

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

**ETUDE ET INHIBITION DE L'ADHÉSINE IMPLIQUÉE DANS L'ADHÉRENCE  
DIFFUSE (AIDA-I) D'*ESCHERICHIA COLI***

par

**VICTORIA GIRARD**

**Département de pathologie et microbiologie  
Faculté de médecine vétérinaire**

**Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade  
de Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en sciences vétérinaires  
option microbiologie**

**Mai, 2008  
© Victoria Girard, 2008**

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

ÉTUDE ET INHIBITION DE L'ADHÉSINE IMPLIQUÉE DANS  
L'ADHÉRENCE DIFFUSE (AIDA-I) D'*ESCHERICHIA COLI*

présentée par

VICTORIA GIRARD

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Marcelo Gottschalk, président-rapporteur

Michaël Mourez, directeur de recherche

J. Daniel Dubreuil, membre du jury

Charles M. Dozois, examinateur externe

Mario Jacques, représentant du doyen de la FÉS



## RÉSUMÉ

L'adhésine impliquée dans l'adhérence diffuse (AIDA-I) est une adhésine bactérienne associée à certaines souches d'*Escherichia coli* causant la diarrhée. Il s'agit d'un autotransporteur appartenant à la famille des SAAT (Self-Associating Autotransporters) en raison de ses capacités à autoagréger et former des biofilms, en plus de sa fonction première qui est d'adhérer à des cellules épithéliales. Nous nous intéressons dans ce travail à deux spécificités de la protéine que sont sa glycosylation et sa capacité à autoagréger. Nous avons aussi développé un inhibiteur peptidique d'AIDA-I qui, en se fixant à l'adhésine, l'empêche d'interagir avec son récepteur.

AIDA-I fait partie des rares glycoprotéines identifiées à ce jour chez *E. coli*. On sait que l'heptosyltransférase Aah est responsable de la glycosylation de la protéine mais le rôle de la glycosylation et le mécanisme impliqué ne sont pas connus. Les sites de glycosylation de la protéine ont été étudiés par spectrométrie de masse et dégradation d'Edman. Une thréonine et 15 résidus sérines ont ainsi été identifiés, démontrant pour la première fois la O-glycosylation d'AIDA-I. Nous avons aussi montré que la glycosylation influençait l'abondance et la conformation de la protéine. La forme non glycosylée de la protéine est en effet exprimée en plus faible quantité que la forme glycosylée, est plus sensible à la dégradation et est à l'origine d'un stress extracytoplasmique important. L'ensemble de ces résultats suggère donc que la glycosylation a un effet sur la conformation de la protéine et par conséquent de façon indirecte sur l'adhésion aux cellules épithéliales. De plus, la protéine de fusion GST-AIDA-I est capable de se lier *in vitro* à des cellules épithéliales, qu'elle soit glycosylée ou non, ce qui suggère que les sucres ne sont pas impliqués dans l'adhésion.

En ce qui concerne les propriétés agrégatives d'AIDA-I, nous avons tout d'abord montré, par résonance plasmonique de surface et pontage chimique, que l'interaction d'AIDA-I avec elle-même est à l'origine de l'autoagrégation. L'interaction AIDA-I/AIDA-I est de forte affinité ( $K_d$ : 45 nM) et modulable par la force ionique, ce qui suggère l'implication de liaisons électrostatiques. De plus, l'autoagrégation semble nécessiter la formation d'oligomères *in cis* à la surface d'une même bactérie. Ces résultats nous ont

permis d'établir un modèle d'autoagrégation pour AIDA-I, dans lequel des oligomères en *cis* interagissent ensuite en *trans* avec des oligomères des bactéries avoisinantes, à la manière des cadhérines.

Finalement, nous avons développé un inhibiteur peptidique de l'adhésion en criblant des banques de peptides aléatoires présentés à la surface de phages, afin d'identifier des inhibiteurs de la liaison adhésine-ligand. Le criblage de différentes banques a été réalisé, avec pour cible soit la protéine purifiée, immobilisée sur du plastique ou en solution, soit les bactéries présentant AIDA-I à leur surface. Un grand nombre de peptides ont été isolés, présentant deux séquences consensus majeures : AHXHLHNR et TLPXP. Trois peptides ont été caractérisés par ELISA. Parmi eux, le peptide P1 (GKMHAHPHLHNR) est capable d'inhiber l'autoagrégation et d'inhiber l'adhésion *in vitro* avec une IC<sub>50</sub> de 419 µM. Ce peptide représente un bon point de départ pour le développement d'un inhibiteur polyvalent de l'adhésion.

Mots-clefs : Autotransporteur, AIDA-I, *Escherichia coli*, Adhésine bactérienne, Glycosylation, Autoagrégation, Phage Display et Inhibiteur peptidique

## ABSTRACT

The *Escherichia coli* Adhesin Involved in Diffuse Adherence (AIDA-I) is a bacterial adhesin associated with diarrheagenic strains. It is a surface-displayed autotransporter that belongs to the Self-Associating Autotransporter (SAAT) family because of its capacities to autoaggregate and form biofilms, in addition to its adhesive function. In this work, we studied two specificities of AIDA-I : its glycosylation and its autoaggregation properties. Lastly, we developed a peptide preventing AIDA-I from interacting with epithelial cells *in vitro*.

AIDA-I is one of the few glycosylated proteins identified in *Escherichia coli*. Glycosylation is mediated by a specific heptosyltransferase encoded by the *aah* gene but the function of glycosylation and the mechanism involved are not known. We first investigated the region of the adhesin where glycosylation occurs, including the specific sites that are modified, using mass spectrometry and N-terminal sequencing of proteolytic fragments of AIDA-I. One threonine and 15 serine residues were identified as bearing heptoses, thus showing for the first time that AIDA-I is O-glycosylated. We also observed that glycosylation influences the abundance and the conformation of AIDA-I. Unglycosylated AIDA-I is indeed expressed in smaller amounts than its glycosylated counterpart, is more sensitive to degradation and induces an important extracytoplasmic stress. Lastly, we noted that purified mature AIDA-I fused to GST can bind *in vitro* to cells whether or not it is glycosylated. We thus proposed that glycosylation is required to ensure a normal conformation of AIDA-I, thereby influencing bacterial adherence.

We also studied the autoaggregation properties of AIDA-I. By using surface plasmon resonance on purified protein and chemical crosslinking on bacterial cells, we provide evidence that the extracellular domain of AIDA-I promotes autoaggregation by interacting with itself. We also show that the self-association of AIDA-I is of high affinity ( $K_d = 45$  nM) and is disrupted by ionic strength, suggesting the involvement of electrostatic interactions. Lastly, we showed that AIDA-I can form oligomers *in vivo* at the surface of the same bacterial cells. These oligomers appeared to be required for autoaggregation to occur. We therefore propose a model for autoaggregation of AIDA-I where *cis* oligomers of

the protein interact in *trans* with oligomers from neighbouring cells, in a cadherin-like mechanism.

Lastly, we developed a peptide inhibitor of adhesion by screening random peptide libraries displayed on the surface of phages to identify inhibitors of adhesin-ligand interactions. Phage-display was performed on purified protein, either immobilized or in solution, and on whole bacteria expressing AIDA-I. We isolated many peptides presenting two consensus sequences: AHXHLHNR and TLPXP. Three peptides were further characterized by ELISA. Among all the peptides tested, one peptide (P1 = GKMHAHPHLHNR) can specifically prevent adhesion in an *in vitro* model with an  $IC_{50}$  of 419  $\mu$ M. P1 can also inhibit autoaggregation of bacterial cells. This peptide represents a good starting point to develop a polyvalent inhibitor of adhesion.

**Keywords :** Autotransporter, AIDA-I, *Escherichia coli*, Bacterial adhesin, Glycosylation, Autoaggregation, Phage Display and Peptide inhibitor.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>xv</b>
<b>DÉDICACE.....</b>	<b>xviii</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>xix</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>REVUE DE LITTÉRATURE.....</b>	<b>3</b>
<b>1. Les différents pathotypes d'<i>E.coli</i>.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Les adhésines d'<i>E.coli</i> : biogénèse et structure.....</b>	<b>6</b>
2.1. Classification et nomenclature.....	6
2.1.1. Adhésines fimbriales.....	6
2.1.2. Adhésines afimbriales.....	7
2.2. Adhésines sécrétées par le système chaperone/usher.....	8
2.3. Adhésines sécrétées par un système homologue au système T2SS.....	10
2.4. Adhésines sécrétées par la voie extracellulaire de nucléation/précipitation...	11
2.5. Adhésines reliées au système T3SS.....	11
2.5.1. <i>L'intimine</i> .....	11
2.5.2. <i>EspA</i> .....	13
2.6. Adhésines membranaires et flagelles.....	13
2.6.1. <i>Les adhésines membranaires</i> .....	13
2.6.2. <i>Les LPS</i> .....	14
2.6.3. <i>Les flagelles</i> .....	15
2.7. Adhésines sécrétées par le T5SS.....	15
2.7.1. <i>Le système de type V</i> .....	15



2.7.2. <i>Les autotransporteurs ayant une fonction adhésive</i> .....	17
2.7.3. <i>Biogénèse des autotransporteurs</i> .....	17
2.7.4. <i>Structure du domaine passager des autotransporteurs</i> .....	25
2.7.5. <i>L'adhésine impliquée dans l'adhérence diffuse, AIDA-I</i> .....	26
2.7.5.1. Découverte.....	26
2.7.5.2. Prévalence d'AIDA-I chez l'humain et le porc.....	30
2.7.5.3. Glycosylation du domaine passager d'AIDA-I.....	32
2.8. Conclusions.....	34
<b>3. Rôles des adhésines autotransporteurs dans la pathogénèse</b> .....	<b>35</b>
3.1. Rôle global des adhésines dans la pathogénèse.....	35
3.2. Un rôle essentiel : l'adhésion.....	36
3.2.1. <i>Adhésion aux cellules-hôtes</i> .....	36
3.2.2. <i>Adhésion à la matrice extracellulaire</i> .....	38
3.3. L'invasion.....	39
3.4. L'autoaggrégation.....	40
3.5. La formation de biofilm.....	43
3.6. Conclusions.....	44
<b>4. L'inhibition de l'adhésion</b> .....	<b>45</b>
4.1. Concept général.....	45
4.2. Inhibition de l'interaction adhésine-récepteur.....	45
4.2.1. <i>Utilisation d'analogues du récepteur</i> .....	45
4.2.2. <i>Utilisation d'analogues de l'adhésine</i> .....	47
4.2.3. <i>Inhibition de l'interaction protéine/ligand</i> .....	47
4.3. Inhiber l'assemblage des adhésines.....	49

<b>5. Approche et démarche scientifique.....</b>	<b>49</b>
5.1. Étude de la glycosylation d'AIDA-I.....	49
5.2. Étude de l'autoaggrégation médiée par AIDA-I.....	50
5.3. Inhibition d'AIDA-I.....	51
<b>METHODOLOGIE ET RESULTATS.....</b>	<b>52</b>
<b>Article 1 : O-linked glycosylation ensures the normal conformation of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence.....</b>	<b>53</b>
<b>Article 2 : The autotransporter AIDA-I mediates autoaggregation by a cadherin-like mechanism.....</b>	<b>83</b>
<b>Article 3 : Design of peptide inhibitors of the adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I).....</b>	<b>110</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>129</b>
1. Étude de la glycosylation du domaine extracellulaire d'AIDA-I.....	130
2. Étude de l'autoaggrégation d'AIDA-I.....	134
3. Design et test biologique d'un inhibiteur peptidique d'AIDA-I.....	142
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>146</b>

<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>149</b>
---------------------------	------------

<b>ANNEXES.....</b>	<b>i</b>
---------------------	----------

<b>Annexe 1 : Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: structural and functional features.....</b>	<b>ii</b>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

<b>Annexe 2 : Recherche du récepteur d'AIDA-I par la technique de résonance plasmonique de surface couplée à la spectrométrie de masse (SPR-MS).....</b>	<b>xxvi</b>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------

## **LISTE DES TABLEAUX**

### **REVUE DE LITTÉRATURE**

**Tableau I.** Les adhésines autotransporteurs..... 18

**Tableau II.** Exemples d'études montrant la prévalence d'AIDA chez des souches porcines isolées de diarrhée..... 31

### **METHODOLOGIE ET RÉSULTATS**

#### **ARTICLE 1**

**Table 1.** Glycosylation of peptides identified in AIDA-I.....75

### **ANNEXES**

#### **ANNEXE 1**

**Table 1.** Autotransporter adhesins.....xxii

## LISTE DES FIGURES

### REVUE DE LITTÉRATURE

<b>Figure 1.</b> Mode d'adhésion des différents pathotypes d' <i>E.coli</i> causant la diarrhée.....	5
<b>Figure 2.</b> Assemblage des pili P par le système chaperone / usher.....	9
<b>Figure 3.</b> Assemblage des curli par le système de nucléation / précipitation.....	12
<b>Figure 4.</b> Représentation schématique du système de sécrétion de type V.....	16
<b>Figure 5.</b> Organisation et biogénèse des autotransporteurs.....	20
<b>Figure 6.</b> Structure de domaines passagers et translocateurs d'autotransporteurs.....	22
<b>Figure 7.</b> Modèles proposés pour la translocation du domaine passager au travers de la membrane externe.....	24
<b>Figure 8.</b> Organisation de la protéine AIDA et séquence du domaine extracellulaire...	27
<b>Figure 9.</b> Organisation et séquence consensus des autotransporteurs appartenant à la famille des SAAT.....	29

### METHODOLOGIE ET RÉSULTATS

#### ARTICLE 1

<b>Figure 1.</b> Localization of heptose modifications.....	77
<b>Figure 2.</b> Effect of glycosylation on the function of AIDA-I.....	78
<b>Figure 3.</b> Effect of glycosylation on the expression level and on mild heat extraction of AIDA-I.....	79
<b>Figure 4.</b> Effect of glycosylation on the resistance to proteases.....	80
<b>Figure 5.</b> Induction of an extracytoplasmic stress by the nonglycosylated AIDA-I....	81
<b>Figure 6.</b> Binding of unglycosylated mature AIDA-I to cultured epithelial cells.....	82

## ARTICLE 2

<b>Figure 1.</b> Autoaggregation of bacterial cells is conferred by the mature AIDA-I adhesin.....	101
<b>Figure 2.</b> Inhibition of autoaggregation by the wild-type AIDA-I, the I24 protein and the heat-extracted protein (HE).....	102
<b>Figure 3.</b> SPR analysis of AIDA-I/AIDA-I interactions.....	103
<b>Figure 4.</b> Effect of ionic strength on AIDA-I/AIDA-I interaction and autoaggregation..	104
<b>Figure 5.</b> CD analysis of the protein at different ionic strengths.....	105
<b>Figure 6.</b> Cross-linking of AIDA-I at the surface of bacterial cells.....	106
<b>Figure 7.</b> Effect of bacterial extracts on autoaggregation.....	107
<b>Figure 8.</b> Effect of Triton X-100 on autoaggregation.....	108
<b>Figure 9.</b> Model for the autoaggregation of the AIDA-I autotransporter.....	109

## ARTICLE 3

<b>Figure 1.</b> Selection of bacteriophages binding on AIDA-I by panning a 12-mer peptide library .....	125
<b>Figure 2.</b> Sequences of peptides isolated from screening the 12 mer phage library.....	126
<b>Figure 3.</b> Affinity and specificity of the selected phages and peptides.....	127
<b>Figure 4.</b> Inhibitory activities of the selected peptides.....	128

## DISCUSSION

<b>Figure 10.</b> Modèles possibles d'interaction des cadhérines eucaryotes .....	136
<b>Figure 11.</b> Organisation de l'ectodomaine des cadhérines.....	139
<b>Figure 12.</b> Structure de deux dimères en <i>trans</i> de cadhérines .....	141

**ANNEXES****ANNEXE 1**

<b>Figure 1.</b> Organization and biogenesis of autotransporters.....	xxii
<b>Figure 2.</b> Structural features of conventional autotransporters.....	xxiv
<b>Figure 3.</b> Structural features of trimeric autotransporters.....	xxv

**ANNEXE 2**

<b>Figure 13.</b> SPR analysis of AIDA-I/serum interaction.....	xxxiii
<b>Figure 14.</b> Effect of heat-treatment and filtration on AIDA-I/serum interaction .....	xxxiv
<b>Figure 15.</b> SPR-MS microrecovery.....	xxxv

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

AAF	Aggregative Adhesion Fimbriae
Aah	Adhesin Aida heptosyltransferase
aas	Acides aminés
Afa	Afimbrial Adhesins
Ag43	Antigen 43
AIDA	Adhesine Involved in Diffuse Adherence / Adhésine impliquée dans l'adhérence diffuse
BFP	Bundle-forming Pili
BS <sup>3</sup>	Bis[sulfosuccinimidyl]suberate
BSA	Bovine Serum Albumin
Cah	Calcium-binding Ag43 homologue
CD	Circular Dichroism
CF	Colonization Factor
CFU	Colony Forming Units
CID	Collision-Induced-Dissociation
Col	Collagène
CS	Coli Surface Antigen
DAEC	Diffusely Adhering <i>E.coli</i>
DAF	Decay Accelerating Factor
DM	Domaine membranaire
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DP	Domaine passager
DPS	Diarrhée Post-Sevrage
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	Enteropathogenic <i>E.coli</i>
EAST1	Enteropathogenic <i>E.coli</i> Heat-Stable Toxin 1
ED	Edman Degradation
EHEC	Enterohemorrhagic <i>E.coli</i>
Eib	<i>E.coli</i> Immunoglobulin-binding
EIEC	Enteroinvasive <i>E.coli</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPEC	Enteropathogenic <i>E.coli</i>
Esp	<i>E.coli</i> Secreted Proteins
ETEC	Enterotoxigenic <i>E.coli</i>
ExPEC	Extra-intestinal Pathogenic <i>E.coli</i>
FHA	Filamentous Hemagglutinin
FN	Fibronectine
GST	Glutathione-S-Transferase
Hap	<i>Haemophilus</i> Adhesin and Penetration protein
HBP	Hemoglobin Binding Protease
Hek	Haemagglutinin from <i>E. coli</i> K1
Hia	<i>Haemophilus influenzae</i> adhesin



HisG	Six Histidine and Glycine Tag
HRP	Horseradish-Peroxidase
HS	Heparan Sulfate
IC	Inhibitory Concentration
Ig	Immunoglobuline
Iha	IrgA homologue adhesin
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
Ipa	Invasin Plasmid Antigen
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -d- Thiogalactopyranoside
J	Jonction
kb	kilobases
L	Laminine
LB	Luria-Bertani
LEE	Locus of Enterocyte Effacement
Liaisons A/E	Liaisons Attachantes-Effaçantes
LP	Long Polar
LT	Heat-Labile Toxin
MBP	Maltose-Binding Protein
MD	Maladie des Oedèmes
MEC	Matrice extracellulaire
MS	Mass Spectrometry
Omp	Outer membrane protein
PBS	Phosphate-buffered-saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
P <sub>rn</sub>	Pertactin
PRR	Proline Rich Regions
PVC	Chlorure de polyvinyle
RGD	Arginine-Glycine-Asparagine
<i>S.mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
Saa	STEC autoagglutinating adhesin
SAAT	Self-Associating Autotransporters
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Ser	Sérine
SPR	Surface Plasmon Resonance
SRP	Signal Recognition Particle
SS	Séquence signal
ST	Heat-Stable Toxin
STEC	Shiga-toxin <i>E.coli</i>
STM	Signature-Tagged-Mutagenesis
Stx	Shiga-like toxin
T2SS	Type 2 Secretion System/ Système de sécrétion de type 2
T3SS	Type III Secretion System/ Système de sécrétion de type 3
T5SS	Type 5 Secretion System/ Système de sécrétion de type 5
TBS	Tris-buffered Saline
Tcp	Toxin-coregulated pilus
Thr	Thréonine

Tia	Toxigenic Invasion Loci A
Tib	Toxigenic Invasion Loci B
Tir	Translocated Intimin Receptor
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TPS	Two-Partner Secretion System/Système de secretion à deux partenaires
UPEC	Uropathogenic <i>E.coli</i>
VacA	Vacuolating Cytotoxin
VN	Vitronectine
Yad	<i>Yersinia enterocolitica</i> Adhesin

**A ma grand-mère Nicole Girard  
qui m'a transmis le goût de l'étude et du savoir  
et qui m'a révélé l'importance du travail**

# Remerciements

Je tiens à exprimer ma gratitude envers le Dr Michael Mourez, mon directeur de recherche, pour m'avoir confié ce travail et lui suis gré des nombreux conseils qu'il a bien voulu me prodiguer dans son élaboration. J'ai surtout apprécié son enthousiasme jamais pris en défaut et l'équilibre qu'il sait maintenir entre ses connaissances scientifiques et ses profondes qualités humaines. J'espère que la suite de mon parcours professionnel fera honneur à la qualité de l'enseignement qu'il m'a prodigué et nous permettra de continuer notre collaboration intellectuelle.

Je remercie vivement tous mes collaborateurs et notamment le Dr François Lépine, le Dr Mark Hancock et le Dr Ravi Kane pour leur participation active à ce projet. Ils ont en grande partie contribué à la réussite de mon doctorat et je les en remercie.

Merci à mon président de jury, Dr Marcelo Gottschalk, d'avoir accepté de juger mon travail. Merci au Dr Daniel Dubreuil et au Dr Charles Dozois d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de m'avoir apporté leur précieuse expertise lors des mes comités conseils.

Je tiens à remercier chaleureusement tous les étudiants du laboratoire. Merci notamment à Marie-Ève Charbonneau et aux stagiaires Manuel Campos et Marie Viprey pour leur collaboration.

Merci à l'assistant de recherche du laboratoire, Frédéric Berthiaume, pour son aide technique et scientifique de qualité, sa bonne humeur et sa constante disponibilité.

Merci à Kavi Ramjeet pour son amitié fidèle qui m'a été d'un grand soutien.

Merci à Marie-Astrid Albert pour la touche wallonne apportée à ce projet, à Élodie Destable pour sa bonne humeur contagieuse et à Marycruz Dominguez pour ses encouragements chaleureux.

Je tiens aussi à remercier mes parents. Mon projet n'aurait pas été aussi accompli sans leurs encouragements et leur soutien inconditionnel. Merci de m'avoir donné le goût du savoir et d'avoir toujours veillé à ce que les meilleures conditions soient réunies pour ma réussite.

Merci à Clémence et Alexandre Lentenois pour nos nombreux échanges outre-Atlantique et à François et Valérie Girard pour leurs visites fréquentes au Québec. Merci à Charlotte pour ses gazouillis encourageants.

Merci à ma grand-mère Laure Cabaud pour son soutien.

# **INTRODUCTION**

L'adhésion est une étape essentielle dans l'établissement du processus infectieux. Il est reconnu qu'une bactérie, pour s'établir dans l'organisme, doit d'abord adhérer aux cellules de l'hôte ou à la matrice extracellulaire, afin de pouvoir résister aux différents mécanismes susceptibles de l'éliminer, comme le flux urinaire ou le péristaltisme intestinal. L'adhésion des bactéries aux cellules eucaryotes est un phénomène qui n'est pas énergétiquement favorable puisque la surface de la bactérie et celle des cellules sont toutes deux chargées négativement. L'adhésion nécessite donc des interactions spécifiques entre des molécules microbiennes à la surface de la bactérie et des récepteurs à la surface des cellules de l'hôte. Les molécules microbiennes responsables de ces interactions sont désignées sous le terme d'adhésines. Pour qu'une molécule exprimée à la surface d'une bactérie puisse être considérée comme une adhésine, elle doit répondre à certains critères (198) : (i) la molécule purifiée doit pouvoir se lier aux cellules de l'hôte de manière spécifique et saturable, (ii) les constantes d'affinité de l'interaction doivent être plausibles d'un point de vue biologique, (iii) le récepteur de l'adhésine doit être identifié, (iv) l'inhibition de l'interaction adhésine-récepteur doit interférer avec la liaison de la bactérie aux cellules hôtes, (v) la délétion de l'adhésine doit bloquer en partie la colonisation et la maladie dans un modèle animal d'infection. Dans le cas d'*Escherichia coli* comme pour d'autres bactéries, de nombreuses molécules de surface sont désignées sous le terme d'adhésines, même lorsqu'elles ne répondent pas à l'ensemble de ces critères. Les adhésines bactériennes sont divisées arbitrairement en deux groupes (291) : les adhésines fimbriales ou pili et les adhésines afimbriales. Les adhésines fimbriales forment des structures filamenteuses ressemblant à des cheveux tandis que les adhésines afimbriales sont des protéines de surface monomériques ou oligomériques non filamenteuses. Parmi les adhésines afimbriales figurent les adhésines appartenant à la famille des autotransporteurs. Cette famille comprend plus de 800 membres qui occupent des fonctions diverses telles que adhésion, protéolyse ou résistance au sérum (111). L'objet de cette thèse est l'étude et l'inhibition d'un autotransporteur, l'adhésine impliquée dans l'adhérence diffuse (AIDA-I).

