, F. Berthiaume, J-M. Betton, and M. Mourez.

This article was published in the "Journal of Bacteriology" in june 2006 (188(11): 4111-6).

I would like to have a permission to put this article in my thesis:
"Étude de la biogenèse d'un autotransporteur d'*Escherichia coli* appelé Adhesin Involved in Diffuse Adherence (AIDA-I)".

Can you send me the permission by email at:

[Redacted]

or at this fax number: 1-450-778-8108

Thank you,
Nancy Rutherford.

[Redacted]

PERMISSION GRANTED
CONTINGENT ON AUTHOR PERMISSION (which you must obtain)
AND APPROPRIATE CREDIT
American Society for Microbiology
Journals Department

Date 9-5-06