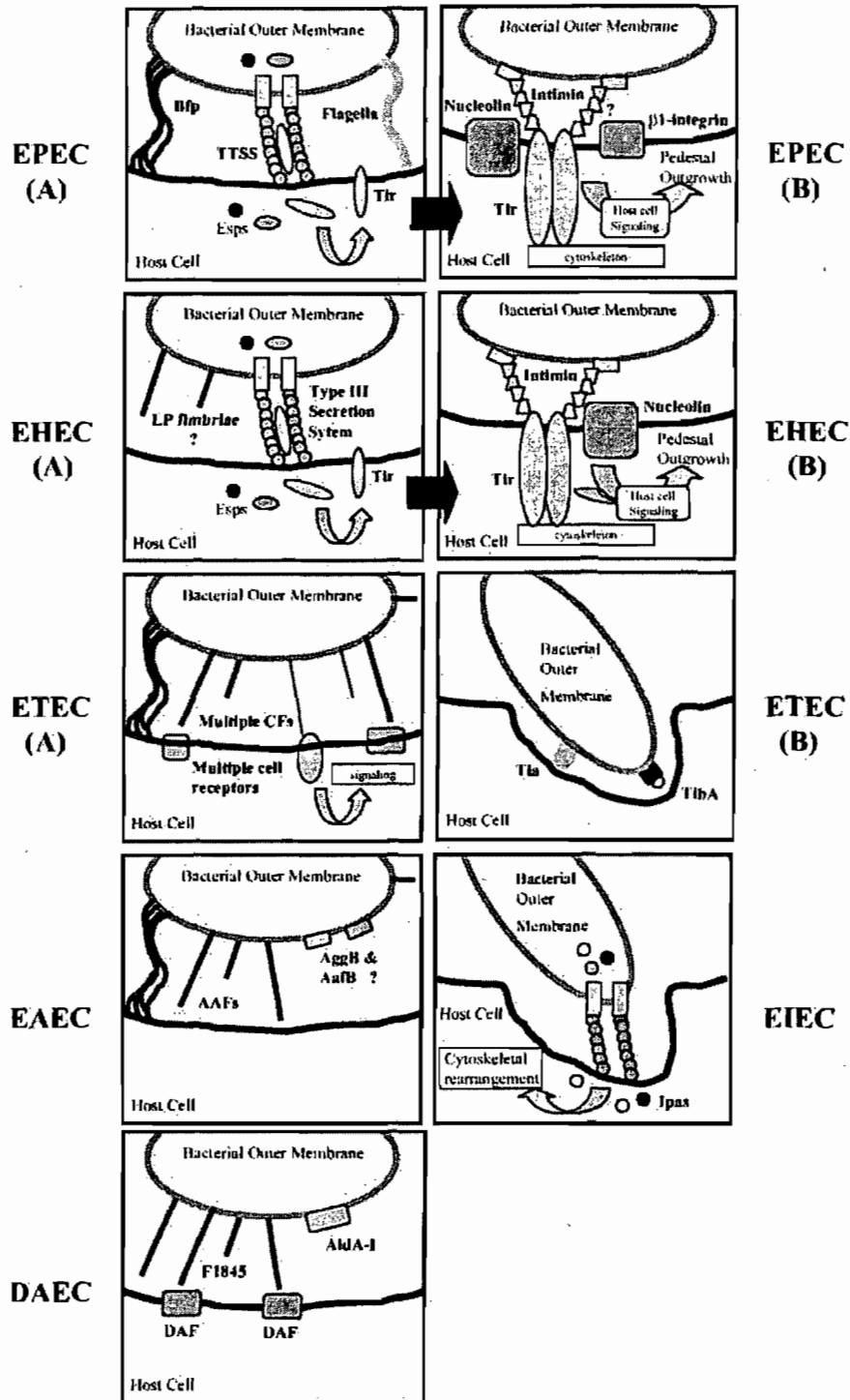
# REVUE DE LITTÉRATURE

## 1. Les différents pathotypes d'*Escherichia coli*

Les *E. coli* pathogènes se distinguent de la flore commensale par l'expression d'adhésines, d'invasines, de toxines, de sidérophores et d'autres molécules de surface ou sécrétées susceptibles d'aider la bactérie à envahir l'hôte. L'existence de ces nombreux facteurs de virulence permet de classer les souches d'*E. coli* selon différents pathotypes. On distingue à ce jour six pathotypes majeurs causant des infections intestinales (Figure 1) (192, 237) et les souches extra-intestinales (ExPEC) (270, 318, 320) :

- les *E. coli* entéropathogènes ou EPEC qui sont caractérisées par la formation de lésions attachantes-effaçantes. Elles possèdent de nombreuses adhésines permettant une adhérence locale, comme les bundle-forming pili (BFP) et l'intimine. Elles possèdent aussi un système de sécrétion de type III (T3SS) leur permettant d'injecter des effecteurs appelés Esp (*E. coli* Secreted Protein) à l'intérieur de la cellule.
- les *E. coli* entérohémorragiques ou EHEC qui sont caractérisées par la présence de toxines Stx et d'hémolysines. Elles sont capables également de former des lésions attachantes-effaçantes grâce à leur T3SS. Elles possèdent de plus de nombreuses adhésines afimbriales et fimbriales, comme le Long Polar (LP) fimbriae.
- les *E. coli* entérotoxigènes ou ETEC qui possèdent de nombreux facteurs de colonisation appelés CF pour Colonisation Factor ainsi que les toxines LT (Heat-Labile Toxin) et ST (Heat-Stable Toxin). Elles possèdent de plus des adhésines/invasines comme Tia (Toxigenic Invasion Locus A) et TibA (Toxigenic Invasion Locus B) leur permettant d'envahir les cellules épithéliales.
- les *E. coli* entéroinvasives ou EIEC qui sont capables d'envahir les cellules épithéliales grâce à un plasmide codant pour un grand nombre de protéines appelées Ipa (Invasin plasmid antigen). Le complexe formé par les Ipa se lie aux intégrines pour pénétrer les cellules-hôtes.
- les *E. coli* entéroagréгатives ou EAEC qui se distinguent des autres pathotypes par l'absence de toxines LT ou ST et la capacité à adhérer selon un phénotype particulier dit adhérence agrégative. Elles possèdent de nombreuses adhésines fimbriales désignées AAF (Aggregative Adhesion Fimbriae).





**Figure 1 :** Mode d'adhésion des différents pathotypes d'*E. coli* causant la diarrhée. Les six pathotypes représentés ici sont tous capables d'adhérer aux cellules de l'hôte par l'intermédiaire d'adhésines propres à chaque pathotype. Dans le cas des EPEC, des ETEC et des EHEC, l'adhésion initiale (A) et l'adhésion ultérieure (B) sont figurées. Adapté de la référence (192).

- les *E. coli* médiant l'adhérence diffuse ou DAEC qui sont caractérisées par un phénotype d'adhérence diffuse sur toute la surface des cellules. Elles possèdent de très nombreuses adhésines regroupées au sein de la famille des Afa/Dr. Cette famille comprend des adhésines afimbriales dites Afa (Afimbrial Adhesins) et des adhésines fimbriales comme F1845. Les deux types d'adhésines ont pour récepteur l'antigène de surface Dr présent sur le DAF (Decay Accelerating Factor). La distinction entre afimbriale et fimbriale est tenue au sein de cette famille et de nombreuses adhésines Afa sont en fait fimbriales. Les DAEC possèdent aussi l'adhésine AIDA-I (Adhesin Involved In Diffuse Adherence), qui est l'objet de cette thèse.

-les *E. coli* responsables d'infections extra-intestinales ou ExPEC qui regroupent notamment les *E. coli* causant des méningites et les *E. coli* uropathogènes ou UPEC. Les UPEC possèdent deux fimbriae importants, les fimbriae de type 1 et les pili P.

Ces différents pathotypes, bien que présentant une grande variété de facteurs de virulence, ont en commun le fait de posséder de nombreuses adhésines leur permettant de s'attacher à des surfaces biotiques telles que les cellules de l'hôte (Figure 1). Les adhésines constituent donc un facteur de virulence essentiel du processus infectieux.

## **2. Les adhésines d'*E. coli* : biogénèse et structure**

Les adhésines d'*E. coli* sont très nombreuses et les citer toutes serait fastidieux. Le lecteur est invité à se référer aux nombreuses revues traitant de ce sujet pour une vue exhaustive (156, 251, 274, 276, 296, 299). Nous allons ici décrire brièvement les différentes adhésines d'*E. coli* avant de détailler les adhésines appartenant à la famille des autotransporteurs dont AIDA-I fait partie.

### **2.1 Classification et nomenclature**

#### **2.1.1 Adhésines fimbriales**

Les adhésines fimbriales se définissent comme des structures protéiques filamenteuses ancrées à la membrane bactérienne, se distinguant des flagelles par leur

diamètre plus fin (2 à 8 nm contre 20 nm pour les flagelles) et leur absence de motilité. Elles sont désignées sous le terme de fimbriae ou pili. La nomenclature des fimbriae est très complexe et plusieurs classifications coexistent (291). Une première classification datant de 1967 distingue sept types de fimbriae en fonction de leur capacité à médier l'hémagglutination (66). Il ne reste de cette classification que le terme fimbriae de type I qui désigne les fimbriae médiant une hémagglutination sensible au mannose. Une autre classification, basée sur l'hémagglutination d'érythrocytes humains, distingue les pili de type P qui agglutinent les érythrocytes portant l'antigène de surface P (126) des fimbriae Dr qui agglutinent les érythrocytes portant les antigènes Dr (199). Une autre classification de 1975 propose de distinguer six groupes de fimbriae selon leur morphologie (210). De cette classification reste le terme fimbriae de type IV pour désigner des fimbriae polaires capables de se rétracter. A cela s'ajoutent plusieurs classifications sérologiques, dont celle d'Orskov (208), qui distinguent les fimbriae F1 à F17, ou celle désignant les fimbriae sous le nom de CS (Coli Surface Antigen) ou CF (Colonization factor) (291). Il existe aussi une autre classification, décrite récemment, de type phylogénétique (200). Il est donc difficile de se retrouver dans cette nomenclature compliquée et souvent arbitraire.

A cette complexité de nomenclature, s'ajoute une complexité de structure. Sont en effet regroupées sous le terme de fimbriae des protéines très diverses assemblées par des systèmes complexes. Ainsi peut-on retrouver au sein de cette famille aussi bien des curli, qui sont de minces fibres agrégatives amyloïdes assemblées à la surface de la bactérie (17) que des pili de type IV, qui sont assemblés au niveau de la membrane interne et extrudés ensuite à travers la membrane externe (54). Il semble donc plus judicieux de les regrouper selon leur mode d'assemblage, comme nous le verrons dans les paragraphes qui suivent.

### ***2.1.2 Les adhésines afimbriales***

Les adhésines afimbriales se définissent comme des structures non filamenteuses, formées le plus souvent d'une seule protéine monomérique ou oligomérique. Ces adhésines sont sécrétées de diverses manières à la surface de la bactérie (91, 194) et contrairement aux fimbriae, sont classées selon leurs systèmes de sécrétion. Dans la majorité des cas, les adhésines restent liées à la membrane bactérienne mais certaines d'entre elles existent aussi

sous forme sécrétée. De nombreuses adhésines d'*E. coli*, dont AIDA-I, sont sécrétées par le système de sécrétion de type V et plus particulièrement par le système d'autotransporteur. Il s'agit donc d'un mode de sécrétion important pour les adhésines bactériennes.

## 2.2 Adhésines sécrétées par le système chaperone/usher

Ce système de sécrétion permet l'assemblage d'adhésines fimbriales. Il est constitué, comme son nom l'indique, d'une chaperone périplasmique et d'une protéine de membrane externe dite « usher » (36). Les adhésines les plus connues sécrétées par ce système sont les fimbriae de type 1 et les pili de type P des UPEC ainsi que les adhésines AAF des EAEC et les adhésines Afa/Dr des DAEC (226). De nombreux facteurs de colonisation des ETEC sont également sécrétés par ce système (Figure 1) (251).

Les pili sécrétés par la voie chaperone/usher sont le plus souvent des fibres composites formées d'un filament principal rigide de forme hélicoïdale surmonté d'un filament linéaire ou fibrille dont l'extrémité constitue l'adhésine (Figure 2). Prenons l'exemple des pili P. Le filament principal est composé de nombreuses répétitions de la protéine PapA, qui est la sous-unité majeure (244). La fibrille est constituée des sous-unités PapF et PapE et de l'adhésine PapG à l'extrémité du fimbriae. PapK constitue l'adaptateur permettant la connexion entre le filament principal et la fibrille. La biogénèse des pili P est médiée par la chaperone périplasmique PapD et la protéine de membrane externe PapC (usher). PapD se lie aux sous-unités du fimbriae dans le périplasme afin d'empêcher leur agrégation et catalyser leur repliement. Elle permet aussi de les guider vers la protéine usher PapC, qui constitue la plateforme d'assemblage. Les sous-unités se dissocient de la chaperone et sont alors ajoutés au pilus en formation, l'adhésine PapG étant incorporée en premier, suivi des sous-unités de la fibrille puis du filament rigide (244) (Figure 2). Les pili de type 1 sont synthétisés de la même façon (36). La sous-unité principale est la protéine FimA et l'adhésine située à l'extrémité du pilus est FimH. Il existe aussi un autre système de sécrétion dit système chaperone-usher alternatif, qui est à l'origine de la sécrétion de facteurs de colonisation des ETEC comme les fimbriae CS1 (291).

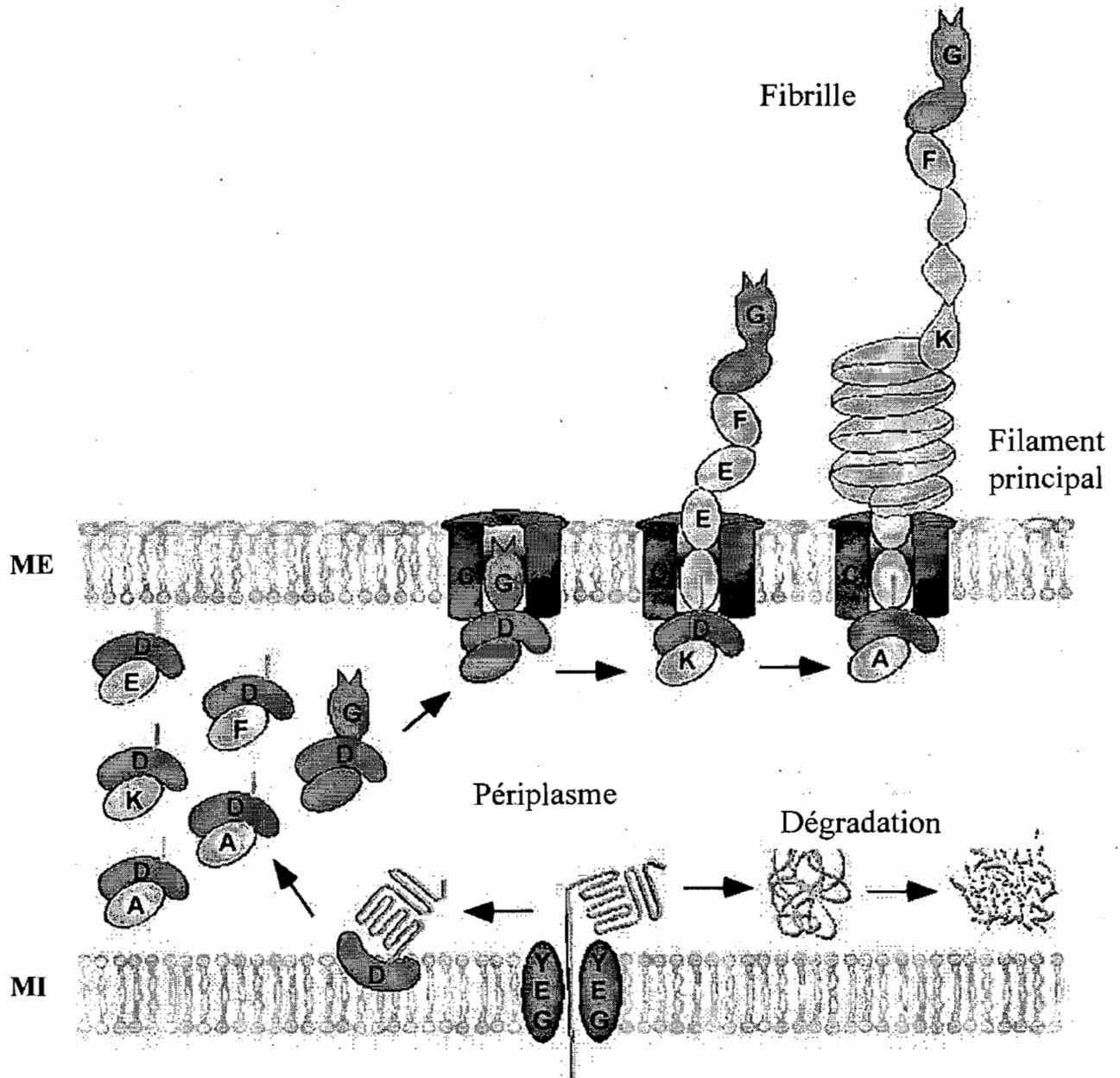


Figure 2 : Assemblage des pili P par le système chaperone/usher. Après passage de la membrane interne par le système *sec*, chaque sous-unité est prise en charge par la chaperone PapD et guidée vers la protéine usher PapC qui forme un pore dans la membrane externe. Les sous-unités sont alors incorporées au fur et à mesure de la formation du pilus, l'adhésine PapG étant incorporée en premier. Adapté de la référence (244).

Des variations existent quant à la morphologie des pili sécrétés par le système chaperone/usher mais ils présentent tous une similarité de structure. Pour les fimbriae de type 1 et les pili P, le filament principal est un assemblage hélicoïdal de sous-unités de piline formant un bâtonnet rigide de 60 à 70 Å de large à l'extrémité duquel on trouve une fibrille de 20 à 30 Å de large avec à son bout, l'adhésine (194). De plus, la structure des adhésines FimH (47) et PapG (280) révèle que les domaines servant à la liaison au récepteur ont une architecture commune en forme de tonneau  $\beta$  dit « jellyroll ». Cependant, les sites de liaison au récepteur à l'intérieur de ces domaines diffèrent, conférant ainsi à chacune de ces adhésines une spécificité différente envers les sucres.

### 2.3 Adhésines sécrétées par un système homologue au système T2SS

Les adhésines sécrétées par un système de sécrétion homologue au système de sécrétion de type II (T2SS) chez *E. coli* sont désignées sous le nom de pili de type IV. Des exemples de pili de type IV sont les pili longus des ETEC (96) et les BFP présents chez les EPEC (Figure 1) (198). Ces pili ont la capacité de se rétracter et sont à l'origine d'un phénomène de motilité appelé « twitching motility » (34, 54).

La biogénèse des pili de type IV a été bien étudiée dans le cas des BFP, pour lesquels 14 gènes regroupés au sein d'un opéron sont nécessaires à la formation du pilus (234). Ces gènes sont désignés *bfpA* à *bfpL*, *bfpP* et *bfpU*. Le filament en lui-même est un homopolymère de BfpA, appelé ici bundline. On peut distinguer trois phases dans la biogénèse : le processing de la bundline, la formation du pilus et son extrusion. Les deux dernières étapes sont dépendantes de deux complexes protéiques, le complexe de membrane interne composé de BfpC, BfpD, BfpE et BfpF (55) et le complexe de membrane externe composé de la sécrétine BfpB et des protéines BfpG et BfpU (59). La sécrétion des pili de type IV par ce système d'assemblage permet leur rétraction, à l'origine du phénomène de « twitching motility ».

La structure des pilines de type IV de différents organismes a été résolue et notamment celle de la bundline (233). La bundline est composée d'une hélice  $\alpha$  en N-terminal et d'un domaine globulaire en C-terminal constitué d'un mélange d'hélices  $\alpha$  et de brins  $\beta$ . Le modèle d'assemblage du BFP propose que les sous-unités de bundline

s'assemblent en triple hélice, les hélices  $\alpha$  N-terminal formant le cœur hydrophobe du filament (233).

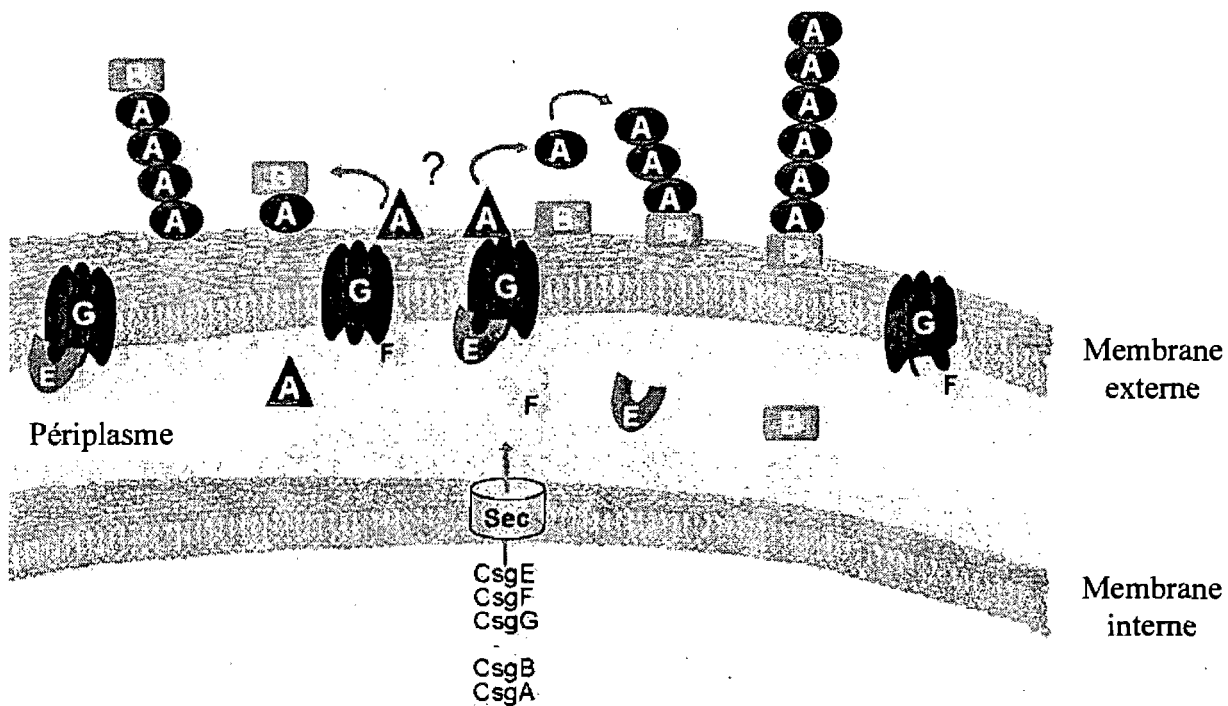
## **2.4 Adhésines sécrétées par la voie extracellulaire de nucléation/précipitation**

Les adhésines sécrétées par le système de nucléation/précipitation sont les curli. Ce sont des fibres amyloïdes présentes chez *E. coli*, notamment chez les EHEC (135). Ces fibres de 6 à 12 nm de largeur sont caractérisées par une structure particulière, formée de brins  $\beta$  assemblés perpendiculairement à l'axe de la fibre. Les curli forment une matrice extracellulaire fibreuse dépassant de 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  de la surface bactérienne (40). Ces structures, bien que formant des filaments, sont très différentes de pili de type 1 et des pili de type IV. Leur mode d'assemblage est aussi particulier, les fibres étant formées à la surface de la bactérie, comme le montre la figure 3 (17). Ce mode de sécrétion est appelé le système extracellulaire de nucléation/précipitation. Six protéines codées par les opérons *csgBA* et *csgDEFG* participent à la formation des curli. L'opéron *csgBA* code pour la sous-unité majeure des curli, CsgA ou curline, et la protéine nucléatrice CsgB. CsgB est nécessaire à la polymérisation de CsgA en surface. L'opéron *csgDEFG* code pour quatre protéines nécessaires à l'assemblage des curli (238). La formation des curli a lieu par ajout de sous-unités de curline à l'extrémité distale de chaque fibre en croissance.

## **2.5 Adhésines reliées au système de sécrétion de type III (T3SS)**

### **2.5.1. L'intimine**

Les EPEC et les EHEC ont la particularité de former des liaisons attachantes/effaçantes (A/E) se manifestant par l'effacement des microvillosités intestinales, l'attachement intime de la bactérie aux cellules hôtes et la formation de structures particulières en forme de piédestal entourant la bactérie (86). L'attachement intime de la bactérie aux cellules est médiée principalement par l'intimine (198). Les gènes nécessaires à l'apparition de lésions A/E sont codés par un îlot de pathogénicité appelé LEE (Locus of Enterocyte Effacement). Le LEE code pour un système de sécrétion de type III



**Figure 3.** Assemblage des curli par le système de nucléation/précipitation. Toutes les protéines traversent la membrane interne par l'intermédiaire du système Sec. CsgG forme un pore dans la membrane externe permettant la sécrétion des deux sous-unités CsgA et CsgB. CsgA est sécrétée à la surface et assemblée en fibre par la protéine nucléatrice CsgB. CsgE and CsgF interagissent avec CsgG et sont nécessaires au bon assemblage des curli. Adapté de la référence (17).



et plusieurs autres protéines dont l'intimine et son récepteur Tir (Translocated Intimin Receptor) (88). L'intimine est une adhésine membranaire et n'est pas sécrétée par le T3SS. Son extrémité N-terminale est enchâssée dans la membrane externe de la bactérie tandis que son extrémité C-terminale extracellulaire est impliquée dans la reconnaissance du récepteur. Les deux segments de la protéine sont liés par une charnière flexible faite de trois domaines appartenant à la superfamille des immunoglobulines (167). Le récepteur de l'intimine, Tir, fut longtemps considéré comme une protéine de l'hôte. Il s'agit en réalité d'une protéine codée par le LEE qui est transloquée par le T3SS puis insérée dans la membrane de l'hôte. L'intimine se lie alors à son récepteur Tir et le domaine charnière flexible de l'intimine permet un attachement très intime de la bactérie à l'hôte (10 nm de distance) (88).

### **2.5.2. *EspA***

Une autre protéine ayant une importance dans la formation des lésions A/E est la protéine EspA. Son rôle en tant qu'adhésine est encore controversé (88, 198). EspA, sécrétée par le T3SS, est une protéine particulière aux EPEC, qui forme un appendice filamentueux constituant le pont entre l'extrémité de l'aiguille et la membrane de la cellule hôte (60). EspB et EspD sont deux autres protéines sécrétées par le T3SS qui forment un pore dans la membrane plasmique (260). EspA pourrait fonctionner comme une adhésine, soit en se liant au complexe EspB-EspD soit en se liant directement à la cellule hôte (103, 198).

## **2.6. Adhésines membranaires et flagelles**

### **2.6.1 *Les adhésines membranaires***

Il existe plusieurs adhésines membranaires. On peut citer par exemple la porine OmpA, qui est une protéine de membrane externe composée d'un tonneau  $\beta$  et de plusieurs boucles extracellulaires (219). OmpA possède plusieurs fonctions (271). La protéine purifiée peut se lier aux cellules endothéliales microvasculaires du cerveau et permettre

ainsi aux *E. coli* responsables de méningite de traverser la barrière hémato-encéphalique (264). Les EHEC O157:H7 semblent aussi utiliser OmpA pour adhérer aux cellules épithéliales Hela et Caco-2 (297). OmpA est insérée dans la membrane externe par le système de biogénèse des protéines de la membrane externe, qui a fait l'objet d'une revue récente (30). La protéine Hek (Haemagglutinin from *E. coli* K1) présente chez les *E. coli* causant des méningites, est un autre exemple d'adhésine membranaire (76). Cette protéine permet l'adhésion et l'invasion de cellules épithéliales ainsi que l'autoagrégation. La protéine de membrane externe Tia des ETEC médie aussi l'adhésion et l'invasion de cellules épithéliales gastrointestinales (84). Les EHEC possèdent également plusieurs protéines de membrane externe qui contribuent à l'adhésion comme la protéine Saa (STEC autoagglutinating adhesin) (218) ou la protéine Iha (IrgA homologue adhesin) (289).

### 2.6.2 Les LPS

Le rôle des LPS en tant qu'adhésines d'*E. coli* reste controversé. L'utilisation d'anticorps dirigés contre les antigènes O des LPS O111 et O157 diminue l'adhérence des EHEC à des cellules en culture. Cependant, la préincubation de cellules avec des LPS n'inhibent pas l'adhésion des EHEC, suggérant que les LPS ne sont pas des adhésines en tant que telles (276). De plus, des mutants O157:H7 déficients pour la synthèse de l'antigène O sont hyperadhérents. Ceci pourrait être du à une modification globale de l'hydrophobicité de la membrane ou à une adhésion par des protéines qui étaient auparavant masquées par les LPS (90). Une autre hypothèse serait l'implication du core du LPS dans l'adhésion, comme il a été montré pour *Actinobacillus pleuropneumoniae* (214). Les LPS semblent aussi nécessaires pour la colonisation du tractus intestinal (174). Les LPS jouent donc un rôle dans l'adhésion soit directement en tant qu'adhésines soit indirectement par leur implication dans la stabilité membranaire, l'hydrophobicité et le repliement des protéines de membrane externe. Leur biosynthèse est complexe et a fait l'objet de plusieurs revues (63, 300).

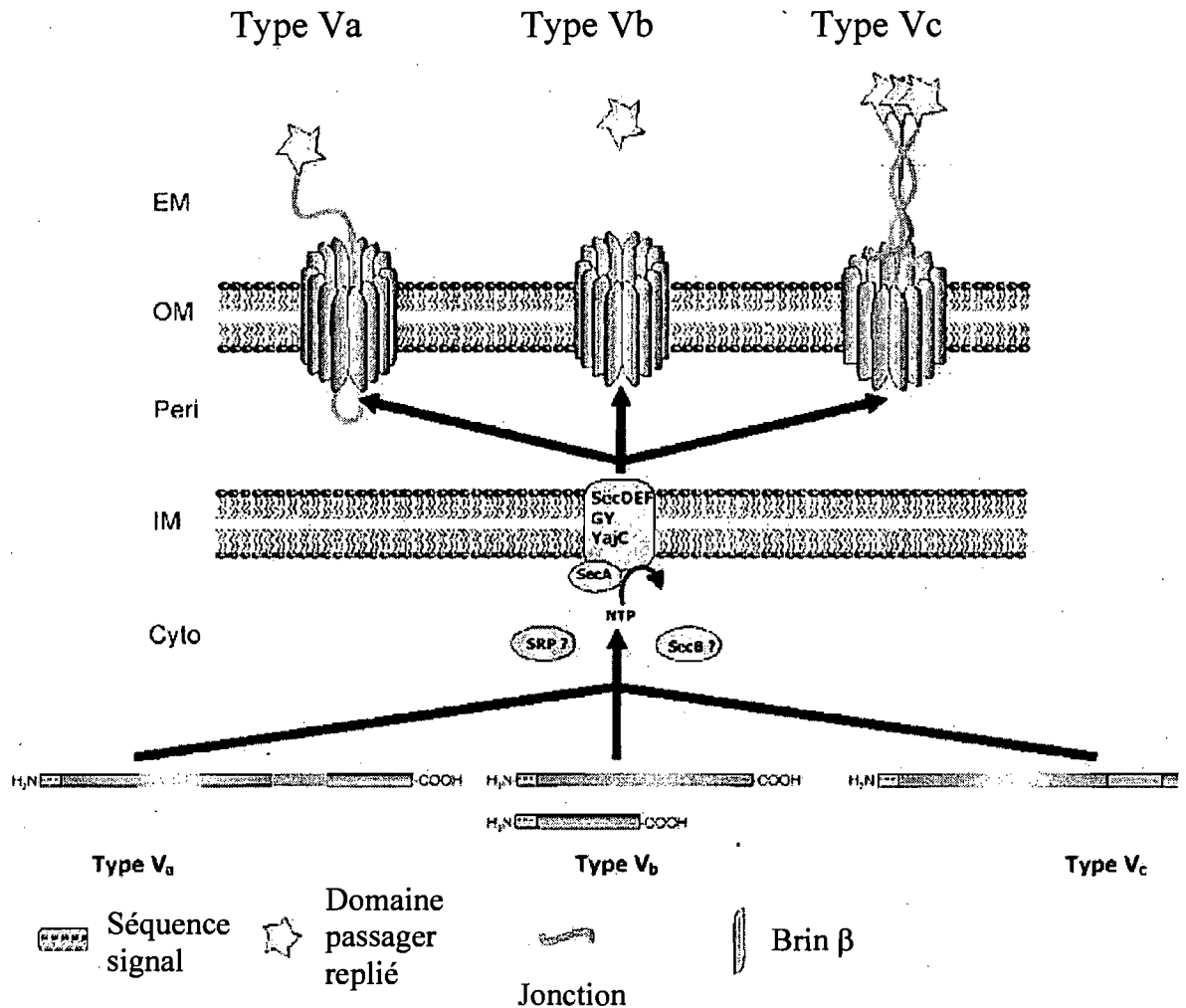
### **2.6.3 Les flagelles**

Le rôle principal des flagelles est la motilité. On les considère cependant depuis peu comme des adhésines (95). Des souches EPEC mutées pour le gène structural du flagelle *fliC* sont en effet moins adhérentes à des cellules épithéliales en culture. Des flagelles purifiés sont aussi capables d'adhérer aux cellules, suggérant que les flagelles eux-mêmes ont des propriétés adhésives. De plus, la propriété d'adhésion des flagelles est indépendante de leur motilité (95). Les flagelles sont sécrétés par un système de sécrétion de type 3 qui diffère de celui des EPEC et qui a fait l'objet de plusieurs revues (8, 168).

## **2.7. Adhésines sécrétées par le système de sécrétion de type V (T5SS)**

### **2.7.1. Le système de type V**

Le système de sécrétion de type V comprend le système des autotransporteurs (système de sécrétion Va), le système à deux partenaires ou TPS (Two-Partner Secretion System, système de sécrétion Vb) et le système des autotransporteurs trimériques, parfois désigné Vc (110). La caractéristique commune à ces trois systèmes est le fait que les protéines sécrétées sont transloquées à travers la membrane externe par l'intermédiaire d'un pore transmembranaire formé par un tonneau  $\beta$  (111) (Figure 4). Le système à deux partenaires, comme son nom l'indique, est composé de deux protéines séparées, la protéine TpsA étant la protéine sécrétée et la protéine TpsB étant le domaine translocateur (Figure 4). Le système des autotransporteurs, quant à lui, contient ces deux domaines au sein d'une même protéine. Dans le cas des autotransporteurs conventionnels (Va), ces deux domaines sont monomériques. Dans le cas des autotransporteurs trimériques (Vc), le tonneau  $\beta$  est un homotrimère formé de 12 brins  $\beta$ , chaque monomère fournissant 4 brins au tonneau. Le domaine sécrété est lui aussi homotrimérique. La traversée de la membrane externe se fait dans les trois cas par le système *Sec* (110, 111).



**Figure 4.** Représentation schématique du système de sécrétion de type V. Les trois systèmes utilisent le système Sec pour le passage de la membrane interne et un tonneau  $\beta$  pour le passage de la membrane externe. Les systèmes Va et Vc représentent le système des autotransporteurs pour lequel le domaine passager et le domaine translocateur sont situés sur la même protéine. Dans le cas du système Vc, ces deux domaines sont des homotrimères. Le système Vb est le système à deux partenaires pour lequel le domaine passager et le domaine translocateur sont situés sur deux protéines différentes. Adapté de la référence (111).

Nous ne détaillerons pas le système TPS car à ce jour, seules deux adhésines sécrétées par ce système sont connues chez *E. coli*, à savoir les protéines OtpA et EtpA (46, 85). De nombreuses adhésines sont cependant sécrétées par cette voie chez d'autres organismes comme *Bordetella pertussis* ou *Haemophilus influenzae* (121).

### **2.7.2 Les autotransporteurs ayant une fonction adhésive**

Les autotransporteurs sont une famille de protéines comptant plus de 800 membres occupant des fonctions diverses telles que protéolyse, cytotoxicité, résistance au sérum, adhésion et invasion (111, 212). Les autotransporteurs ayant une fonction adhésive sont récapitulés dans le tableau 1 et ont fait l'objet d'une revue récente par notre laboratoire, disponible en annexe 1 (94). On dénombre chez *E. coli* quatorze adhésines autotransporteurs et cinq d'entre elles peuvent être regroupées au sein de la famille des SAAT (Self-Associating Autotransporters) sur la base de leur similarité de séquence et de leur propriétés agrégatives ((136) et J-P. Côté et M. Mourez, résultats non publiés). Les cinq membres de cette famille sont AIDA-I, l'antigène 43 (Ag43), l'adhésine/invasine TibA, la protéine cah (calcium-binding ag43 homologue) et la protéine YpjA. Il est intéressant de noter que d'une part, les adhésines autotransporteurs occupent souvent de nombreuses fonctions et que d'autre part, leurs substrats sont souvent non identifiés (Tableau 1).

### **2.7.3 Biogénèse des autotransporteurs**

Un autotransporteur conventionnel comprend quatre domaines : une séquence signal N-terminale (SS), un domaine passager, un domaine de jonction et un domaine membranaire (94) (Figure 5). Le domaine passager correspond à la protéine fonctionnelle qui est transloquée à la surface. Le domaine de jonction, appelée aussi autochaperone, est important pour le repliement et la translocation du domaine extracellulaire (206). Le domaine membranaire est constitué de deux régions : le domaine N-terminal qui est une hélice  $\alpha$  et le domaine C-terminal qui est un tonneau  $\beta$  formé de 12 brins  $\beta$  (207). Les autotransporteurs trimériques, comme la protéine Hia (*Haemophilus influenzae* adhesin), ne

Tableau I : les adhésines autotransporteurs

Organisme	Adhésine <sup>a</sup>	Type <sup>b</sup>	Autres fonctions	Substrats <sup>c</sup>	Ref.
<i>Actinobacillus</i>	EmaA	T		Col	(182)
<i>actinomycetecomitans</i>	Omp100	T	Resistance au serum, Invasion		(12)
	Aae	C			(80)
<i>Bartonella henselae</i>	BadA	T	Resistance à la phagocytose	Col, FN, L	(236)
<i>Bartonella quintana</i>	Vomps	T	Autoaggregation	Col	(323)
<i>Bordetella pertussis</i>	Perctactin	C			(161)
	TcfA	C			(82)
	BrkA	C	Resistance au serum, Invasion		(79)
<i>Campylobacter jejuni</i>	CapA	C	Invasion		(13)
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Pmp21/PmpD	C			(312)
<i>Escherichia coli</i>	<b>AIDA-I</b>	C	autoprotease, autoaggregation, Biofilm		(21)
	<b>Ag43</b>	C	autoprotease, autoaggregation, Biofilm		(134)
	<b>TibA</b>	C	autoaggregation, Biofilm, Invasion		(165)
	<b>Cah</b>	C	Biofilm		(298)
	<b>YpjA</b>	C	Biofilm		(240)
	<b>YfaL</b>	C	Biofilm		(240)
	<b>YcgV</b>	C	Biofilm		(240)
	<b>Tsh/Hbp</b>	C	Hemoglobin protease		(143)
	<b>EheA</b>	C	Biofilm		(313)
	<b>EibA/C/D/E</b>	T		Ig	(243)
	<b>RpeA</b>	C			(163)
	<b>UpaG</b>	T	Autoaggregation, biofilm		(307)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<b>DrsA</b>	T			(49)
<i>Haemophilus influenzae</i>	<b>Hap</b>	C	Protease, Autoaggregation, Invasion	FN, L, Col	(81)
	<b>Hia</b>	T			(149)
	<b>Hsf</b>	T			(275)
<i>Helicobacter pylori</i>	<b>BabA</b>	C		LewisB Ag	(119)
	<b>SabA</b>	C		S-LewisX Ag	(169)
	<b>AlpA</b>	C			(202)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	<b>UspA1</b>	T	Resistance au serum	FN	(2)
	<b>UspA2</b>	T	Resistance au serum	VN	(178)
	<b>UspA2h</b>	T			(152)
	<b>Hag</b>	T	Autoaggregation		(220)
	<b>McaP</b>	C	Esterase, Phospholipase		(293)
<i>Neisseria meningitidis</i>	<b>NadA</b>	T	Invasion		(50)
	<b>App</b>	C	Protease		(253)
	<b>Nhha</b>	T		L, HS	(246)
	<b>MspA</b>	C			(303)
<i>Rickettsiales</i>	<b>rOmpA</b>	C			(6)
	<b>rOmpB</b>	C	Invasion		(304)
<i>Salmonella enterica</i>	<b>ShdA</b>	C		Col, FN	(129)
	<b>MisL</b>	C	Invasion	Col, FN	(65)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<b>YadA</b>	T	Resistance serum/phagocytose Autoaggregation, Invasion	Col, L	(239)

<sup>a</sup> : seules les protéines dont la fonction adhésive a été confirmée sont indiquées. Les autotransporteurs en gras appartiennent à la famille des SAAT. <sup>b</sup> : C : autotransporteur conventionnel, T : autotransporteur trimérique.

<sup>c</sup> : Col : collagène. FN : Fibronectine. L : Laminine. VN : Vitronectine. HS : Heparan sulfate. Ig : Immunoglobuline.

possèdent pas de domaine de jonction autochaperone et contiennent une unité de translocation plus courte ne comprenant que 4 brins  $\beta$  (52, 281). Ces autotransporteurs forment des homotrimères avec un domaine translocateur de 12 brins  $\beta$ , chaque monomère fournissant 4 brins au tonneau et trois hélices  $\alpha$  (Figure 5) (180, 281). La résolution de la structure de l'unité de translocation de quelques autotransporteurs (16, 180, 207) montre que l'hélice  $\alpha$  se retrouve à l'intérieur du pore formé par le tonneau  $\beta$  (Figure 6). Dans le cas des autotransporteurs trimériques, trois hélices  $\alpha$  se retrouvent à l'intérieur du pore. Des études sur le premier autotransporteur identifié, l'IgA protéase, ont montré que la délétion du tonneau  $\beta$  inhibait la translocation (228). De cette observation est né le modèle de translocation où le tonneau  $\beta$  forme un pore dans la membrane externe, au travers duquel le domaine passager est sécrété. Selon ce modèle, la protéine contient tous les éléments nécessaires à sa translocation, d'où le nom d'autotransporteur. La sécrétion des autotransporteurs peut se décrire simplement de la façon suivante (Figure 5) : la séquence signal guide la protéine vers le système *sec* et initie la translocation à travers la membrane interne. Le domaine C-terminal s'insère dans la membrane externe et le domaine passager est alors transloqué vers le milieu extracellulaire où il peut subir plusieurs modifications. Cependant, d'autres études ont mis en doute ce modèle, et aujourd'hui encore, le mécanisme exact de translocation est le sujet de débats houleux. De plus, de nombreux autres aspects de la biogénèse des autotransporteurs restent encore mal connus (61). Nous allons détailler ici toutes les étapes de la sécrétion des autotransporteurs conventionnels auquel appartient AIDA-I, en insistant sur les points restant à éclaircir.

### **Passage de la membrane interne et du périplasme**

Les autotransporteurs sont transloqués à travers la membrane interne par le système *Sec* (Figure 5) (265). La majorité des autotransporteurs contiennent des séquences signal de 20 à 30 acides aminés qui sont typiques des protéines sécrétées par le système *Sec*. Cependant, 10% des autotransporteurs identifiés à ce jour, dont notamment Ag43, TibA et AIDA-I, possèdent des séquences signal anormalement longues (environ 50 acides aminés). Ces séquences sont caractérisées par une extension N-terminale de 25 acides aminés contenant une séquence conservée (61).

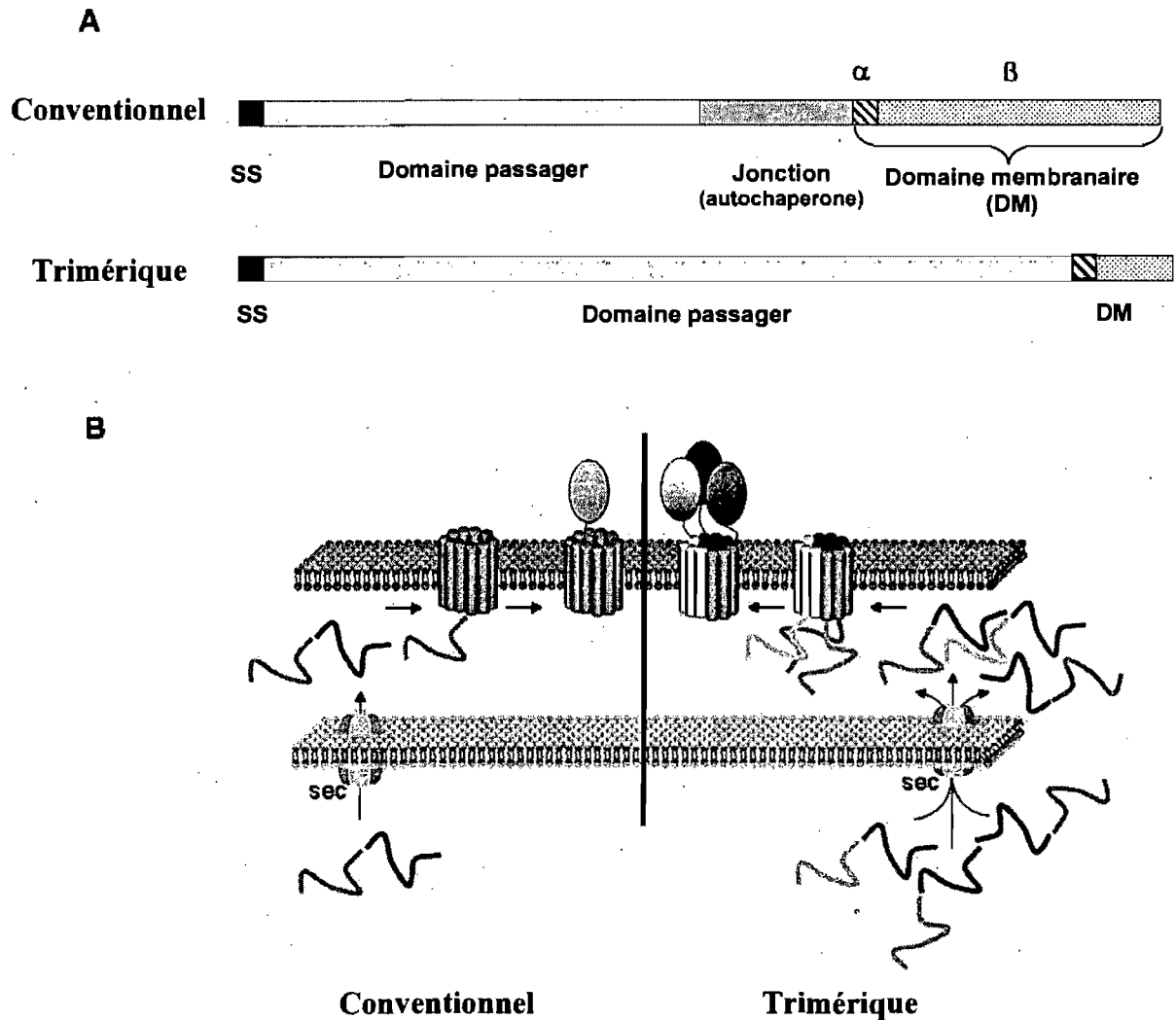


Figure 5 : Organisation et biogénèse des autotransporteurs. (A) Un autotransporteur conventionnel comprend quatre domaines : la séquence signal SS, le domaine passager, la région de jonction autochaperone et le domaine membranaire (DM). Le domaine membranaire comprend l'hélice  $\alpha$  et le tonneau  $\beta$ . Un autotransporteur trimérique ne possède pas de région autochaperone et son unité de translocation est plus courte. (B) La biogénèse des autotransporteurs trimériques et conventionnels se déroule en 4 étapes : translocation à travers la membrane interne, transport périplasmique et insertion du tonneau  $\beta$ , translocation à travers la membrane externe et finalement maturation de l'autotransporteur, généralement par clivage et association non-covalente avec la membrane externe. Adapté de la référence (94).



Cette extension, d'abord considérée comme nécessaire à une translocation cotraductionnelle, pourrait servir en fait à assurer une translocation post-traductionnelle en inhibant la liaison de la SRP (Signal Recognition Particle) (62). Un autre rôle important de cette séquence signal longue pourrait être le maintien du domaine passager dans une conformation compatible avec la translocation. En effet, une étude sur l'autotransporteur EspP (284) propose un modèle dans lequel la cinétique de dissociation entre le peptide signal et le complexe *Sec* serait relativement lente, ce qui aurait pour conséquence d'ancrer transitoirement le domaine passager dans la membrane interne, l'empêchant ainsi de se replier.

Il apparaît nécessaire que le domaine passager reste dans une conformation compatible avec la translocation. Cependant, un certain degré de repliement du domaine passager dans le périplasma semble toléré. En effet, de nombreuses études montrent que des domaines passagers repliés ou avec un pont disulfure sont transloqués efficacement (32, 269, 310). Cependant, des études réalisées par notre laboratoire (241) et d'autres équipes (124, 125, 133) montrent que l'état de repliement affecte la translocation. La question de l'état de repliement du domaine passager n'est donc aujourd'hui pas complètement élucidée.

### **Passage de la membrane externe**

Bien que le premier autotransporteur fût décrit il y a 20 ans (228), le mécanisme par lequel le domaine passager traverse la membrane externe reste en suspens. La résolution de la structure des domaines translocateurs de NalP (207), EspP (16) et Hia (180) supporte l'idée originelle selon laquelle le tonneau  $\beta$  formerait un pore au travers duquel le domaine passager serait sécrété (Figure 6). Il existe à ce jour quatre modèles possibles de translocation (27, 61) récapitulés sur la figure 7 :

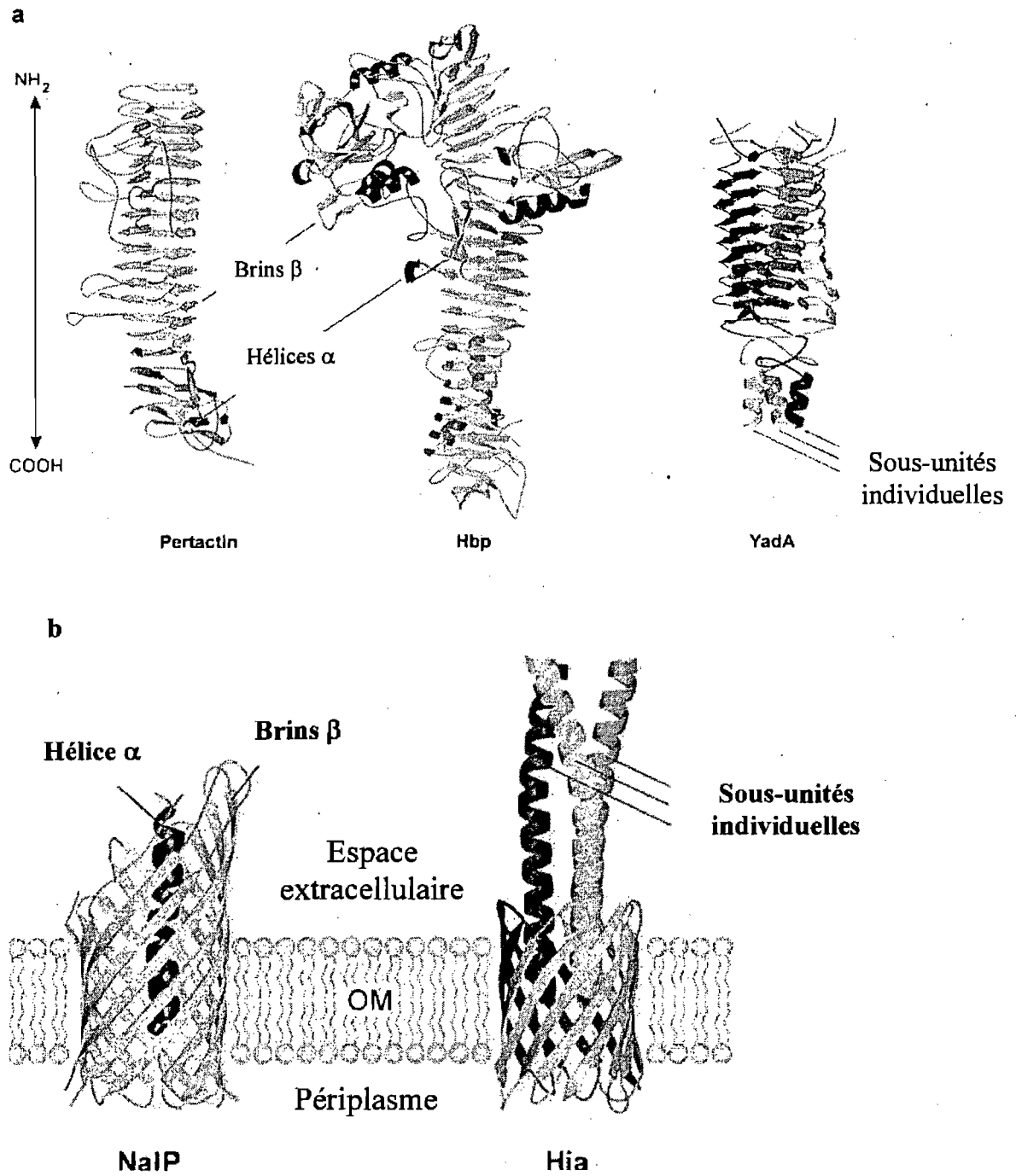
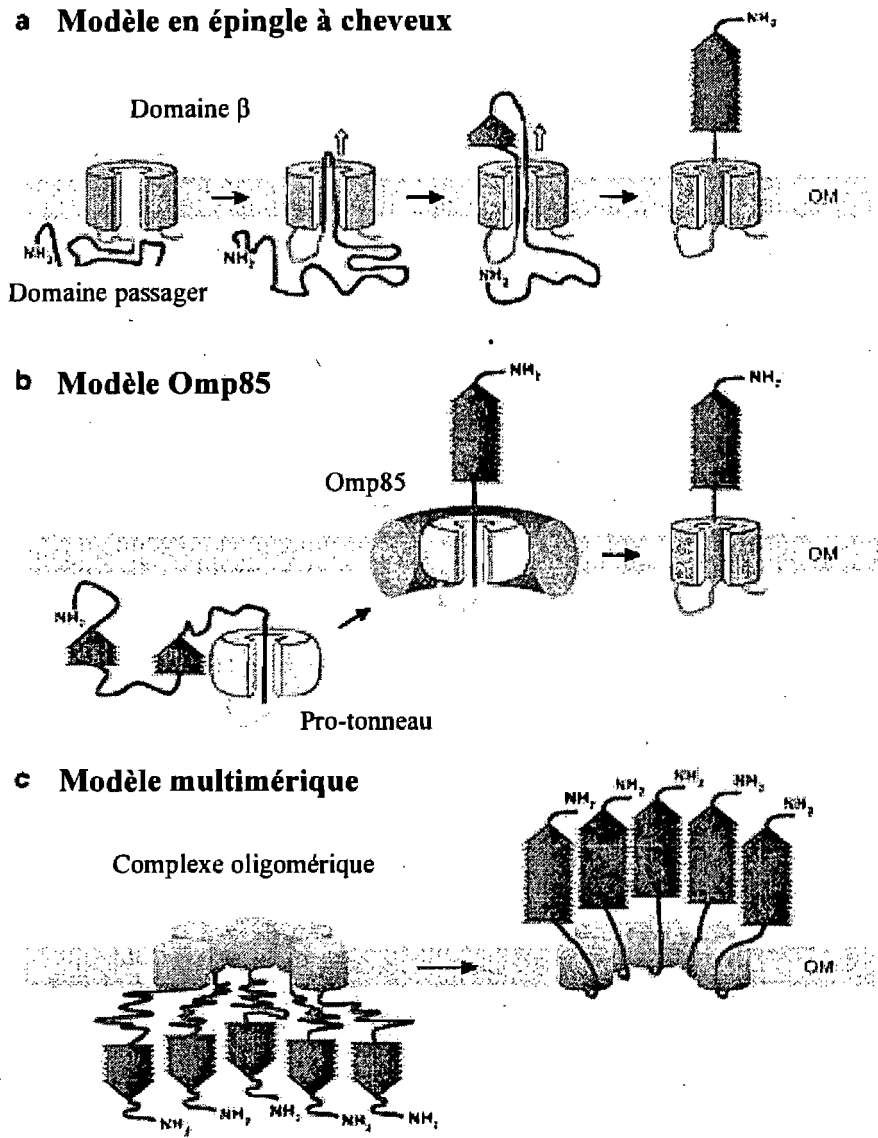


Figure 6: Structures des domaines passagers et translocateurs de quelques autotransporteurs. (a) Les domaines passagers des autotransporteurs conventionnels Pertactin et Hbp et un fragment du domaine passager de l'autotransporteur trimérique YadA sont représentés. (b) Les unités de translocation de l'autotransporteur NaIP et de l'autotransporteur trimérique Hia sont représentés enchassés dans la membrane bactérienne. NaIP possède une hélice  $\alpha$  à l'intérieur du pore et Hia en possède 3. Figure adaptée de la référence (61).

- Le « threading model » propose que le domaine passager soit guidé au travers du pore depuis son extrémité N-terminale. Cela suppose que le domaine N-terminal des autotransporteurs soit guidé vers le pore pour initier la translocation. Cependant, le fait que des domaines passagers tronqués en N-terminal ou des protéines chimères soient efficacement transloqués remet sérieusement en cause ce modèle qui n'est plus en vogue actuellement.
- Le modèle en épingle à cheveux ou « hairpin model » (Figure 7a) propose que la translocation soit initiée par la formation d'une épingle à cheveux en C-terminal du domaine passager. La translocation se poursuivrait alors par passage de segments du domaine passager sous une forme linéaire à l'intérieur du pore. Le problème de ce modèle est son incompatibilité avec l'existence d'un certain état de repliement du domaine passager que nous avons évoqué plus haut. En effet, si on prend l'exemple du pore formé par NalP, ses dimensions permettent la sécrétion de deux segments polypeptidiques uniquement sous une forme totalement dépliée.
- Un autre modèle en vogue actuellement propose l'intervention d'un translocateur externe, la protéine Omp85, connue pour son rôle dans l'insertion des protéines de membrane externe (Figure 7b). Deux variantes du modèle existent. La première se base sur la présence de l'hélice  $\alpha$  à l'intérieur du tonneau  $\beta$ . L'extrémité C-terminale du domaine passager s'enchâsserait dans le tonneau  $\beta$  partiellement replié dans le périplasme. Omp85 permettrait alors l'insertion du pro-tonneau  $\beta$  dans la membrane externe et conséquemment, la sécrétion du domaine passager. Une étude récente corrobore cette hypothèse en montrant l'existence de cet intermédiaire périplasmique (118).
- Il existe aussi un modèle multimérique basé sur une étude avec l'IgA protéase, qui propose que les tonneaux  $\beta$  s'oligomérisent et forment une cavité centrale permettant le transport de domaines passagers partiellement repliés (Figure 7c). Cependant, la majorité des autotransporteurs, dont AIDA-I, ne forment pas d'oligomères dans la membrane. Il pourrait s'agir d'un modèle s'appliquant uniquement à une sous-famille d'autotransporteurs.



**Figure 7.** Modèles proposés pour la translocation du domaine passager au travers de la membrane externe. Le modèle en épingle à cheveux (a) propose que le C-terminus du domaine passager forme une épingle à cheveux dans le tonneau  $\beta$ . Le domaine passager non replié est ensuite transloqué à l'intérieur du pore en commençant par l'extrémité C-terminale. Dans le modèle Omp85 (b), le domaine passager se replie partiellement dans le périplasm. Le transport du domaine passager et l'insertion du tonneau  $\beta$  sont ensuite catalysés par Omp85. Le modèle multimérique (c) postule que le domaine passager se replie partiellement dans le périplasm et est ensuite transloqué à la surface par l'intermédiaire d'un large pore résultant de l'oligomérisation des tonneaux  $\beta$ . Figure adaptée de la référence (61).

### **Clivage à la membrane externe**

Certains autotransporteurs, comme AIDA-I et Ag43, peuvent être clivés à la suite de leur translocation et rester liés de manière non-covalente à la membrane externe (42). D'autres, comme TibA, ne subissent pas cette modification (165). Le site de clivage varie selon les autotransporteurs mais se situe généralement au sein de la région de jonction. Les mécanismes de clivage sont encore mal connus. Cependant, plusieurs études récentes montrent qu'il existe à ce jour quatre mécanismes de clivage (61). Les autotransporteurs peuvent être clivés par :

- une protéase de la membrane externe
- un autre autotransporteur à activité sérine protéase
- une réaction intermoléculaire autoprotéolytique entre deux mêmes autotransporteurs à activité sérine protéase
- une réaction intramoléculaire autocatalytique indépendante d'une activité protéolytique du domaine passager.

En ce qui concerne AIDA-I et Ag43, le mécanisme de clivage n'est pas clair. Il pourrait s'agir d'une réaction intramoléculaire autocatalytique (42).

#### ***2.7.4 Structure du domaine passager des autotransporteurs***

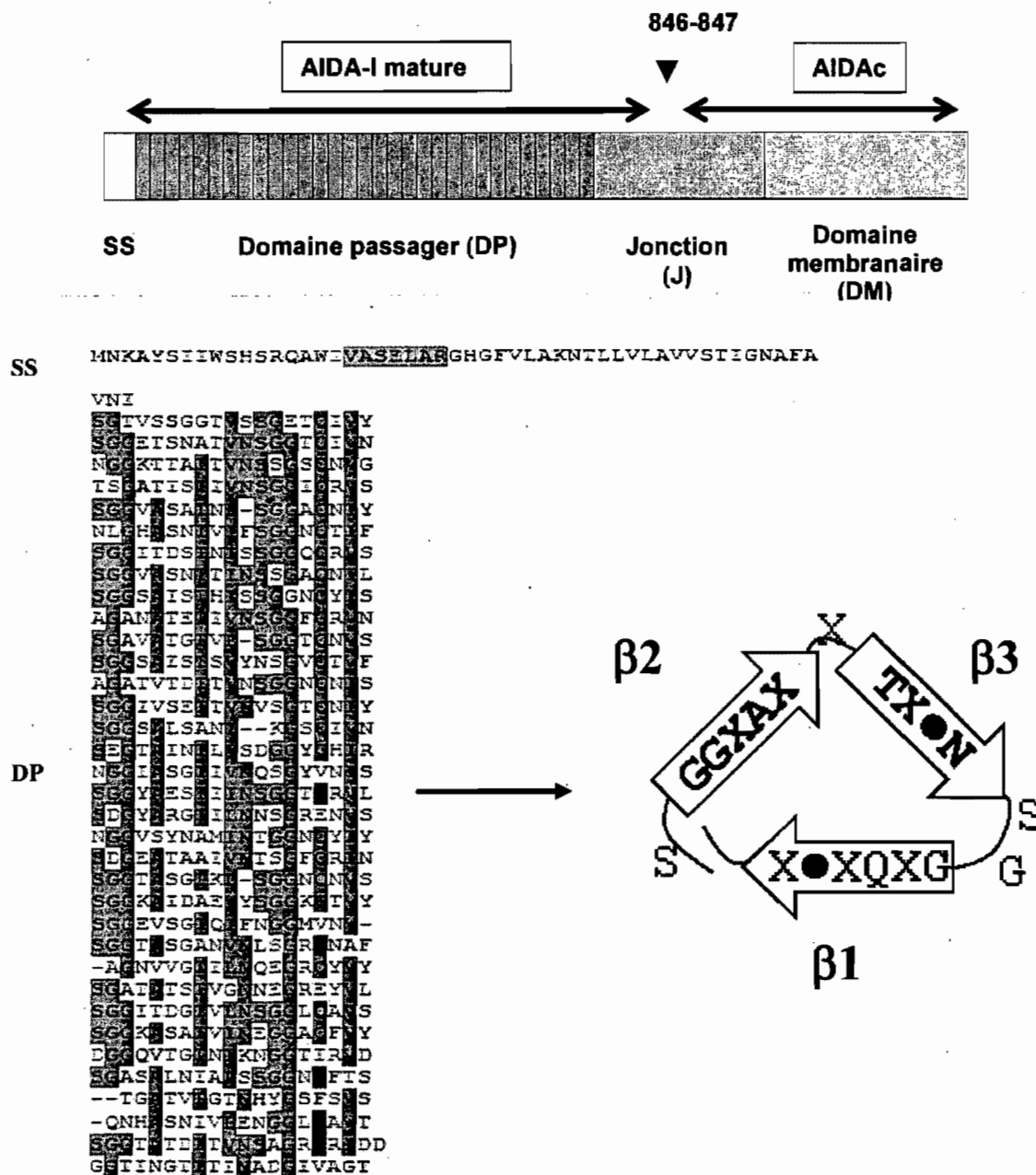
La résolution de la structure des domaines passagers de l'hémoglobine binding protéase Hbp (209), de l'adhésine pertactine (74) et de la toxine VacA (Vacuolating cytotoxin) (89) montre qu'il s'agit d'une hélice  $\beta$  orientée vers la droite, constituant ainsi une structure relativement allongée (Figure 6). Le pas de l'hélice est formé par trois brins  $\beta$ , de sorte que l'hélice est constituée de trois feuillets  $\beta$  parallèles. Les brins  $\beta$  sont connectés par des boucles, certaines se détachant de l'hélice centrale. Cette structure en hélice  $\beta$  se retrouve chez les autotransporteurs trimériques (201, 321) et chez les TPS (48). De plus, l'analyse en dichroïsme circulaire de domaines passagers d'autotransporteurs dont la structure n'a pas été résolue montre un taux important de brins  $\beta$  (134). Cette structure similaire pour les autotransporteurs et les TPS pourrait

résulter de contraintes au niveau du système de sécrétion (61). Il pourrait aussi s'agir d'une structure favorisant d'une part l'éloignement de la surface bactérienne favorable à l'adhésion et d'autre part la multifonctionnalité des autotransporteurs, l'hélice  $\beta$  servant de colonne vertébrale sur lequel se greffent des boucles ou des domaines médiant les fonctions de la protéine. Par exemple, les motifs RGD (Arg-Gly-Asp) et PRR (Proline-Rich-Regions), que l'on pense impliqués dans l'adhésion aux cellules-hôtes, se retrouvent dans une boucle dans le cas de la pertactine (74). La structure répétitive est aussi un avantage pour les adhésines car cela leur permet d'avoir de multiples sites de liaison au récepteur et de s'engager ainsi dans une interaction polyvalente.

### ***2.7.5 L'adhésine impliquée dans l'adhérence diffuse, AIDA-I***

#### **2.7.5.1 Découverte**

AIDA-I fut découverte en 1989 par le groupe de M. Alexander Schmidt à partir de la souche 2787 (O126 : H7) isolée d'un cas de diarrhée infantile humaine et présentant un phénotype d'adhérence diffuse (22). Les auteurs de cette première étude transformèrent des *E. coli* C600 avec des fragments d'ADN plasmidique provenant de la souche 2787 et examinèrent la capacité des transformants à adhérer de manière diffuse. Ils définirent ainsi la région responsable du phénotype d'adhérence diffuse comme un fragment de 6 kb provenant du plus grand des deux plasmides de la souche et baptisèrent la protéine membranaire codée par ce fragment AIDA-I pour « Adhesin Involved in Diffuse Adherence ». D'autres études confirmèrent par la suite qu'AIDA-I est responsable du phénotype d'adhérence diffuse (23, 26) : (i) La protéine est localisée à la surface de la bactérie, (ii) elle se lie spécifiquement aux cellules HeLa et (iii) des anticorps dirigés contre la protéine inhibent l'adhésion. De plus, l'obtention de la séquence nucléotidique d'AIDA-I montra que le fragment de 6 kb codait en réalité pour deux protéines de 45 kDa (OrfA) et de 132 kDa (OrfB), qui furent identifiées comme étant la glycosyltransférase Aah (adhesin aida heptosyltransferase) (25) et le précurseur d'AIDA-I (21, 24).



**Figure 8.** Organisation de la protéine AIDA-I et séquence du domaine passager extracellulaire. (a) AIDA est composée d'une séquence signal SS, d'un domaine passager (DP), d'un domaine de jonction (J) et d'un domaine membranaire (DM). La protéine AIDA-I mature est constituée du DP et d'une partie de la région J, en amont du site de clivage. AIDAc correspond à l'autre partie de la région J et au DM. AIDA-I est clivée entre les aas 846 et 847 et reste liée de manière non covalente à AIDAc. (b) Détail de la séquence du domaine extracellulaire d'AIDA présentant 35 répétitions d'une séquence imparfaite de 19 aas. Une répétition constitue selon le modèle un tour de l'hélice  $\beta$  ou X correspond à n'importe quel résidu et le rond noir correspond aux aas isoleucine, valine ou leucine. Figure adaptée de la référence (43).

L'étude détaillée de OrfB révéla la présence d'une séquence signal de 49 acides aminés, d'un domaine N-terminal correspondant à la protéine mature et d'un domaine C-terminal présentant une similarité de séquence avec celui de VirG, un membre de la famille des autotransporteurs (Figure 8). La preuve définitive de l'appartenance d'AIDA-I à la famille des autotransporteurs fut apportée par l'étude du groupe de Schmidt qui montra que la partie C-terminale d'AIDA était un tonneau  $\beta$  membranaire (279).

On retrouve au sein de la protéine les différents domaines d'un autotransporteur conventionnel, à savoir la séquence signal, le domaine passager extracellulaire, le domaine de jonction et le domaine membranaire (Figure 8). Le site de clivage délimite les deux segments de la protéine : le domaine passager et une partie du domaine de jonction, en amont du site de clivage, sont désignés AIDA-I et constitue la protéine mature. L'autre partie du domaine de jonction et le domaine membranaire sont désignés AIDAc (142). Le site de clivage se trouve dans la région de jonction, entre les aas 846 et 847. Le domaine passager possède 35 répétitions d'une séquence imparfaite de 19 aas. Chaque séquence répétée pourrait constituer un tour de l'hélice  $\beta$  (Figure 8). La biogénèse d'AIDA-I est comparable à celles des autotransporteurs conventionnels (Figure 5). AIDA-I est clivée à la surface de la bactérie et reste liée de manière non-covalente à AIDAc. Un bref traitement à la chaleur (60 °C, 20 minutes) permet de relarguer AIDA-I dans le surnageant (21). La structure d'AIDA-I n'est pas résolue. Le modèle proposé est celui d'une hélice  $\beta$  comparable aux autres autotransporteurs.

Aah, la glycosyltransférase codée par OrfA, fut caractérisée en 2001 par le groupe de Schmidt (25). Aah est responsable de la glycosylation d'AIDA-I par 19 résidus heptoses et cette modification est nécessaire à l'adhésion. De nombreuses questions restent en suspens concernant la glycosylation et seront abordées dans le paragraphe 2.7.5.3.

Le récepteur d'AIDA-I est inconnu. Une étude de 2003 propose qu'une glycoprotéine membranaire de 119 kDa soit le récepteur d'AIDA-I aux cellules (150) tandis qu'une étude plus récente montre que deux protéines du mucus de porc se lie à AIDA-I avec une grande affinité (78). Récemment, d'autres fonctions furent attribuées à AIDA-I en plus de l'adhésion (262) et AIDA-I fut classée dans la famille des SAAT (136). Cette famille compte pour l'instant trois membres « officiels », que sont AIDA-I,



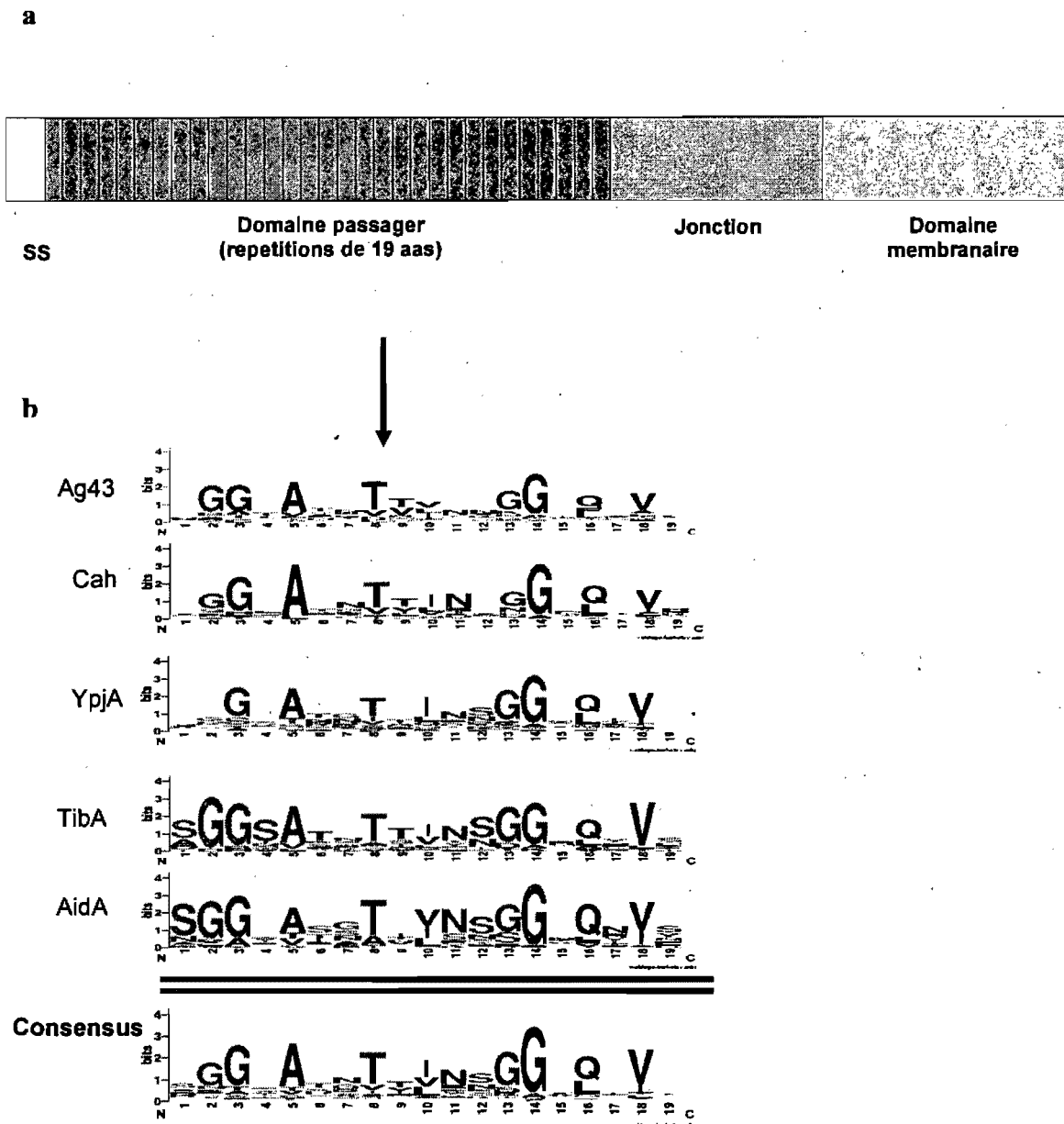


Figure 9 : Organisation et séquence consensus des autotransporteurs appartenant à la famille des SAAT. (a) Les SAAT possèdent au sein de leur domaine passager plusieurs répétitions d'une séquence de 19 acides aminés. (b) Détail de la séquence répétée de 19 acides aminés des différents SAAT à l'aide du logiciel Weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu>). La hauteur des lettres est proportionnelle à la fréquence à laquelle on retrouve l'acide aminé à cette position. La séquence consensus se répète de 15 à 40 fois selon les SAAT.

Ag43 et TibA mais d'autres autotransporteurs présentent des caractéristiques qui permettent de les classer dans cette famille (Tableau 1) (J-P. Côté et M. Mourez, données non publiées). Ces trois autotransporteurs présentent de nombreuses similitudes (136) (Figure 9) : (i) ils contiennent dans leur domaine passager des répétitions N-terminales quasi-identiques de 19 acides aminés, (ii) ils sont glycosylés par des glycosyltransférases uniques qui sont fonctionnellement interchangeables et (iii) ils sont des facteurs de virulence versatiles médiant l'adhésion, l'autoagrégation et la formation de biofilm.

### 2.7.5.2. Prévalence d'AIDA-I chez l'humain et le porc

AIDA-I fut originellement découverte dans une souche DAEC (22) mais est présente chez de nombreux pathotypes, en association avec d'autres facteurs de virulence. On la retrouve notamment chez les ETEC en association avec STb et STa ou chez les EAEC en association avec EAST1 (Enteraggregative Heat-Stable Toxin 1) (100, 195).

Chez les humains, le rôle d'AIDA-I dans la pathogénèse n'est pas clair. Dans une étude au Brésil sur 40 enfants atteints de diarrhée, 10% des souches présentaient un phénotype d'adhérence diffuse mais aucune ne possédait AIDA-I (245). Une autre étude en France sur 335 souches d'*E. coli* isolées de cas sporadiques de diarrhée montrent que seules 4% des souches possèdent AIDA-I (122). Par contre, AIDA-I est associée de manière significative avec deux maladies porcines, la maladie des œdèmes (MD) et la diarrhée post-sevrage (DPS). Le tableau 2 résume les principales études effectuées sur la prévalence d'AIDA-I chez le porc atteint de ces deux maladies. Par exemple, une étude sur 104 souches isolées de porcs montre une prévalence élevée de souches possédant AIDA-I (25%) et une association significative entre la présence du gène intact d'AIDA-I et le développement de MD-DPS. De même, des délétions dans le gène codant pour AIDA-I sont associés avec l'absence de maladie (195). Une autre étude sur 604 souches isolées de porcs malades montre que 7 d'entre elles possèdent AIDA-I (100). Parmi les souches AIDA-I+, 11% possèdent aussi des gènes codant pour la toxine EAST1, 50% possèdent des gènes codant pour Stx (Shiga-like Toxin) et 40% des gènes pour le fimbriae F18, ce qui montre qu'AIDA-I est souvent associé avec d'autres facteurs de virulence (100). Certains pathotypes, comme AIDA-I/STb/EAST1 ou AIDA-I/STb, ne se

Tableau II : Exemples d'études montrant la prévalence d'AIDA-I chez des souches porcines isolées de diarrhée.

Pays	Nombre d'isolats de diarrhée	Nombre de souches AIDA+	% de souches AIDA+	Ref
Canada	170	15	9	(193)
USA	304	82	27	(324)
Chine	320	21	6,5	(325)
Allemagne	44	18	41	(195)
Corée	604	45	7	(100)
Belgique	174	110	63	(170)

retrouvent que chez les porcs atteints de diarrhée et représentent 4,7% des isolats totaux et 20% des isolats d'*E.coli* identifiés au cours de l'étude (193).

### 2.7.5.3 Glycosylation du domaine passager d'AIDA-I

Une modification importante des autotransporteurs est la glycosylation du domaine passager. La glycosylation est un phénomène répandu chez les procaryotes, avec plus de 70 glycoprotéines identifiées à ce jour (286, 306). Les carbohydrates sont attachés au squelette peptidique soit par l'intermédiaire d'une asparagine (N-glycosylation) soit par l'intermédiaire d'une sérine ou d'une thréonine (O-glycosylation). Parmi les glycoprotéines se retrouvent de nombreuses adhésines, dont notamment les pili, les adhésines autotransporteurs et les TPS (85, 99, 230, 286). Curieusement, chez *E. coli*, les pili n'ont pas été décrits comme glycosylés. Quelques études rapportent seulement la détection de sucres lors de l'analyse de pili F (10, 294). Les trois autotransporteurs d'*E. coli* appartenant à la famille des SAAT, Ag43, AIDA-I et TibA sont par contre glycosylés par des résidus heptoses (25, 165, 261).

Les glycosyltransférases responsables de la glycosylation ont été identifiées pour AIDA-I et TibA. Il s'agit respectivement d'Aah et de TibC, qui sont fonctionnellement interchangeables (185) et codés par des gènes situés en amont du gène codant pour AIDA-I et TibA respectivement (25, 165). Aucune enzyme spécifique n'a été identifiée pour Ag43 mais la protéine peut être glycosylée par TibC ou Aah (261). Ceci suggère que la spécificité des glycosyltransférases est similaire pour Ag43, AIDA-I et TibA. De nombreuses données expérimentales suggèrent qu'Aah transfère 19 résidus heptoses sur la molécule d'AIDA-I en utilisant l'ADP glycérol-manno-heptopyranose comme précurseur et ce par une voie indépendante de celle de la synthèse des LPS (25, 322) :

- L'utilisation de mutants dans la voie de synthèse des LPS montre que le précurseur ADP glycérol-manno-heptopyranose doit être disponible pour qu'AIDA-I soit modifiée.
- Une souche déficiente pour les heptosyltransférases WaaC et Waaf qui permettent l'ajout de résidus heptoses au core des LPS, est toujours capable de glycosyler AIDA-I.

- TibC et Aah présentent des homologies de séquence avec l'heptosyltransférase WaaQ impliquée dans la biosynthèse des LPS, et ce dans la région se liant à l'ADP glycérol-manno-heptopyranose

De nombreuses questions subsistent quant au mécanisme de glycosylation :

- Quels sont les sites de glycosylation d'AIDA-I et TibA ? Sont-ils situés dans la même région que pour Ag43, c'est-à-dire dans la région contenant les séquences répétées (Figure 9) ?
- Quelle est la séquence consensus qui pourrait être reconnue par les heptosyltransférases ? Le groupe de Schmidt propose que les séquences répétées d'AIDA-I, qui contiennent de nombreuses copies du motif VNSGG, servent de sites de reconnaissance pour Aah (25).
- Quel est le mécanisme à l'origine de l'hétérogénéité de la glycosylation ? L'étude de la glycosylation d'Ag43 montre en effet que la glycosylation est hétérogène, certains segments de la protéine pouvant être glycosylés ou non (261).
- Où a lieu la glycosylation ? Le fait que la glycosyltransférase ne possède pas de séquence signal suggère que la glycosylation est cytoplasmique mais des expériences complémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Un autre point non élucidé est le rôle de la glycosylation. De nombreux rôles ont en effet été spéculés pour la glycosylation des protéines procaryotes. La glycosylation a par exemple été proposée comme un système d'évasion du système immunitaire en permettant une variation antigénique (92) ou en masquant des sites d'interactions (277). La glycosylation protège également contre le clivage protéolytique (113) et joue un rôle dans la solubilité des protéines (173) et leur assemblage (98). Le rôle de la glycosylation dans l'adhésion est controversé. La glycosylation n'est pas nécessaire pour l'adhésion des pili de *Neisseria meningitidis* aux cellules endothéliales et épithéliales (172). Cependant, elle semble nécessaire pour l'adhésion de TibA et AIDA-I aux cellules-hôtes. En effet, la délétion du gène *aah* codant pour l'heptosyltransférase abolit l'adhésion aux cellules-hôtes d'une souche AIDA+ (25). L'étude récente sur Ag43 montre aussi que seule la forme glycosylée de la protéine adhère aux cellules épithéliales (261). Ces résultats suggèrent une implication des heptoses dans la reconnaissance du récepteur, comme il a été observé pour les sucres de la protéine majeure de membrane externe de *Chlamydia*

(146). Cependant, d'autres arguments viennent contredire cette hypothèse. Par exemple, l'ajout d'heptoses dans le tampon n'inhibe pas l'adhésion d'Ag43 ni d'AIDA-I aux cellules épithéliales (25, 261). De plus, AIDA-I non-glycosylée est présente en beaucoup plus faible quantité à la surface de la cellule par rapport à AIDA-I glycosylée, ce qui suggère que la forme non glycosylée est moins stable et pourrait être dégradée avant de permettre l'adhésion de la bactérie (25). L'influence de la glycosylation sur la stabilité des protéines a aussi été observée pour l'adhésine TPS HMW1 d'*Haemophilus influenzae* (99) et pour d'autres glycoprotéines bactériennes (113, 120). Le rôle exact de la glycosylation n'est donc pas clairement défini à ce jour.

## 2.8 Conclusions

Les adhésines bactériennes sont sécrétées par un grand nombre de systèmes et adoptent des structures variées. Cependant, malgré cette diversité, on peut noter les points suivants :

- Les adhésines sécrétées par le même système de sécrétion, bien que possédant la même architecture, ont chacune une spécificité unique, comme dans le cas des pili sécrétés par le système chaperone/usher, ce qui permet à la bactérie de coloniser plusieurs milieux.
- La structure des adhésines, quel que soit leur mode de sécrétion, leur permet de dépasser de la surface bactérienne et ainsi d'avoir une meilleure accessibilité aux récepteurs eucaryotes de l'hôte, en traversant notamment la couche de LPS et la capsule.
- Certaines adhésines, bien qu'éloignées de la surface bactérienne, sont flexibles et permettent à la bactérie de se rapprocher de la cellule-hôte, comme dans le cas du pilus de type IV rétractable ou de l'intimine pour laquelle la charnière flexible est à l'origine d'un contact intime entre la bactérie et la cellule.
- La structure des adhésines permet la polyvalence, en multipliant les domaines de liaisons aux récepteurs, et la multifonctionnalité, comme dans le cas des autotransporteurs où des boucles distinctes extracellulaires sont engagées dans diverses fonctions, comme nous allons le voir dans les paragraphes qui suivent.

### 3. Rôle des adhésines autotransporteurs dans la pathogénèse

#### 3.1 Rôle global des adhésines dans la pathogénèse

Les toutes premières études sur le rôle des adhésines dans les années 1980 étaient seulement capables de corréler la capacité des bactéries à adhérer aux cellules à leur infectivité dans un modèle animal d'infection. Dans la plupart des cas, il n'était pas possible de déterminer les adhésines et les récepteurs impliqués. Ce n'est qu'avec l'essor de la biologie moléculaire qu'il fut possible de définir le rôle spécifique des adhésines dans la virulence. En effet, la possibilité de cloner et d'exprimer des gènes codant pour des adhésines et de produire des souches recombinantes inactivées pour une ou plusieurs adhésines permit d'obtenir une corrélation claire entre adhésion et pathogénèse. Il serait fastidieux de citer toutes les études ayant montré le rôle des adhésines dans un modèle animal d'infection. Dans la majorité des cas, l'inactivation d'une adhésine n'abolit pas totalement la pathogénèse d'une souche mais montre clairement le lien adhésine/infection (28, 51, 64, 183, 305). Les souches utilisent en effet de nombreuses adhésines pour coloniser leur hôte. Un exemple bien connu illustrant l'importance des adhésines dans la colonisation est celui des *E. coli* exprimant les fimbriae K99 ou F5 (148). Ces fimbriae se lient uniquement à l'acide glycolylneuraminique qui se trouve exclusivement à la surface des cellules intestinales de porcelet et qui disparaît à l'âge adulte. Les souches de *E. coli* exprimant ces fimbriae provoquent la diarrhée chez les porcelets mais pas chez les porcs adultes et les humains, ce qui montre l'importance de l'adhésion dans la pathogénèse (148). Par ailleurs, plusieurs études utilisant des techniques d'analyse de l'expression des gènes *in vivo* comme la STM (Signature-Tagged Mutagenesis) ou les puces à ADN indiquent que les adhésines sont des facteurs essentiels de colonisation et jouent un rôle majeur dans la pathogénèse (14, 69, 105). De plus, une étude récente montre qu'AIDA-I est essentielle pour la colonisation intestinale (235). En effet, des porcs privés de colostrum et infectés par une souche AIDA-/STb+ ne développent pas de diarrhée comparativement à ceux infectés par une souche AIDA+/STb+.

Dans la plupart des cas, adhésion et pathogénèse sont clairement reliés. Ce lien peut s'expliquer par les multiples rôles des adhésines dans la pathogénèse, comme nous allons le voir dans les paragraphes qui suivent.

### **3.2 Un rôle essentiel : l'adhésion**

Le premier rôle d'une adhésine est évidemment d'adhérer à des surfaces biotiques ou abiotiques. Il est communément admis qu'une adhésine adhère de manière spécifique aux surfaces biotiques telles que les cellules-hôtes ou la matrice extracellulaire et de manière non-spécifique aux surfaces abiotiques. Cependant, une étude récente montre que les pili de type IV de *Pseudomonas aeruginosa* adhèrent de manière spécifique à l'acier inoxydable, remettant en cause cette théorie (93).

#### **3.2.1 Adhésion aux cellules-hôtes**

La fonction première d'une adhésine est de se lier aux cellules-hôtes en interagissant spécifiquement avec un récepteur. FimH, par exemple, est capable de se lier spécifiquement à de nombreux mannosides (144). De plus, l'adhésion liée à FimH est en général sensible au D-mannose. Une étude récente montre que la bundline formant le filament du BFP des EPEC est une lectine se liant au n-acetyllactosamine et que cette molécule inhibe l'adhésion locale des bactéries aux cellules en culture (116). Les constantes d'affinités des fimbriae pour les sucres ont été mesurées dans quelques cas et sont de l'ordre du micromolaire (31, 154). Les autotransporteurs en général, comme AIDA-I ou TibA, n'ont pas de récepteurs connus (Tableau 1). On sait néanmoins que ces deux protéines se lient de manière spécifique et saturable à des cellules en culture (24, 26, 73).

Les domaines de liaison au récepteur ont été identifiés dans quelques cas. La structure des adhésines FimH (47) et PapG (280) révèle que les domaines servant à la liaison au récepteur ont une architecture commune en forme de «  $\beta$  roll ». Les sites de liaison au récepteur à l'intérieur de ces domaines diffèrent et confèrent à chacune de ces adhésines une spécificité unique. Pour les autotransporteurs, certains domaines passagers



possèdent des motifs impliqués dans l'adhésion comme Ag43 qui possède un motif RGD (111) ou TibA qui possède 8 répétitions d'une région PRR riche en proline (165). Les autotransporteurs Ag43, TibA et AIDA-I possèdent aussi 20 à 30 séquences répétées de 19 acides aminés contenant 4 ou 5 glycines qui pourraient constituer des sites de liaison au récepteur (21, 134, 165). La bactérie engagerait alors simultanément plusieurs copies du même récepteur et ferait ainsi de l'adhésion une interaction polyvalente de forte affinité. Cette multiplicité de sites se retrouve aussi chez les autotransporteurs trimériques, qui, pour des raisons de symétrie, ont trois sites de liaison identiques (94). Des sites se liant au même récepteur ont parfois des affinités différentes pour celui-ci. C'est le cas par exemple d'AIDA-I et des autotransporteurs trimériques Hsf et Hia (43, 53, 149). Pour Hia, un site de liaison en C-terminal a une grande affinité pour le récepteur tandis qu'un site de faible affinité est présent en N-terminal (149). Pour AIDA-I, des mutations en N-terminal éliminent totalement l'adhésion de la protéine aux cellules tandis que des mutations en C-terminal réduisent le phénotype d'adhésion (43). La présence de plusieurs sites pourrait permettre une adhésion en deux étapes (53). Le domaine de faible affinité serait responsable du contact initial avec la cellule-hôte. Puis, il serait déplacé par le domaine de forte affinité, ce qui résulterait en un mouvement permettant à la bactérie de se rapprocher de sa cible. Les deux domaines pourraient aussi être impliqués dans une réaction bivalente, renforçant ainsi l'affinité de l'interaction (53). Cette multivalence se retrouve également chez les adhésines fimbriales. Par exemple, chaque sous-unité de bundline qui compose le filament des BFP est une lectine capable d'interagir avec un sucre. La répétition des sous-unités le long de la fibre fait de cette adhésine un modèle typique de « Velcro » et accroît la force de l'interaction (116).

Une même adhésine peut aussi se lier à différents récepteurs. Les autotransporteurs Hap (*Haemophilus* Adhesin and Penetration Protein) et YadA (*Yersinia enterocolitica* Adhesin), par exemple, peuvent se lier aux cellules épithéliales mais aussi au collagène, à la laminine et à la fibronectine, par l'intermédiaire de domaines de liaison se chevauchant ou non (71, 81).

Certains autotransporteurs sont aussi des protéines multifonctionnelles comme Hbp qui est à la fois une hémoglobine protéase et une adhésine (143). Les domaines médiant ces fonctions sont clairement séparables, faisant de cette adhésine une protéine

modulaire. Comme nous l'avons vu plus haut, la cohabitation de plusieurs fonctions au sein de la même protéine est rendu possible par la structure des autotransporteurs qui sont constitués d'une hélice  $\beta$  sur laquelle viennent se greffer différentes boucles arborant les différentes fonctions de la protéine. Les fimbriae ne sont pas des protéines modulaires mais l'existence de nombreux variants permet une flexibilité de liaison aux différents récepteurs. Une altération mineure de la structure primaire de FimH, par exemple, modifie sa spécificité envers différents motifs d'oligomannose (273) et peut même lui permettre d'adhérer à des protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène ou la laminine (145, 229). Pour FimH, ce changement de spécificité contribue au tropisme tissulaire de la bactérie (273).

Une dernière caractéristique de l'adhésion est sa redondance. Une bactérie exprime en effet de nombreuses adhésines à sa surface. Cette redondance peut permettre à la bactérie de coloniser différentes niches. Les UPEC, par exemple, colonisent la vessie grâce aux fimbriae de type 1 et le rein grâce au pili de type P (272). L'expression des fimbriae de type 1 régule négativement l'expression des pili P et l'action coordonnée de ces deux adhésines pourrait jouer un rôle dans l'occupation séquentielle des tissus du tractus urinaire (272). Plusieurs adhésines peuvent aussi contribuer à une seule fonction. Ainsi l'expression coordonnée de FimH et Ag43 contribue à la formation de biofilm, comme nous le verrons dans le paragraphe 3.5.

### ***3.2.2 Adhésion à la matrice extracellulaire***

De nombreuses adhésines sont capables d'adhérer à la matrice extracellulaire (MEC), tels que FimH qui adhère au collagène, à la laminine et à la fibronectine (145, 229, 250), les fimbriae Dr qui adhèrent au collagène (315), les curli qui adhèrent à la laminine et à la fibronectine (17), les pili P qui adhèrent à la fibronectine (316, 317), certains autotransporteurs comme YadA ou Hap qui interagissent avec le collagène, la fibronectine ou la laminine (71, 81) et les flagelles qui adhèrent à la mucine (164). Cette adhésion est soit le fait de variants comme dans le cas de FimH soit le fait de protéines multifonctionnelles possédant des domaines spécifiques de liaison à la matrice extracellulaire comme dans le cas des autotransporteurs YadA et Hap. A notre

connaissance, la liaison des autotransporteurs d'*E. coli* à des protéines de la MEC n'a pas été démontrée à ce jour.

L'interaction avec les protéines de la MEC peut être soit de nature protéine-sucre, comme les fimbriae de type 1 qui se lient aux chaînes oligosaccharidiques de la laminine, soit de nature protéine-protéine, comme dans le cas de la liaison de YadA au collagène. On retrouve pour l'adhésion à la MEC les mêmes caractéristiques que pour l'adhésion aux cellules, à savoir la présence au sein de la même adhésine de multiples sites de liaison à la même protéine de MEC. Par exemple, l'autotransporteur trimérique Hap possède trois sites de liaisons identiques à la fibronectine (81). On retrouve aussi au sein de la même adhésine la présence de différents sites de liaisons à des protéines distinctes comme par exemple YadA qui possède un site de liaison au collagène et un site de liaison à la fibronectine et la laminine (287).

### 3.3 L'invasion

Un autre rôle des adhésines est de permettre l'invasion des cellules-hôtes. L'adhésion et l'invasion sont en effet considérées comme des processus intimement liés. Les bactéries utilisent deux stratégies majeures pour envahir les cellules (226). L'une d'elles consiste à injecter directement des effecteurs dans le cytosol de la cellule par un système de sécrétion de type III ou T3SS. Ces effecteurs vont entraîner des réarrangements du cytosquelette menant à l'internalisation de la bactérie. L'autre stratégie consiste à engager par l'intermédiaire d'adhésines des récepteurs cellulaires, de manière à déclencher une cascade de signaux spécifiques, incluant la phosphorylation de protéines kinases et l'activation de composants du cytosquelette. De nombreux exemples de cette stratégie existent chez *E. coli*. Les fimbriae de type 1, par exemple, en se liant aux cellules urothéliales, déclenchent une cascade de signaux aboutissant à l'internalisation de la bactérie dans les cellules de la vessie. Cette cascade implique les intégrines  $\beta 1$  et  $\alpha 3$  comme récepteurs (75) ainsi que les kinases FAK et PI-3 (176) et les Rho GTPases (175). D'autres adhésines de la famille Afa/Dr interagissent avec les intégrines pour envahir les cellules (127, 227).

Concernant les autotransporteurs, de nombreuses adhésines sont aussi des invasives comme YadA (109), AIDA-I (42) et TibA (73). L'invasion semble être dans tous les cas un phénomène spécifique mais les détails de la cascade de signalisation menant à l'internalisation de la bactérie ne sont pas connus. Cependant, deux études récentes sur YadA et AIDA-I suggèrent que l'adhésion et l'invasion utilisent des mécanismes différents (43, 109). L'étude sur AIDA-I montre en effet que certains mutants sont encore capables d'adhérer aux cellules mais ne médient plus l'invasion. Inversement, certains mutants ayant un défaut sévère dans l'adhésion sont encore capables d'envahir des cellules (43). Ces résultats semblent indiquer que les interactions responsables de l'invasion sont différentes des interactions entre AIDA-I et son récepteur. Dans ce cas précis, l'invasion n'est pas une conséquence directe de l'adhésion. L'étude sur YadA montre que les variants qui se lient fortement à la fibronectine sont capables d'envahir les cellules tandis que ceux se liant au collagène et à la laminine ne le sont pas (109). Pourtant, dans les deux cas, la bactérie forme un pont avec la cellule-hôte par l'intermédiaire de l'intégrine. La force et la nature de l'interaction semble donc déterminer s'il y a invasion ou non.

De nombreuses questions restent en suspens concernant l'invasion :

- Quelle est la différence entre adhésion et invasion ?
- Pourquoi l'adhésion mène-t-elle dans certains cas à l'invasion et pas dans d'autres ?
- Les récepteurs impliqués dans l'adhésion sont-ils semblables à ceux impliqués dans l'invasion ?

### **3.4 L'autoagrégation**

Un autre rôle des adhésines est de permettre l'autoagrégation des bactéries. L'autoagrégation se définit comme la formation de larges agrégats cellulaires et peut se visualiser macroscopiquement par la sédimentation au fond du tube d'une culture statique de bactéries. Il s'agit d'un phénotype présent chez de nombreuses bactéries, aussi bien gram-positives que gram-négatives, et qui est très facilement observable. Il suffit en effet de laisser un tube de culture sur une paillasse pour observer la floculation progressive des bactéries. Il est surprenant de constater que la majorité des adhésines médient

l'autoagrégation comme les curli (101), certains variants de FimH (247), les pili de type IV (28), les fimbriae AAF/I et AAF/II (56, 191) et de nombreux autotransporteurs récapitulés dans la revue en Annexe 1 et dans le tableau 1 (94). On peut citer par exemple les SAAT Ag43, TibA et AIDA-I mais aussi les autotransporteurs YadA, Hap ou Hag (94).

Bien que ce phénotype soit aisément observable, le mécanisme par lequel les bactéries autoaggrègent n'est pas à ce jour clairement défini. Cependant, il est couramment admis que le phénomène d'autoagrégation résulte de l'association de l'adhésine avec elle-même, ce qui entraîne la formation de larges amas qui tombent alors par gravité au fond du tube de culture. Dans quelques cas, l'association de l'adhésine avec elle-même a été observée au niveau moléculaire, comme pour les bundle-forming pili qui s'associent parallèlement en paquets (bundles) à la surface d'une même bactérie et antiparallèlement avec les pili des bactéries avoisinantes (28, 140). Dans d'autres cas, l'interaction protéine-protéine n'a pas été démontrée mais de nombreux indices semblent impliquer les adhésines dans ce phénomène. Concernant les SAAT, plusieurs études impliquent le domaine passager dans le phénomène d'autoagrégation (104, 262, 263) : (i) les bactéries exprimant un SAAT autoaggrègent de manière similaire, (ii) les bactéries possédant uniquement le domaine membranaire n'autoaggrègent plus et (iii) l'utilisation de bactéries marquées avec des fluorophores différents suggère que l'autoagrégation résulte de l'association de l'adhésine avec elle-même et non avec d'autres composés bactériens à la surface de la cellule. Cette technique de marquage fluorescent des bactéries suggère aussi que tous les SAAT sont capables d'interagir avec eux-mêmes et avec les autres SAAT en formant des agrégats mixtes (136). Cependant, ces expériences ne constituent en aucun cas une preuve formelle de l'existence d'interactions homophiles et hétérophiles entre les SAAT et ne sont que des preuves indirectes. De plus, cela ne permet pas d'exclure l'existence de protéines accessoires qui pourraient éventuellement former un pont entre deux SAAT provenant de bactéries avoisinantes.

Dans la majorité des cas, l'autoagrégation et l'adhésion semblent être deux fonctions distinctes impliquant des phénomènes différents. Pour les bundle-forming pili, l'autoagrégation serait un phénomène non spécifique alors que l'adhésion impliquerait des domaines se liant à des sucres (116). Pour FimH, l'autoagrégation n'est pas sensible

au mannose, ce qui suggère qu'il s'agit d'un phénomène différent de celui de l'adhésion (247). Pour les autotransporteurs, le domaine impliqué dans l'autoagrégation est différent de celui impliqué dans l'adhésion pour AIDA-I mais il est identique pour Hap (43, 81).

De nombreuses questions se posent encore concernant l'autoagrégation :

- L'autoagrégation résulte-t-elle d'interactions homophiles directes de l'adhésine avec elle-même ? Quelques études ont démontré une interaction directe protéine-protéine par des techniques de marquage radioactif ou de pull-down comme celles sur la protéine FHA (Filamentous Hemagglutinin) de *Bordetella pertussis* (181) ou la protéine H de *Streptococcus pyogenes* (87) mais dans la majorité des cas, il n'existe aucune preuve de l'interaction.

- Existe-t-il des facteurs accessoires permettant l'autoagrégation ? Un contact direct entre deux molécules est-il toujours à l'origine de ce phénomène ?

- Quelle est la spécificité de l'autoagrégation ? L'existence d'agrégats mixtes chez les SAAT rend cette question encore plus mystérieuse : comment des protéines présentant des homologies de séquence limitées peuvent-elles interagir avec elles-mêmes et avec d'autres protéines de la même façon ? Cela suppose que l'association nécessaire à l'autoagrégation soit basée sur de faibles contraintes structurales. De plus, des études sur Ag43, TibA et AIDA-I montrent que l'autoagrégation est affectée par le pH et la force ionique, ce qui suggère un rôle pour les interactions électrostatiques (262, 263).

- Quel est le mécanisme d'autoagrégation en tant que tel ? L'autoagrégation implique l'interaction entre adhésines de molécules avoisinantes afin qu'il y ait sédimentation. Qu'en est-il de l'autoagrégation entre molécules adjacentes sur une même bactérie ? Quelle est la part des interactions parallèles et antiparallèles ? Ces deux interactions ont-elles la même affinité ? Est-ce que les mêmes domaines d'interaction sont impliqués ? Une étude sur le pilus de type IV de *Vibrio cholerae*, le « toxin-coregulated pilus » (Tcp), montre qu'un mutant est encore capable de former des paquets à la surface de la bactérie mais ne médie plus l'autoagrégation, ce qui suggère l'implication de domaines différents pour les deux types d'interaction (130). Craig *et al* (54) proposent que les pili de type IV s'associent parallèlement avec une faible affinité à la surface de la bactérie, formant des paquets lâches, tandis que l'association antiparallèle à l'origine de l'autoagrégation est de forte affinité et implique un domaine à l'extrémité distale du pilus.

### 3.5 La formation de biofilm

Un biofilm peut se définir comme une communauté structurée de bactéries adhérentes à une surface et englobée dans une matrice extracellulaire produite par la communauté elle-même (67). La formation d'un biofilm est complexe et peut être simplifiée en quatre étapes majeures (278). La première étape est l'adhésion à une surface abiotique. La deuxième étape est la production par les bactéries d'une matrice extracellulaire englobant la communauté. La troisième étape est la maturation du biofilm en une communauté structurée dans laquelle les bactéries adhèrent les unes aux autres. Finalement, la dernière étape est la dispersion des bactéries individuelles du biofilm. Les adhésines, en permettant à la fois l'adhésion et l'autoagrégation, contribuent donc fortement à la formation du biofilm. Il n'est ainsi pas surprenant que plusieurs adhésines comme FimH (248), les curli (17) ou les autotransporteurs (262, 263, 313, 319) soient impliqués dans ce phénomène à différents stades. Les fimbriae sont surtout impliqués dans l'étape initiale d'adhésion. Des mutations dans le gène codant pour FimA, la sous-unité majeure des fimbriae de type 1 ou dans l'adhésine FimH réduisent l'adhésion initiale de *E. coli* au chlorure de polyvinyle (PVC) et à d'autres surfaces abiotiques (232). Les curli ont aussi été impliqués dans la colonisation de surfaces inertes et jouent un rôle particulier en s'associant à la cellulose présente dans la matrice extracellulaire produite par les bactéries et qui entourent la communauté (17).

Concernant les autotransporteurs, de nombreuses études montrent que l'expression d'Ag43, AIDA-I et TibA stimule la formation de biofilms de manière significative (58, 132, 262, 263). On suppose que les SAAT participent au biofilm en permettant principalement sa maturation par la formation d'agrégats de bactéries menant à la constitution d'une communauté structurée tridimensionnelle. On ne peut cependant pas exclure qu'ils jouent aussi un rôle dans les premières étapes, soit en formant des microcolonies qui ensuite adhèrent à une surface, soit en participant à l'adhésion initiale. Leurs rôles exacts restent donc à clarifier. On sait toutefois que Ag43 n'est pas impliqué dans l'étape initiale d'adhésion à une surface abiotique (132). De plus, deux études structure-fonction sur AIDA-I et Ag43 (43, 134) montrent que certains mutants non

agrégatifs forment des biofilms et inversement. Cela implique que la formation de biofilms par les SAAT ne dépend pas uniquement de la capacité à autoagréger. Ag43 pourrait aussi avoir un rôle dans la formation des biofilms intracellulaires dans les cellules de vessie (7).

La formation des biofilms est un bel exemple de l'action coordonnée des adhésines. Prenons le cas de FimH et Ag43. Globalement, on peut considérer que FimH est impliqué dans l'étape initiale d'adhésion à la surface tandis qu'Ag43 est impliqué dans la maturation du biofilm. La production et l'activité de ces deux adhésines sont coordonnées. En effet, la surexpression des fimbriae de type 1 élimine l'expression d'Ag43 à la surface par un mécanisme dépendant du régulateur oxyR (249). De plus, indépendamment de l'expression d'Ag43, la présence de fimbriae à la surface semble inhiber stériquement l'interaction Ag43/Ag43 qui est nécessaire à l'autoagrégation (104).

### 3.6 Conclusions

*E. coli* possède un arsenal d'adhésines dont certaines ne sont certainement exprimées que dans des conditions spécifiques. Ces adhésines, bien que pouvant être structurellement très différentes, ont de nombreux points communs :

- Leur structure allongée et répétitive leur permet d'interagir avec l'hôte avec une grande affinité
- Ces protéines flexibles sont capables de se lier à un nombre varié de récepteurs et peuvent avoir une organisation modulaire, chaque module occupant une fonction spécifique
- Ce sont des facteurs de virulence versatiles occupant une variété de fonctions dont l'autoagrégation et la formation de biofilms
- Elles peuvent être glycosylées et le rôle exact de cette modification n'est pas connu.



## **4. Inhibition de l'adhésion**

### **4.1 Concept général**

Comme nous l'avons vu plus haut, l'adhésion est une étape essentielle dans le processus infectieux. Elle permet à la bactérie de résister au mécanisme d'élimination et de coloniser le milieu. Le lien entre adhésion et pathogénèse a été clairement démontré. En théorie, inhiber l'adhésion permettrait donc d'inhiber l'infection. Par ailleurs, l'émergence graduelle de la résistance aux antibiotiques des bactéries rend essentielle la découverte de méthodes alternatives de traitement, et ce dans un délai bref. La résistance aux antibiotiques est en effet un problème majeur depuis environ une dizaine d'années avec l'apparition de bactéries multi-résistantes qui rendent la chimiothérapie par antibiotiques de plus en plus inefficace (162). Le traitement par antibiotiques perturbe également la flore commensale, ce qui peut amener à des déséquilibres importants et à la prolifération de pathogènes opportunistes (38). Un traitement alternatif basé sur l'inhibition de l'adhésion des bactéries est particulièrement intéressant car il ne s'agit pas d'un traitement bactéricide susceptible de détruire la flore commensale. De plus, il n'exerce pas de pression sélective pouvant amener à l'émergence rapide de souches résistantes. Il existe théoriquement de nombreuses manières d'inhiber l'adhésion (38, 203). Les deux moyens qui semblent les plus prometteurs sont soit d'inhiber l'interaction adhésine-récepteur qui est à l'origine de l'adhésion, soit d'inhiber le mode d'assemblage des adhésines. La première méthode se heurte à deux problèmes majeurs que sont la redondance et la polyvalence de l'adhésion, comme nous allons le voir dans les paragraphes qui suivent. La deuxième méthode, quant à elle, n'en n'est qu'à ses débuts.

### **4.2 Inhibition de l'interaction adhésine-récepteur**

#### ***4.2.1 Utilisation d'analogues du récepteur***

Cette méthode, qui est la plus utilisée, consiste à employer un analogue du récepteur qui, en se fixant à l'adhésine, l'empêche d'interagir avec son récepteur. Elle

requiert pour cela de connaître la nature du récepteur et a surtout été employée pour inhiber l'adhésion des adhésines se liant à des sucres, comme par exemple les pili P et les fimbriae de type 1 chez *E. coli*. Ces adhésines ont en effet été largement étudiées et leur spécificité de liaison est très bien connue. La première étude utilisant ce principe date de 1979 (11) : l'emploi de méthyl  $\alpha$ -mannoside permet de réduire la colonisation de la vessie par les UPEC de deux-tiers par rapport au groupe contrôle. Par la suite, de nombreuses études montrèrent que l'emploi d'oligosaccharides permet d'inhiber l'adhésion des bactéries *in vitro* (83, 204, 205, 252) et *in vivo* (70, 117, 189). *In vitro*, le pouvoir inhibiteur d'un composé se mesure par l'IC<sub>50</sub> (Inhibitory Concentration), qui correspond à la dose nécessaire pour obtenir 50% d'inhibition. Cette valeur varie grandement en fonction du test utilisé, ce qui rend la comparaison des inhibiteurs difficile. Cependant, les différentes études indiquent que l'IC<sub>50</sub> de ces composés est typiquement de l'ordre du millimolaire. Par exemple, 7,6 mM de mannose sont nécessaires pour bloquer de moitié l'adhésion de bactéries aux cellules urothéliales (9). Certains tests utilisant l'adhésine purifiée au lieu de la bactérie entière donnent par contre pour certains composés des IC<sub>50</sub> de l'ordre du micromolaire ou du nanomolaire (154, 190). *In vivo*, les tests montrent aussi que les doses requises pour ce type d'inhibiteur restent très élevées.

Ces inhibiteurs ne sont donc pas utilisables en pratique pour contrer l'adhésion et la raison majeure de cet échec est l'affinité faible de ces composés pour leur cible. Comme nous l'avons vu plus haut, l'adhésion est en effet un phénomène multivalent et ce à plusieurs niveaux. Un inhibiteur monovalent doit donc être utilisé à des doses très élevées pour occuper tous les sites de liaison des adhésines à leur récepteur. Le développement d'inhibiteurs polyvalents permet de résoudre ce problème et a représenté une percée majeure dans la thérapie anti-adhésive (224). De nombreux composés multivalents de mannose ou de galabiose furent ainsi développés pour empêcher l'adhésion (18, 166, 190, 242, 266). Ces inhibiteurs multivalents ont typiquement des IC<sub>50</sub> de l'ordre du nanomolaire et leur affinité pour l'adhésine est en moyenne de 1000 à 3000 fois plus élevée que leur équivalent monovalent. Cependant, à notre connaissance, l'efficacité de ces composés multivalents n'a pas été testée *in vivo* et les doses requises pour obtenir un effet ne sont pas connues. Ces composés sont peut-être trop toxiques ou immunogènes pour une application chez l'animal. Cette approche semble pourtant

intéressante si l'on se fie aux résultats obtenus avec d'autres systèmes où une interaction polyvalente avec un récepteur est impliquée, comme dans le cas de la liaison d'une toxine AB5 avec son récepteur (77). On peut citer par exemple les inhibiteurs STARFISH et SUPERTWIG qui sont des carbohydrates polyvalents analogues du récepteur des toxines Shiga-like, pour lequel les résultats *in vivo* sont très prometteurs (188, 196). Dans le cas de l'inhibiteur STARFISH, les souris sont protégées à 90% lorsqu'elles reçoivent par voie sous-cutanée une mixture de toxine Stx1 et d'inhibiteur à un ratio de 1000 pour 1 (188).

#### **4.2.2 Utilisation d'analogues de l'adhésine**

Le principe de cette technique est le suivant : les analogues de l'adhésine vont se lier au récepteur et ainsi empêcher celui-ci de se fixer à l'adhésine. Cette stratégie a été beaucoup moins employée car la liaison d'un analogue au récepteur, même s'il empêche effectivement les bactéries d'adhérer, peut être à l'origine d'une réponse inflammatoire par la cellule ou activer des cascades intracellulaires. Il existe cependant quelques études utilisant des analogues de l'adhésine (128, 159, 160). Une étude prometteuse est celle utilisant un peptide de 20 acides aminés copiant la séquence d'une adhésine de *Streptococcus mutans* se liant à une protéine présente dans la salive (128). *In vitro*, 0,5 mg/ml de peptide inhibe de moitié la liaison des bactéries au récepteur immobilisé. *In vivo*, l'application sur les dents de 10 mg/ml de peptide à six reprises pendant trois semaines retarde significativement la recolonisation de la bouche par *S.mutans*. L'utilisation de pili purifiés a aussi été employé pour inhiber l'adhésion de certaines bactéries mais les doses requises sont importantes (123, 259). 20 µg/ml de pili F5 sont en effet nécessaires pour bloquer 50% des récepteurs à la surface d'entérocytes porcins (123).

#### **4.2.3 Inhibition de l'interaction protéine-ligand**

Les méthodes utilisant des analogues nécessitent une bonne connaissance de l'interaction adhésine-récepteur. Or, pour de nombreuses adhésines, dont AIDA-I, la

nature du récepteur et la structure de l'adhésine ne sont pas connues. Il est donc avantageux dans ce cas d'utiliser une méthode plus générale pour inhiber l'interaction protéine-ligand, ne nécessitant pas de connaissances préalables sur la cible. Cette méthode repose sur le même principe que les deux autres méthodes, à la différence près qu'il ne s'agit pas de trouver des analogues. Il s'agit de trouver un inhibiteur capable de se lier soit à l'adhésine, soit au récepteur, afin d'inhiber l'interaction entre les deux. Une stratégie possible est le criblage de banques de peptides aléatoires présentés à la surface de phages (186). Cette technique de « phage display » repose sur la fusion d'une banque de peptides avec une protéine localisée à la membrane du phage, résultant en la présentation des peptides à la surface des phages filamentaires. L'identification de peptides capables de se fixer à une cible se fait par exposition de la librairie de phages à la cible immobilisée ou en solution, comme dans notre cas une adhésine ou un récepteur. La sélection de clones particuliers au sein d'une grande population ( $> 10^{10}$  clones) est réalisée en quelques semaines, après trois ou quatre cycles de sélection-amplification. La séquence des acides aminés du peptide porté par le phage d'intérêt est déterminée par la séquence de l'ADN du phage.

Cette technique a été appliquée pour identifier une grande variété d'inhibiteurs se liant par exemple à des toxines (15, 187), des récepteurs (19, 97), des enzymes (115, 213) ou des composés bactériens essentiels tels que MurC qui est impliqué dans la synthèse du peptidoglycan (72). Cette technique a aussi été utilisée sur des cellules ou des bactéries entières (139, 285). Si l'interaction est polyvalente, comme dans le cas de l'interaction de la toxine de l'anthrax avec son récepteur, les peptides inhibiteurs se liant à la toxine ou à son récepteur peuvent être greffés sur des supports polymériques tel qu'un squelette de polyacrylamide ou un liposome, afin de créer des inhibiteurs polyvalents ayant une forte affinité pour leur cible (19, 187). Ainsi, un inhibiteur peptidique polyvalent dirigé contre le récepteur de l'anthrax est 50000 fois plus inhibiteur que son équivalent monovalent et permet de neutraliser la toxine *in vivo* (19). A notre connaissance, cette technique n'a pas été employée pour identifier un inhibiteur peptidique de l'interaction polyvalente entre une adhésine bactérienne et un récepteur à la surface de l'hôte et reste donc une stratégie encore inexplorée.

### **4.3 Inhiber l'assemblage des adhésines**

Une autre stratégie consiste à inhiber la biogénèse des adhésines. Cette méthode récente s'inscrit dans une approche plus globale d'inhibition de la virulence qui consiste à bloquer les mécanismes spécifiques à l'origine d'une infection, comme l'adhésion, l'invasion ou la sécrétion de toxines (38). Cette stratégie n'en n'est qu'à ses débuts et a pour l'instant été appliquée à l'inhibition de la biogénèse des pili de type 1 des UPEC. Il s'agit d'une cible particulièrement intéressante car inhiber les pili revient à inhiber l'adhésion, l'invasion et la formation de biofilms intracellulaires qui sont trois étapes clés menant à une infection urinaire récurrente. Les pili de type 1 sont sécrétés par le système chaperone/usher (voir paragraphe 2.2). Des molécules appelées pilicides sont capables d'inhiber l'interaction entre l'adhésine FimH et sa chaperone FimC, ce qui empêche la biogénèse du pilus (282). Une nouvelle classe de pilicides est aussi capable d'inhiber l'assemblage des pili de type 1 et des pili P en interférant avec la liaison chaperone/usher (225).

## **5. Approche et démarche scientifique**

Les adhésines constituent un sujet d'étude passionnant et vaste. Les autotransporteurs sont particulièrement intéressants du fait de leur versatilité et de leur organisation modulaire. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à deux propriétés d'AIDA-I, sa glycosylation et sa capacité à autoaggréger. Nous avons aussi tenté d'inhiber l'interaction d'AIDA-I avec son récepteur afin d'inhiber le processus infectieux.

### **5.1 Etude de la glycosylation d'AIDA-I**

Comme nous l'avons vu, AIDA-I a la particularité d'être glycosylée par des résidus heptoses. Cette glycosylation est nécessaire à l'adhésion mais pas à l'autoaggrégation et à la formation de biofilm. De nombreuses questions subsistent concernant ce phénomène. Quels sont les parties de la protéine qui sont glycosylées ?

Quel est le rôle de la glycosylation ? Nous avons tenté de répondre à ces questions au cours de l'étude présentée dans l'article 1. Cette étude a pour objectifs :

- d'identifier les sites de glycosylation de la protéine
- de comprendre le rôle de la glycosylation

Des techniques biochimiques de spectrométrie de masse et de dégradation d'Edman nous ont permis de répondre au premier objectif. Nous avons pu identifier quels étaient les parties de la protéine qui étaient glycosylées et dans quelques cas quels étaient les résidus modifiés. Nous avons tenté de répondre au deuxième objectif par une série d'expériences comparant les propriétés des souches exprimant la forme glycosylée et non glycosylée de la protéine. Nous avons pu ainsi mettre en évidence un rôle de la glycosylation sur la conformation de la protéine.

## **5.2 Etude de l'autoagrégation médiée par AIDA-I**

Il est surprenant que la majorité des adhésines, qu'elles soient fimbriales ou afimbriales, soient capables d'autoaggréger. Chez les autotransporteurs, des protéines aussi différentes que YadA et TibA peuvent médier l'autoagrégation. De plus, tous les membres des SAAT peuvent interagir entre eux. De nombreuses questions restent en suspens : Peut-on caractériser ces interactions homophiles ou hétérophiles ? S'agit-il d'interactions spécifiques ou non spécifiques ? Ces questions nous ont amenés à caractériser l'interaction AIDA-I/AIDA-I. Il s'agit de l'étude présentée dans l'article 2. Cette étude a pour objectifs :

- de confirmer l'implication du domaine extracellulaire d'AIDA-I dans l'autoagrégation
- de caractériser l'interaction d'AIDA-I avec elle-même *in vitro* et *in vivo*
- de mesurer l'implication des interactions nonspécifiques et les changements de conformation accompagnant cette association

Pour répondre à ces objectifs, nous avons notamment utilisé les techniques de résonance plasmonique de surface (SPR) et de pontage chimique extracellulaire. Cette étude nous a permis d'élaborer un modèle possible pour l'autoagrégation médiée par les SAAT.

### 3 Inhibition d'AIDA-I

L'émergence graduelle de la résistance des bactéries aux antibiotiques rend essentielle la découverte de méthodes alternatives de traitement, et ce dans un délai bref. Inhiber l'adhésion est une voie prometteuse pour inhiber l'infection. Ne connaissant ni la structure d'AIDA-I ni la nature de son récepteur, nous avons appliqué la stratégie encore inexplorée consistant à cribler des banques de peptides aléatoires présentés à la surface de phages afin de trouver un inhibiteur peptidique se liant à l'adhésine. Pour ce faire, nous nous sommes inspirés de la stratégie utilisée pour développer les inhibiteurs de l'anthrax. Cette étude est présentée dans l'article 3. Elle a pour objectif le design et le test *in vitro* d'inhibiteurs peptidiques de l'interaction médiée par AIDA-I. Nous avons isolé un peptide capable de se fixer à AIDA-I et qui représente un inhibiteur potentiel de l'interaction.

# **MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS**



## ARTICLE 1

### **O-linked glycosylation ensures the normal conformation of the autotransporter Adhesin Involved in Diffuse Adherence (AIDA-I)**

**Marie-Ève Charbonneau<sup>1,†</sup>, Victoria Girard<sup>1,†</sup>, Anastasia Nikolakakis<sup>2</sup>, Manuel Campos<sup>1</sup>, Frédéric Berthiaume<sup>1</sup>, France Dumas<sup>3</sup>, François Lépine<sup>2</sup> and Michael Mourez<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup> Canada Research Chair on Bacterial Animal Diseases, Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, St-Hyacinthe, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada. <sup>2</sup> INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boul. des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada. <sup>3</sup> National Research Council, Biotechnology Research Institute, Publication #NRC47555, 6100 Royalmount, Montréal, Québec, H4P 2R2, Canada.

Running title: Glycosylation of the AIDA-I autotransporter

Keywords: Autotransporter, Bacterial Protein Glycosylation, Bacterial adhesin, AIDA-I, *Escherichia coli*

\*Corresponding author. Mailing address : Canada Research Chair on Bacterial Animal Diseases, Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada. Phone: [REDACTED]  
[REDACTED]

<sup>†</sup> Both authors contributed equally to this work

Publié en Décembre 2007 dans Journal of Bacteriology  
Volume 189, Issue 24, pages 8880-9

## ABSTRACT

The *Escherichia coli* Adhesin Involved in Diffuse Adherence (AIDA-I) is one of the few glycosylated proteins found in *Escherichia coli*. Glycosylation is mediated by a specific heptosyltransferase encoded by the *aah* gene but little is known about the role of this modification and the mechanism involved. In this study, we identified several peptides of AIDA-I modified by the addition of heptoses using mass spectrometry and N-terminal sequencing of proteolytic fragments of AIDA-I. One threonine and 15 serine residues were identified as bearing heptoses, thus demonstrating for the first time that AIDA-I is O-glycosylated. We observed that unglycosylated AIDA-I is expressed in smaller amounts than its glycosylated counterpart and shows extensive signs of degradation upon heat-extraction. We also observed that the unglycosylated AIDA-I is more sensitive to proteases and induces an important extracytoplasmic stress. Lastly, as was previously shown, we noted that glycosylation is required for AIDA-I to mediate adhesion to cultured epithelial cells, but purified mature AIDA-I fused to GST was found to bind *in vitro* to cells whether or not it is glycosylated. Taken together, our results suggest that glycosylation is required to ensure a normal conformation of AIDA-I and may be only indirectly necessary for its cell-binding function.

## INTRODUCTION

Protein glycosylation is widespread in prokaryotes, with more than 70 bacterial glycoproteins reported so far (38). Most of these are surface or secreted proteins that affect how bacteria interact with their environment, for instance by influencing cell-cell interactions, surface adhesion or evasion of immune response (34, 38).

In several bacterial species, complex O- and N-glycosylation pathways are encoded by multiple genes clustered in "glycosylation islands" (38, 39). In other cases, highly specific single glycosyltransferases are responsible for the modification of target proteins (2, 20, 35). However, in most cases the exact mechanism of glycosylation remains to be elucidated. How glycosylation exerts its role is also unclear. The addition of sugar moieties

can define (9, 18) or mask (21, 31) interaction sites. Carbohydrates have also been shown to influence the stability (7) and protease sensitivity (14) of individual proteins or macromolecular assembly of several polypeptides (21, 33).

Only a few glycoproteins have been identified in *Escherichia coli*. Amongst them are the Adhesin Involved in Diffuse Adherence (AIDA-I) (2), the TibA adhesion/invasion protein of enterotoxigenic *E. coli* (20) and the auto-aggregation factor antigen 43 (Ag43) (35). Specific glycosyltransferases of AIDA-I and TibA have been identified but, by contrast, no Ag43-specific glycosyltransferases are known and Ag43 glycosylation was performed heterologously with the AIDA-I or TibA-specific enzymes. These glycoproteins present several similarities: all three (i) are secreted as autotransporters, a branch of the type V secretion pathway; (ii) have nearly identical N-terminal 19 amino acids repeats; (iii) are glycosylated by the addition of heptoses mediated by single glycosyltransferases that are functionally interchangeable; and (iv) are versatile virulence factors mediating bacterial auto-aggregation, biofilm formation, as well as adhesion to and invasion of mammalian cells. Because of these similarities, AIDA-I, TibA and Ag43 have been named Self-Associating Autotransporters (SAAT) (17).

AIDA-I was originally identified as a plasmid-encoded protein able to confer a pattern of diffuse adherence on the surface of cultured epithelial cells (1). It is associated with a high percentage of the pathogenic *E. coli* strains involved in neonatal and post-weaning diarrhea in piglets, which cause major economic losses in farms worldwide (10, 11, 22, 26, 27). AIDA-I is synthesized as a 132 kDa pre-proprotein (37). A cleavable N-terminal signal sequence of 49 amino acids allows secretion across the inner membrane via the general *sec* secretion machinery. After crossing the periplasm, the proprotein is inserted in the outer membrane and is cleaved, probably by an autocatalytic mechanism (3, 37). The cleavage separates an N-terminal extracellular fragment, the mature AIDA-I adhesin, from a C-terminal membrane-embedded fragment, AIDAc. Despite the cleavage, the mature adhesin and AIDAc remain strongly associated at the bacterial surface (3, 37).

The autotransporter adhesin heptosyltransferase (Aah) is responsible for the glycosylation of AIDA-I with heptoses. Aah uses precursors recruited from the lipopolysaccharide biosynthetic pathway, but the modified residues were not identified (2). The glycosylation of AIDA-I was shown to be essential for adhesion, since deletion of the

*aah* gene abolishes adherence to cultured epithelial cells, but is dispensable for auto-aggregation and biofilm formation (2, 36). These observations suggested that heptose residues are involved in the interaction between AIDA-I and a receptor on the surface of epithelial cells. There is however no formal proof for this hypothesis and glycosylation could also affect the conformation or the stability of the protein. It was for instance shown that glycosylation was required for the stability of the HMW1 adhesin of *Haemophilus influenzae* and its tethering to the bacterial surface (7).

In the present study, we characterized the glycosylation of AIDA-I. We used mass spectrometry (MS) and N-terminal sequencing of AIDA-I peptides to show that the heptoses are O-linked to the 15 serine and one threonine residues. We also show that glycosylation provides increased resistance to degradation and does not alter the binding efficiency of purified mature AIDA-I. Our results therefore strongly suggest that glycosylation is mainly necessary for the stability of the protein at the cell surface rather than being required to engage a cellular receptor.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and plasmids.** The *Escherichia coli* K12 strain C600 (*thr-1*, *leuB6*, *thi-1*, *lacY1*, *supE44*, *rfdD1*, *fhuA21*, obtained from New England Biolabs) and the pathogenic strain 2787 (1) were used in this study. Plasmid pAg containing the whole *aidA* operon (*aah* and *aidA*) under the control of *ptrc*, a promoter inducible with isopropyl- $\beta$ -D-thiogalacto-pyranoside (IPTG), has been described before (3). pAg allows the expression of glycosylated AIDA-I. Plasmid pAgH, also previously described (3), is derived from pAg and allows expression of glycosylated AIDA-I tagged at the N terminus of the proprotein with 6 histidine amino acids and a glycine (HisG). To construct plasmid pAng, which allows the expression of non-glycosylated AIDA-I, we amplified by PCR the *aidA* gene from the *E. coli* strain 2787 using primers introducing *NcoI* and *XbaI* restriction sites. The resulting fragment was cloned in the vector pTRC99a (Pharmacia Biotech), resulting in plasmid pAng that bears the *aidA* gene alone under the control of the *ptrc* promoter. Plasmid pAngH, allowing the expression of the HisG-tagged AIDA-I, was obtained by introducing an oligonucleotide coding for the HisG tag in the pAng plasmid by site directed

mutagenesis using mutagenic primers, as described previously with pAg (3). To construct the plasmid pAah, we subcloned the *aah* gene with its *ptrc* promoter from the pTRC-Aah plasmid described before into the plasmid pACYC184 (Pharmacia Biotech) using *SphI* and *EcoRI* restriction sites. The pAah plasmid has an origin of replication compatible with those of pAng and pAngH. A plasmid allowing the expression of a fusion between Glutathione-S-transferase (GST) and mature AIDA (encompassing residues 50 to 847) was constructed by PCR amplification and cloning into the pGex-4T-1 vector (Amersham biosciences), as described elsewhere (M.-E. Charbonneau and M. Mourez, submitted for publication). All constructions were verified by restriction mapping and sequencing.

**Bacterial and cell culture growth conditions.** Bacteria containing the different plasmids were grown on Luria-Bertani (LB) agar plates or in liquid LB (rich) or M9 (minimal) media containing 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  of ampicillin, and, in addition, 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  chloramphenicol when the plasmid pAah was used. Bacterial cultures were grown at 30°C, and induced overnight when they reached an  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  of 0.8 with 10  $\mu\text{M}$  of IPTG, unless indicated otherwise. Strain 2787 was grown on I-medium (1) at 37°C. Hep-2 cells (ATCC CCL-23) were grown at 37°C with 5%  $\text{CO}_2$  in Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco) containing 10 mM sodium pyruvate (Sigma), bovine growth serum (Hyclone), 2.5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  of fungizone and 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  of penicillin/streptomycin (Gibco).

**SDS-PAGE and immunoblotting.** Protein-containing samples were diluted in twice concentrated SDS-PAGE loading buffer containing  $\beta$ -mercaptoethanol and denatured by heating at 100°C for 10 minutes. The samples were separated by SDS-PAGE on 10% acrylamide gels. The gels were either stained with Coomassie blue or transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Millipore). Immunodetection was performed with an anti-HisG horseradish peroxidase (HRP)-coupled antibody (Invitrogen) diluted 1:5,000 in blocking buffer (5% skim milk, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Triton X100). Immune complexes were revealed using a 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution for membranes (Sigma). For quantitative comparison the membranes were digitally scanned using the ImageJ software (NIH, USA).

**Whole cell and membrane extract preparations.** Overnight cultures from *E. coli* C600 harboring pTRC99A, pAngH (non-glycosylated AIDA-I) or pAngH+pAah (glycosylated AIDA-I) normalized to the same OD<sub>600nm</sub>. To obtain whole cell extracts, the cultures were normalized, pelleted and bacteria resuspended in Phosphate buffered saline (PBS). To obtain membrane fractions, the cultures were lysed and fractionated as described previously (3).

**Heat extraction and purification of mature or whole AIDA-I.** Heat extraction was performed as described before (3). Briefly, overnight cultures of C600 harboring empty vector, pAngH or pAngH+pAah were normalized and bacteria were harvested, resuspended in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7 and heated at 60°C for 20 minutes. The treated samples were centrifuged for 5 minutes at 12,000 x g to recover the heat-extracts. The HisG-tagged mature AIDA-I was purified from heat extracts and the HisG-tagged whole AIDA-I was purified from solubilized membrane extracts, as described before (3).

**Protease accessibility assay.** Normalized cultures of C600 bearing an empty vector, pAngH or pAngH+pAah were pelleted and resuspended in PBS in the presence or absence of trypsin (Sigma) or proteinase K (Invitrogen), at 0.3 µg.ml<sup>-1</sup> or 3 µg.ml<sup>-1</sup>, final concentrations. After 30 minutes of incubation on ice, the proteases were neutralized by addition of protease inhibitor cocktail (Complete mini; Roche) for 5 minutes. The samples were pelleted, and whole cell extracts obtained as described above.

**Purification of the GST fusion proteins.** One liter of *E. coli* BL21 harboring plasmids pGex-4T-1 or pGex-AIDA with or without pAah were grown until an OD of 0.4 and induced with 10 µM of IPTG for three hours. Bacteria were harvested and resuspended in 40 ml of Tris-buffered saline (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl) containing lysozyme (0.4 mg.ml<sup>-1</sup> final) and EDTA pH 8 (10 mM final) and lysed with a French press and an ultrasonic processor. The soluble fraction was isolated by a 30-minute centrifugation at 16,000 x g. The GST and the GST-AIDA fusion proteins were purified using an ÄKTA purifier system with a 5-ml glutathione sepharose column (Amersham biosciences), according to instructions of the manufacturer. The purity of the purified proteins was confirmed by SDS-PAGE and staining with Coomassie blue. Glycan detection was

performed using the DIG glycan detection kit (Roche), according to the instructions of the manufacturer.

**Cell-ELISA.** Hep-2 cells were grown in 96-wells plates, and fixed 15 minutes with PBS containing 2.5% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde as final concentrations. After one wash with PBS, the plates were blocked with PBS-BSA 3% for 2h at 37°C. Purified proteins (GST, a fusion of GST to mature AIDA-I, or whole AIDA-I) were added to the cells at concentrations between 30 nM and 1µM and incubated overnight at 4°C. After extensive washes with PBS, bound proteins were detected with an anti-GST antibody coupled to HRP, diluted 1:10,000 in PBS (Amersham biosciences), or with a custom polyclonal rabbit anti-AIDA serum (QCB, Hopkinton, MA) and a secondary goat anti-rabbit antibody coupled to HRP. Immune complexes were revealed using a 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution for ELISA (Sigma). Background was subtracted and the absorption intensities were normalized by dividing the intensity in each well by the maximum intensity measured on the plate. Experiments were conducted in duplicate at least twice. Binding curves and dissociation constants were obtained by nonlinear regression fitting to a one binding site hyperbola, using Prism 4.0 (Graphpad software).

**Functional assays.** All assays were performed as described before (3). Briefly, the auto-aggregation assay was performed using overnight cultures of C600 harboring empty vector, pAng or pAg, or cultures of strain 2787. All cultures were normalized, vortexed for 10 seconds and left at 4°C. The OD<sub>600nm</sub> was measured at the top of the culture at the beginning of the assay and after 3h, and pictures were taken after overnight incubation. For biofilm formation, normalized cultures of C600 harboring empty vector, pAng or pAg were grown without agitation for 24 h at 30°C in minimal medium in 96-well PVC plates (Falcon). Biofilms were stained for 15 minutes with crystal violet 1% and the fixed dye was solubilized by addition of ethanol-acetone (80:20). The absorbance of the dye solution was measured at 595nm. For unknown reasons strain 2787 grows extremely slowly in minimal medium and AIDA-I expression is minimal in those conditions, the biofilm assay was therefore not performed with this strain. The adhesion assay was performed with Hep-2 cells, grown in 24-well plates, inoculated with 10<sup>6</sup> cfu per well of C600 harboring empty

vector, pAng or pAg for 3 h. Cells were washed with PBS. Bacteria adhering to cells were recovered with 100  $\mu$ l of Triton X100 1% and plated for numbering. Adherence was calculated by dividing the number of adherent bacteria with the number of bacteria found in the inoculum after three hours of incubation.

**$\beta$ -galactosidase reporter assay.** The  $\beta$ -galactosidase activity of strains SR1458 (30) and SR1364 (25) transformed with an empty vector, plasmid pAng or plasmid pAg was assessed as described previously (25) and expressed in Miller units. Statistical comparisons were performed by variance analysis (ANOVA) using Prism 4.0 (Graphpad software).

**Mass spectrometry.** Glycosylated AIDA-I was purified from heat-extracts, as described above, and run on a SDS-PAGE 10% acrylamide gel. The protein band corresponding to AIDA-I was cut from the gel, destained with water/sodium bicarbonate buffer and acetonitrile. The protein was reduced with DTT and alkylated with iodoacetamide prior to in-gel digestion with trypsin or chymotrypsin. The tryptic peptides were eluted from the gel with acetonitrile containing 0.1% of trifluoroacetic acid. The tryptic peptides were then separated on an Agilent Nanopump using a C18 ZORBAX trap and a SB-C18 ZORBAX 300 reversed phase column (150 mm x 75  $\mu$ m, 3.5  $\mu$ m particle size) (Agilent Technologies, Inc.). All mass spectra were recorded on a hybrid linear ion trap-triple quadrupole mass spectrometer (Q-Trap, AB Applied Biosystems, MDS SCIEX Instruments, California, USA) equipped with a nano-electrospray ionization source. The accumulation of MS-MS data was performed with the Analyst Software, version 1.4 (AB Applied Biosystems / MDS SCIEX Instruments, California, USA). MASCOT (Matrix Science, London, UK) was used to create peak lists from MS and MS/MS raw data.

**N-terminal sequencing.** The mature AIDA-I protein was isolated from a SDS-gel stained with Coomassie Blue as described above. The band corresponding to mature AIDA-I was cut and transferred in a 1.5 ml screw cap microfuge tube, reduced, alkylated and digested with trypsin (Promega sequencing grade) as described previously (12). The peptides were extracted with 60% acetonitrile, 1% trifluoroacetic acid at 60°C and separated by reverse-phase HPLC on a Vydac microbore C18 column (1mmIDx50mm) using an Applied



Biosystems 130A Separation System. The peptides were detected by absorbance at 220 nm and fractions were collected manually. Each fraction was applied to a precycled glass fiber filter treated with trifluoroacetic acid and coated with Biobrene Plus (0.5 mg of polybrene and 0.03 mg of NaCl). The fractions were subjected to automatic Edman degradation on a model 494 CLC Procise sequencer using a general protocol (15). The phenylthiohydantoin amino acid derivatives were analyzed on-line using a capillary separation system (Applied Biosystems model 140 D) and an ultraviolet detector (Applied Biosystems model 785A) set at 269 nm.

## RESULTS

**AIDA-I is O-glycosylated.** We purified glycosylated mature AIDA-I (corresponding to amino acids 50 to 847 in the pre-proprotein) by affinity chromatography from heat-extracts of the *E. coli* strain C600 expressing a histidine-tagged protein, as described before (3). After SDS-PAGE, the band corresponding to purified mature glycosylated AIDA-I was in-gel digested by trypsin or chymotrypsin and the resulting peptides were submitted to tandem MS/MS with collision induced dissociation (CID). Some of the parent ions were identified as AIDA-I peptides presenting between 1 and 4 incremental additions of 192 Da compared with the theoretical mass of the unsubstituted peptides. This 192 Da addition is consistent with the grafting of a heptose molecule and thus we concluded that these peptides were glycosylated. In most cases we could compare the MS spectra of modified and unmodified peptides. With this MS approach, nine peptides were found to be glycosylated with 1 to 4 heptose residues whereas five peptides were found not to be glycosylated (Fig. 1 and Table 1). In two instances, there was extensive overlap between two glycosylated peptides, therefore we in fact identified seven different glycosylated peptides using MS. We noted that the glycosylation is heterogeneous, as five out of the nine peptides were found without carbohydrate or with various amounts of heptose residues. When multiple glycosylations were observed, it was not possible to determine if it was the result of multiple sites being glycosylated or a single site being glycosylated by multiple heptose residues. Similarly, we could not ascertain the conformation of the grafted heptose. The glycosylated peptides are found at several different positions in mature AIDA-I, but

exclusively in a region containing 35 imperfect repeats of a 19 amino acids sequence (Fig. 1). In most cases, CID of peptides does not allow the identification of the amino acid residue bearing the carbohydrate since the carbohydrate-polypeptide bond is usually preferentially cleaved compared to the peptide bond. However, in one instance, the CID spectrum of a chymotryptic peptide showed peptide fragment ions still bearing the carbohydrate moiety (Fig. S1). Analysis of these fragment ions revealed that the threonine at position 154 was modified with one heptose.

In a parallel approach, purified tryptic peptides of mature AIDA-I were sequenced by N-terminal Edman degradation (ED). Six peptides had the expected sequences of AIDA-I peptides, with perfect signal for each residue of the peptides. However, for 8 other peptides, no signal was observed at positions corresponding to some of the serine residues they comprised (Table 1). This suggested that these residues had been modified and thus could not be identified during the degradation cycle. Five of the eight peptides identified as potentially modified corresponded to peptides identified by MS as glycosylated, suggesting that all the peptides identified in this manner by ED were indeed glycosylated. The signal corresponding to the serine residues at positions 577 and 578 was sharply reduced but not absent, suggesting that these residues are heterogeneously modified. This result is in agreement with the heterogeneity observed by MS. Also in agreement with the previous results, the modified peptides identified by ED are located in the 19-amino acids repeats.

Together, our approaches revealed ten different glycosylated peptides and 15 serine and one threonine residues were found to be modified. Adding the maximum number of heptoses bound to each of the peptides identified by MS and the number of modified serine residues in the peptides identified solely by ED, we estimate that up to a total of 19 heptoses could be present on AIDA-I (Table 1). All attempts to obtain the mass of the whole mature AIDA-I by MS were unsuccessful. This is most likely due to the high molecular weight of the protein and the heterogeneity conferred by the glycosylation.

**Glycosylation influences the abundance of AIDA-I.** We compared the ability of bacteria expressing the glycosylated or the non-glycosylated forms of AIDA-I to auto-aggregate, form a biofilm or adhere onto cultured epithelial cells. Glycosylation seems dispensable for auto-aggregation and biofilm formation, but the non-glycosylated form of AIDA-I cannot

mediate adhesion to Hep-2 cells (Fig. 2), as previously observed (2, 36). This observation could be due to the fact that unglycosylated AIDA-I is unable to mediate adhesion, that there is not enough unglycosylated AIDA-I present at the bacterial surface to mediate adhesion, or that the conformation of unglycosylated AIDA-I is abnormal and cannot mediate adhesion.

To distinguish between these possibilities, we compared the amounts of the glycosylated and non-glycosylated forms of AIDA-I present at the cell surface. As previously suggested, we observed that antibodies directed against the glycosylated mature adhesin do not efficiently recognize non-glycosylated AIDA-I (2), hindering efforts to compare expression levels. To remedy this situation, we used a plasmid allowing the expression of non-glycosylated AIDA-I with a HisG-tag localized at the N terminus of the mature adhesin. In order to express the glycosylated protein, we co-transformed bacteria with this plasmid and a compatible plasmid containing the *aah* gene. With those constructs, we could prepare whole cell extracts of normalized overnight cultures expressing glycosylated or unglycosylated forms of the histidine-tagged protein. Proteins of 100 and 132 kDa for glycosylated AIDA-I and 80 and 120 kDa for non-glycosylated AIDA-I, were detected with an anti-HisG monoclonal antibody, consistent with the mature protein and the proprotein precursor forms of AIDA-I (Fig. 3A). We observed that there was dramatically less of the non-glycosylated form of AIDA-I compared to the glycosylated form. We observed the same decrease with untagged versions of AIDA-I by separating membrane fractions of bacteria expressing glycosylated or unglycosylated forms of AIDA-I and staining with Coomassie blue (data not shown).

Altered expression levels might be due to the fact that glycosylated AIDA-I is expressed in bacteria bearing two plasmids, whereas unglycosylated AIDA-I is expressed in bacteria bearing only one plasmid. To eliminate this possibility, we expressed unglycosylated AIDA-I in bacteria bearing one plasmid by engineering a point mutation in the *aah* gene, resulting in the expression of an inactive glycosyltransferase, as previously observed (24). As above, we observed dramatically less non-glycosylated AIDA-I compared to its glycosylated form in heat-extracts (data not shown).

**Glycosylation confers partial resistance to proteases.** We observed that when the mature unglycosylated and glycosylated adhesins were heat-extracted, the glycosylated polypeptide runs as a clear band of approximately 100 kDa, whereas the non-glycosylated protein appears as a less intense band of approximately 80 kDa, along with a degradation profile absent from extracts of bacteria expressing glycosylated AIDA-I (Fig. 3B). Additionally, the heat-extracted unglycosylated polypeptides were undetectable with antibodies directed against the HisG tag (data not shown). This result suggests that unglycosylated AIDA-I is more sensitive to proteolytic degradation. To determine if and where unglycosylated AIDA-I is degraded *in vivo*, we compared the expression levels of glycosylated and unglycosylated AIDA-I in a *degP*<sup>-</sup> background, but there was no visible effect of the presence of the periplasmic protease DegP on the relative amounts of unglycosylated or glycosylated AIDA-I (Fig. S2). We also tested if the outer membrane protease OmpT could have an influence on the levels of AIDA-I but it also seemed not to have an effect (Fig. S2). Since AIDA-I is auto-proteolytically maturing itself (3, 37), it could be that unglycosylated AIDA-I is responsible for its own degradation when it is in an abnormal conformation.

To confirm the hypothesis that unglycosylated AIDA-I is more sensitive to proteolytic degradation, we performed a limited digestion of bacterial surface proteins using trypsin, a protease cleaving after lysine and arginine residues. We observed that the unglycosylated AIDA-I is degraded at the lowest concentration of trypsin whereas the glycosylated protein is resistant at all concentrations tested (Fig. 4).

To ensure that this result is not specific for trypsin, which could simply indicate that most trypsin cleavage sites are protected by the heptoses, we performed the same assay with various concentrations of proteinase K, a protease cleaving after hydrophobic residues. Consistent with our previous results, we observed that the unglycosylated protein is completely degraded at the lowest concentration of proteinase K used (Fig. 4). To further exclude artifacts that might be due to the use of histidine-tagged proteins, we performed the same assays with untagged proteins, revealed by Coomassie blue staining. As above, in these experiments, the unglycosylated protein was completely degraded by 0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  of proteinase K whereas the glycosylated protein was resistant (data not shown).

**The unglycosylated form of AIDA-I induces an extracytoplasmic stress.** The sensitivity of unglycosylated AIDA-I to proteolytic degradation suggests that it is in an abnormal conformation. Polypeptides with abnormal conformation are usually sensed by specialized stress sensing systems, which in turn induce the production of folding catalysts and proteolytic enzymes to alleviate the problem (23). We therefore tested if unglycosylated AIDA-I can induce a stress response. We used two reporter strains: strain SR1458, which bears the  $\beta$ -galactosidase *lacZ* gene under the control of the *degP* promoter (30) and strain SR1364, a strain bearing the *lacZ* gene under the control of the *rpoH* promoter (25). The former is induced by an extracytoplasmic stress and the latter by a cytoplasmic stress. The strains were transformed with the plasmids bearing the *aah-aida* operon, the *aida* gene alone or a control empty plasmid (Fig. 5). We observed that glycosylated and unglycosylated AIDA-I did not induce any cytoplasmic stress (Fig. 5A). The  $\beta$ -galactosidase activity indicated however that unglycosylated AIDA-I caused a dramatic extracytoplasmic stress response (Fig. 5B). It is important to note that SR1458 is only a reporter strain and the induction of the *degP* promoter does not prove that unglycosylated AIDA-I is degraded by the periplasmic DegP protease. Indeed, as described above, we have observed that DegP does not seem to be involved in the degradation of unglycosylated AIDA-I. It is also important to note that these results were obtained in a context of overexpression and we do not know if a similar stress response would be induced in an *aah* mutant of the wild-type strain 2787. Nevertheless, the stress response induction upon overexpression are consistent with the enhanced sensitivity to proteolytic degradation and suggests that unglycosylated AIDA-I adopts an abnormal conformation.

**Glycosylation is not required for the binding of a domain of AIDA-I to cultured epithelial cells.** We decided to test directly the role of glycosylation on the binding of AIDA-I to epithelial cells by comparing the binding of glycosylated and unglycosylated AIDA-I. Whereas we can purify whole glycosylated AIDA-I by solubilizing outer membrane extracts (3), we are unable to purify unglycosylated AIDA-I because it is unstable and degraded. We therefore purified a fusion of mature AIDA-I (corresponding to amino acids 50 to 847) to GST, unglycosylated or glycosylated by co-expression in the presence of Aah. The presence or absence of glycosylation of the GST-AIDA was

ascertained using a glycan detection kit (data not shown). Glycosylated GST-AIDA bound specifically to cultured epithelial cells in a saturable manner (Fig. 6). The equilibrium dissociation constant was calculated to be approximately 45 nM. By comparison, we observed that whole glycosylated AIDA-I could bind to cells with a dissociation constant of 4 nM, in close agreement with a previous estimate (19). In a structure-function study we have observed that the N terminus of AIDA-I harbors a cell-binding domain (M.-E. Charbonneau and M. Mourez, submitted for publication). In this context, when the GST is fused to the N terminus of mature AIDA-I it is likely that it will sterically hinder the interaction mediated by the N-terminal cell binding domain. This might explain the difference between the dissociation constant of our GST-fusion protein and that of wild-type AIDA-I. The fusion of mature AIDA to GST, purified in the absence of Aah (and therefore unglycosylated), was also able to bind to cultured epithelial cells in a manner similar to the glycosylated fusion, with an equilibrium dissociation constant calculated at 39 nM. This result suggests that the carbohydrates moieties are not directly participating in the binding to a cellular receptor.

## DISCUSSION

In the present study, we identified ten peptides of AIDA-I bearing heptose residues and our results suggest that at least up to 19 molecules can be added onto AIDA-I, in perfect agreement with a previous evaluation (2). Recently, five different peptides were found to contain heptoses in Ag43 (35). Strikingly, in AIDA-I as well as in Ag43, glycosylation appears to be heterogeneous, i.e. most of the glycosylated peptides could be identified unglycosylated and/or with various numbers of heptoses. This fact was not initially appreciated when AIDA-I was shown to be glycosylated (2). The coexistence of modified and unmodified forms of bacterial glycoproteins has previously been reported (31, 41). In some instances it has been shown that this heterogeneity influences the immunogenicity of the protein (31), but the role, if any, of this heterogeneity in AIDA-I is unclear. The mechanism that results in such heterogeneity is also unknown.

The glycosylated peptides were identified in a region of the protein composed of imperfect 19-amino acids repeats. The same was true with Ag43 (35). It was expected that

the specificity of the heptosyltransferases acting on these proteins is similar since the SAAT glycosyltransferases are functionally exchangeable (24, 35). The role of these repeats is unknown but it has been postulated that they are involved in the adhesion mediated by these proteins, since it is often observed that repeated motifs are involved in adhesion. Alternatively, the repeated motifs could provide the backbone for the expected  $\beta$ -helical structure of the proteins, itself a repetitive structure.

In addition to what was reported with Ag43, we could unambiguously show that AIDA-I is modified on serine and threonine residues, proving that Aah mediates O-glycosylation. This was expected, based on sequence similarities of Aah with the known *E. coli* heptosyltransferases involved in LPS biosynthesis (2). Indeed, these enzymes mediate the transfer of heptose precursors onto the hydroxyl group of LPS biosynthetic intermediates (8). We did not identify any glycosylation consensus sequence but it should be noted that neither in eukaryotes, nor in prokaryotes, has a consensus sequence for O-glycosylation been established (29, 34, 38, 40). Consequently, the specificity of the Aah glycosyltransferases remains elusive: How does Aah recognize its SAAT substrates and why does it transfer heptoses in the 19-amino acids imperfect repeats? It is possible that this region adopts a specific structure that is recognized by the enzyme but this would contradict the fact that glycosylation is thought to occur in the cytoplasm, prior to transport across the inner membrane via the *sec* machinery, which requires exported polypeptides to be unfolded. Alternatively, the enzyme might recognize a part of the repeated consensus sequence itself. Specificity of O-glycosylation towards amino acid sequences has been proposed before, as in the case of proline-rich domains of glycoproteins from *Mycobacterium tuberculosis* (4) and *Clostridium thermocellum* (6).

Important biological functions can be affected by glycosylation: maintenance of protein conformation, resistance against proteases, or modulation of intermolecular interactions (2, 38). Our results confirmed that glycosylation of AIDA-I is essential for adhesion (2), but not for auto-aggregation or biofilm formation (36). Based on these results, it was suggested that the glycans could be involved in receptor recognition. Carbohydrates from glycoproteins have indeed been shown in some cases to mediate the interaction with the host cell receptor, as for the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* (18). All our observations, however, suggest that glycosylation is required for AIDA-I to

adopt a normal conformation, which in turn would be responsible for the lack of adhesion. Indeed, we observed that unglycosylated AIDA-I is less expressed and more sensitive to degradation but that purified mature AIDA-I could specifically bind to cultured epithelial cells even when unglycosylated. There are other examples of bacterial proteins being protected against degradation by glycosylation (14), and the conformation and protease sensitivities of polypeptides have often been shown to be altered by glycosylation (5, 16). The *H. influenzae* HMW1 adhesin, for instance, is stabilized by glycosylation (7). Unglycosylated HMW1 was prematurely degraded in the cytoplasm and periplasm and its tethering to the bacterial surface was compromised. Interestingly, HMW1 and SAAT are both secreted by the type V secretion pathway (13), raising the possibility that glycosylation might also exert its role in the context of the secretion of some substrates of this pathway. Such a role could be to prevent premature periplasmic folding, since it was shown that it can be incompatible with secretion (32), or to promote extracellular folding, a process which has been proposed to drive secretion (28).

Two observations seem to be at odds with the notion that unglycosylated AIDA-I is in an abnormal conformation. First, Ag43 is usually not glycosylated and there is no indication that it is unstable or that glycosylation increases its stability. Despite their similarities, Ag43 and AIDA-I might have subtle structural differences that make glycosylation more important for AIDA-I, and it should be noted that the latter seems to be more glycosylated than Ag43. Second, it is surprising that glycosylation is dispensable for auto-aggregation. One possible explanation is that the domains of the protein involved in auto-aggregation do not require the folding and/or the stability provided by glycosylation. The unglycosylated protein could also be degraded into an intermediate that still bears an auto-aggregation domain.

Many uncertainties remain about the glycosylation of AIDA-I. The mechanism of glycosylation itself needs to be investigated in order to understand the specificity of Aah towards its substrates, and more precisely towards specific sites in the latter. How glycosylation affects the conformation of AIDA-I and why glycosylation is not necessary for auto-aggregation is also unclear. Further characterization of the glycosylation of AIDA-I, as well as that of other SAAT, is warranted to tackle these puzzling questions.



## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by financial contributions from the Groupe de Recherche et d'Études 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). M.-E. C. is supported by a graduate fellowship from the Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies du Québec (FQRNT #114663).

**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. **Benz, I., and M. A. Schmidt.** 2001. Glycosylation with heptose residues mediated by the aah gene product is essential for adherence of the AIDA-I adhesin. *Mol Microbiol* **40**:1403-13.
3. **Charbonneau, M. E., F. Berthiaume, and M. Mourez.** 2006. Proteolytic processing is not essential for multiple functions of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I). *J Bacteriol* **188**:8504-12.
4. **Dobos, K. M., K. H. Khoo, K. M. Swiderek, P. J. Brennan, and J. T. Belisle.** 1996. Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **178**:2498-506.
5. **Fares, F.** 2006. The role of O-linked and N-linked oligosaccharides on the structure-function of glycoprotein hormones: development of agonists and antagonists. *Biochim Biophys Acta* **1760**:560-7.
6. **Gerwig, G. J., J. P. Kamerling, J. F. Vliegthart, E. Morag, R. Lamed, and E. A. Bayer.** 1993. The nature of the carbohydrate-peptide linkage region in glycoproteins from the cellulosomes of *Clostridium thermocellum* and *Bacteroides cellulosolvens*. *J Biol Chem* **268**:26956-60.
7. **Grass, S., A. Z. Buscher, W. E. Swords, M. A. Apicella, S. J. Barenkamp, N. Ozchlewski, and J. W. St Geme, 3rd.** 2003. The *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin is glycosylated in a process that requires HMW1C and phosphoglucomutase, an enzyme involved in lipooligosaccharide biosynthesis. *Mol Microbiol* **48**:737-51.
8. **Grizot, S., M. Salem, V. Vongsouthi, L. Durand, F. Moreau, H. Dohi, S. Vincent, S. Escaich, and A. Ducruix.** 2006. Structure of the *Escherichia coli* heptosyltransferase WaaC: binary complexes with ADP and ADP-2-deoxy-2-fluoro heptose. *J Mol Biol* **363**:383-94.

9. **Guerry, P., C. P. Ewing, M. Schirm, M. Lorenzo, J. Kelly, D. Pattarini, G. Majam, P. Thibault, and S. Logan.** 2006. Changes in flagellin glycosylation affect *Campylobacter* autoagglutination and virulence. *Mol Microbiol* **60**:299-311.
10. **Ha, S. K., C. Choi, and C. Chae.** 2003. Prevalence of a gene encoding adhesin involved in diffuse adherence among *Escherichia coli* isolates in pigs with postweaning diarrhea or edema disease. *J Vet Diagn Invest* **15**:378-81.
11. **Ha, S. K., C. Choi, K. Jung, J. Kim, D. U. Han, Y. Ha, S. D. Lee, S. H. Kim, and C. Chae.** 2004. Genotypic prevalence of the adhesin involved in diffuse adherence in *Escherichia coli* isolates in pre-weaned pigs with diarrhoea in Korea. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **51**:166-8.
12. **Hellman, U., C. Wernstedt, J. Genez, and C. H. Heldin.** 1995. Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal Biochem* **224**:451-5.
13. **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.
14. **Herrmann, J. L., P. O'Gaora, A. Gallagher, J. E. Thole, and D. B. Young.** 1996. Bacterial glycoproteins: a link between glycosylation and proteolytic cleavage of a 19 kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *Embo J* **15**:3547-54.
15. **Hewick, R. M., M. W. Hunkapiller, L. E. Hood, and W. J. Dreyer.** 1981. A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J Biol Chem* **256**:7990-7.
16. **Imperiali, B., and S. E. O'Connor.** 1999. Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Curr Opin Chem Biol* **3**:643-9.
17. **Klemm, P., R. M. Vejborg, and O. Sherlock.** 2006. Self-associating autotransporters, SAATs: functional and structural similarities. *Int J Med Microbiol* **296**:187-95.
18. **Kuo, C., N. Takahashi, A. F. Swanson, Y. Ozeki, and S. Hakomori.** 1996. An N-linked high-mannose type oligosaccharide, expressed at the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*, mediates attachment and infectivity of the microorganism to HeLa cells. *J Clin Invest* **98**:2813-8.

19. **Laarmann, S., and M. A. Schmidt.** 2003. The *Escherichia coli* AIDA autotransporter adhesin recognizes an integral membrane glycoprotein as receptor. *Microbiology* **149**:1871-82.
20. **Lindenthal, C., and E. A. Elsinghorst.** 1999. Identification of a glycoprotein produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **67**:4084-91.
21. **Logan, S. M., J. F. Kelly, P. Thibault, C. P. Ewing, and P. Guerry.** 2002. Structural heterogeneity of carbohydrate modifications affects serospecificity of *Campylobacter* flagellins. *Mol Microbiol* **46**:587-97.
22. **Mainil, J. G., E. Jacquemin, P. Pohl, A. Kaeckenbeeck, and I. Benz.** 2002. DNA sequences coding for the F18 fimbriae and AIDA adhesin are localised on the same plasmid in *Escherichia coli* isolates from piglets. *Vet Microbiol* **86**:303-11.
23. **Mogensen, J. E., and D. E. Otzen.** 2005. Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. *Mol Microbiol* **57**:326-46.
24. **Moormann, C., I. Benz, and M. A. Schmidt.** 2002. Functional substitution of the TibC protein of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains for the autotransporter adhesin heptosyltransferase of the AIDA system. *Infect Immun* **70**:2264-70.
25. **Mourez, M., S. Skouloubris, J. M. Betton, and E. Dassa.** 1997. Heat shock induction by a misassembled cytoplasmic membrane protein complex in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **26**:821-31.
26. **Ngeleka, M., J. Pritchard, G. Appleyard, D. M. Middleton, and J. M. Fairbrother.** 2003. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J Vet Diagn Invest* **15**:242-52.
27. **Niewerth, U., A. Frey, T. Voss, C. Le Bouguenec, G. Baljer, S. Franke, and M. A. Schmidt.** 2001. The AIDA autotransporter system is associated with F18 and stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**:143-9.
28. **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.

29. **Peter-Katalinic, J.** 2005. Methods in enzymology: O-glycosylation of proteins. *Methods Enzymol* **405**:139-71.
30. **Raina, S., D. Missiakas, and C. Georgopoulos.** 1995. The *rpoE* gene encoding the sigma E (sigma 24) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *Embo J* **14**:1043-55.
31. **Romain, F., C. Horn, P. Pescher, A. Namane, M. Riviere, G. Puzo, O. Barzu, and G. Marchal.** 1999. Deglycosylation of the 45/47-kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis* decreases its capacity to elicit in vivo or in vitro cellular immune responses. *Infect Immun* **67**:5567-72.
32. **Rutherford, N., M. E. Charbonneau, F. Berthiaume, J. M. Betton, and M. Mourez.** 2006. The periplasmic folding of a cysteineless autotransporter passenger domain interferes with its outer membrane translocation. *J Bacteriol* **188**:4111-6.
33. **Schirm, M., E. C. Soo, A. J. Aubry, J. Austin, P. Thibault, and S. M. Logan.** 2003. Structural, genetic and functional characterization of the flagellin glycosylation process in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **48**:1579-92.
34. **Schmidt, M. A., L. W. Riley, and I. Benz.** 2003. Sweet new world: glycoproteins in bacterial pathogens. *Trends Microbiol* **11**:554-61.
35. **Sherlock, O., U. Dobrindt, J. B. Jensen, R. Munk Vejborg, and P. Klemm.** 2006. Glycosylation of the self-recognizing *Escherichia coli* Ag43 autotransporter protein. *J Bacteriol* **188**:1798-807.
36. **Sherlock, O., M. A. Schembri, A. Reisner, and P. Klemm.** 2004. Novel Roles for the AIDA Adhesin from Diarrheagenic *Escherichia coli*: Cell Aggregation and Biofilm Formation. *J Bacteriol* **186**:8058-65.
37. **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.
38. **Szymanski, C. M., and B. W. Wren.** 2005. Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. *Nat Rev Microbiol* **3**:225-37.
39. **Szymanski, C. M., R. Yao, C. P. Ewing, T. J. Trust, and P. Guerry.** 1999. Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* **32**:1022-30.

40. **Van den Steen, P., P. M. Rudd, R. A. Dwek, and G. Opdenakker.** 1998. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **33**:151-208.
41. **Young, N. M., J. R. Brisson, J. Kelly, D. C. Watson, L. Tessier, P. H. Lanthier, H. C. Jarrell, N. Cadotte, F. St Michael, E. Aberg, and C. M. Szymanski.** 2002. Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium, *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem* **277**:42530-9.

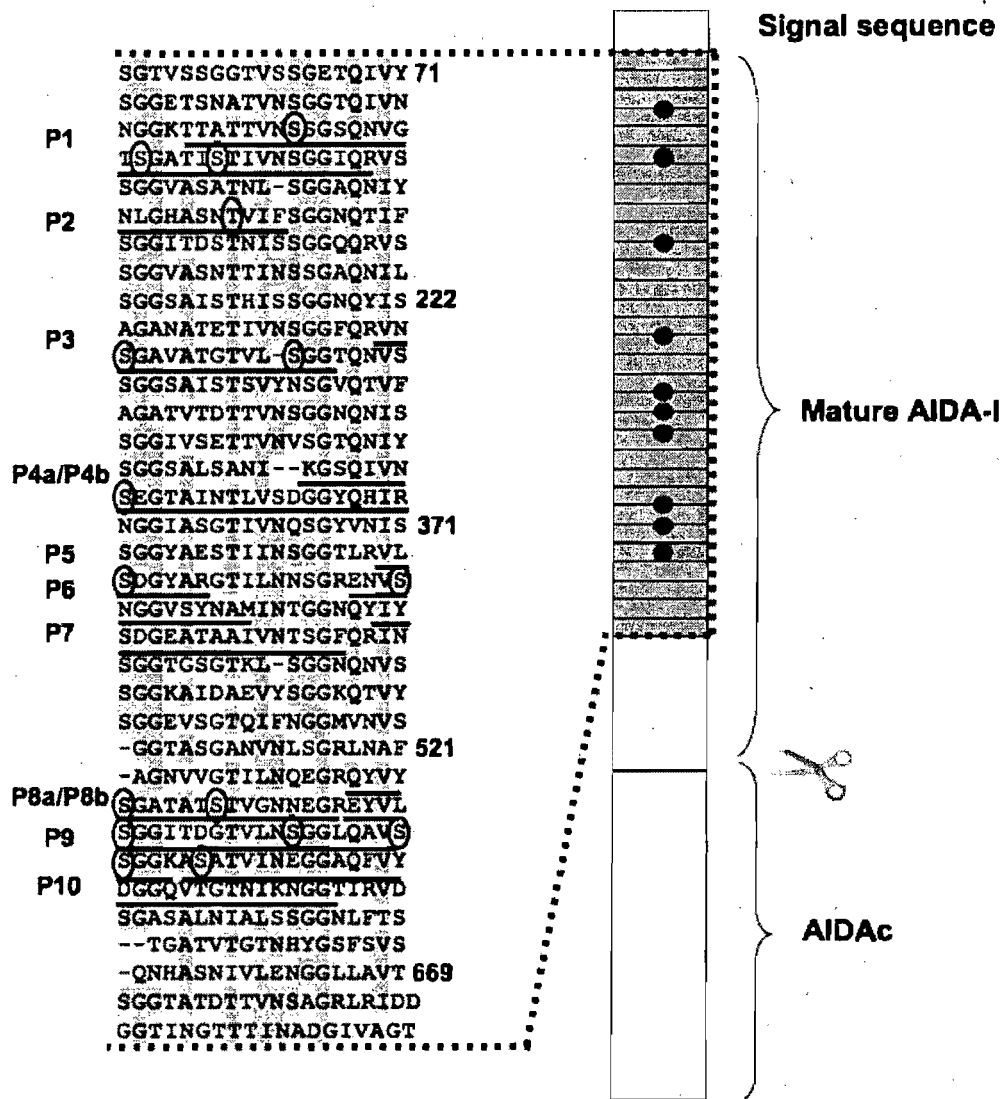
Peptide		Number of heptoses	Means of identification
Glycosylated peptides			
P1	K <sup>†</sup> T <sub>95</sub> TATTVN <u>SS</u> SGSQNVGT <u>SG</u> ATIS <u>T</u> IVNSGGIQR <sub>126</sub> <sup>†</sup>	2,3 or 4	MS, ED
P2	Y <sup>†</sup> N <sub>147</sub> LGHASNT <u>T</u> VIF <sub>157</sub> <sup>†</sup>	0 or 1	MS
P3	R <sup>†</sup> V <sub>240</sub> N <u>SG</u> AVATGTVL <u>SGG</u> -	ND	ED
P4a	K <sup>†</sup> G <sub>328</sub> SQIVN <u>SE</u> GTAINTLVSDGGYQHIR <sub>352</sub> <sup>†</sup>	0,1 or 2	MS, ED
P4b	L <sup>†</sup> S <sub>323</sub> ANIKGSQIVN <u>SE</u> GTAINTLVSDGGY <sub>348</sub> <sup>†</sup>	2	MS
P5	R <sup>†</sup> V <sub>389</sub> L <u>SD</u> GYAR <sub>396</sub> <sup>†</sup>	ND	ED
P6	R <sup>†</sup> E <sub>406</sub> NV <u>SN</u> GGVSYNAM-	ND	ED
P7	Y <sup>†</sup> I <sub>427</sub> YSDGEATAAIVNTSGF <sub>443</sub> <sup>†</sup>	1	MS
P8a	R <sup>†</sup> Q <sub>536</sub> YVY <u>SG</u> ATAT <u>ST</u> VGNNEGR <sub>554</sub> <sup>†</sup>	0, 1 or 2	MS, ED
P8b	Y <sup>†</sup> V <sub>538</sub> YSGATATSTVGNNEGREGY <sub>556</sub> <sup>†</sup>	1,2	MS
P9	R <sup>†</sup> E <sub>555</sub> YVL <u>SG</u> GITDGTVLN <u>SG</u> GLQAV <u>SS</u> GGK <sub>581</sub> <sup>†</sup>	4	MS, ED
P10	K <sup>†</sup> A <sub>582</sub> <u>S</u> ATVINEGGAQFVYDGGQVTGTNIK <sub>607</sub> <sup>†</sup>	0 or 1	MS, ED
Unglycosylated peptides			
	Y <sup>†</sup> Q <sub>349</sub> HIRNGGIASGTIVNQSGY <sub>367</sub> <sup>†</sup>	-	MS
	R <sup>†</sup> G <sub>397</sub> TILNNSGR <sub>405</sub> <sup>†</sup>	-	ED
	K <sup>†</sup> A <sub>470</sub> IDADEVYSGGK <sub>480</sub> <sup>†</sup>	-	ED
	Y <sup>†</sup> S <sub>485</sub> GGEVSGTQIF <sub>495</sub> <sup>†</sup>	-	MS
	R <sup>†</sup> L <sub>518</sub> NAFAGNVVGTILNQEGR <sub>535</sub> <sup>†</sup>	-	MS, ED
	K <sup>†</sup> D <sub>739</sub> NTGIMTYAGTLTQAQGVNK <sub>759</sub> <sup>†</sup>	-	MS, ED
	K <sup>†</sup> L <sub>824</sub> LLSATVNGSLVNNK <sub>837</sub> <sup>†</sup>	-	MS, ED
	K <sup>†</sup> N <sub>838</sub> NIILNPTK <sub>845</sub> <sup>†</sup>	-	ED

**Table 1: Glycosylation of peptides identified in AIDA-I.**

Glycosylated mature AIDA-I (corresponding to amino acids 50 to 847 in the pre-protein) was processed by digestion with trypsin or chymotrypsin and the resulting

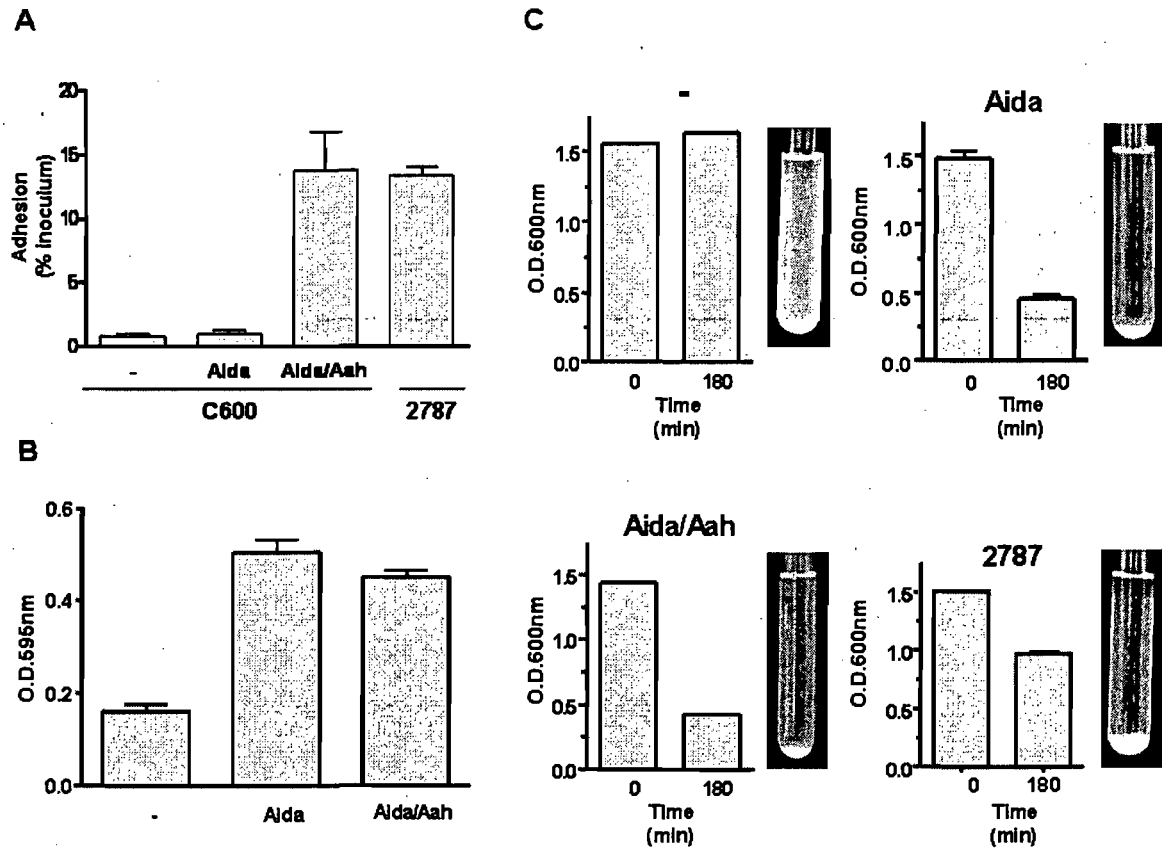
peptides identified by MS or ED. In MS, glycosylation of a peptide was identified as an excess of mass corresponding to a multiple of 192 Da (the mass of one heptose residue). In ED, glycosylated residues are identified when a signal corresponding to the modified residue is lacking or reduced during a degradation cycle. Two residues (S577, S578) showed only an 80% reduction in signal, suggesting that these residues were not modified in all peptides. The sequences of peptides P1, P3 and P6 could not be completely obtained by ED. Numbering corresponds to the position of the amino acids in the pre-proprotein. MS yielded the number of heptose molecules bound per peptide. However, except in one case (T154), MS did not permit to identify the modified residues. Using ED, the number of heptoses cannot be determined (not determined, ND) but several residues (S102, S111, S116, S242, S252, S334, S391, S409, S540, S546, S559, S570, S577, S578 and S583) were identified as modified.





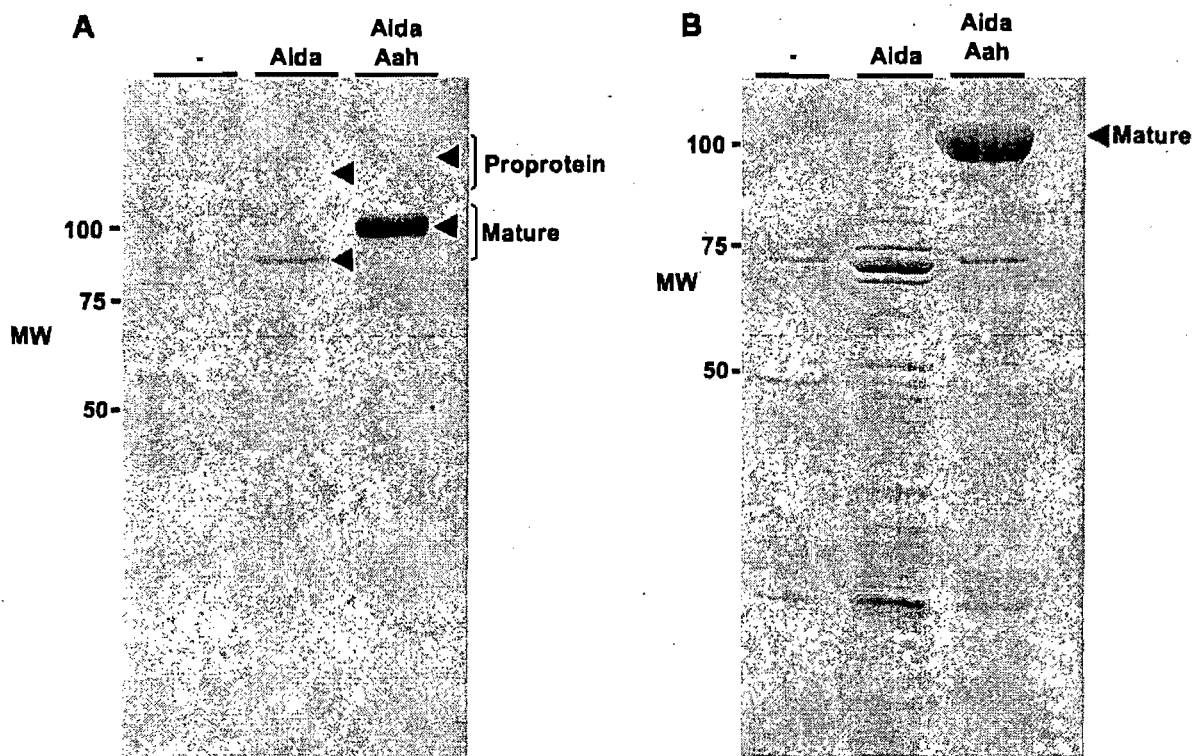
**Fig. 1: Localization of heptose modifications.**

Glycosylated peptides identified in this study are indicated on a schematic representation of the pre-protein showing the N-terminal signal sequence required for inner membrane translocation, a region encompassing 35 imperfect 19-amino acids repeats (gray boxes) and the autoproteolytic cleavage site separating mature AIDA-I from the membrane-embedded AIDAc. The imperfectly repeated sequence is highlighted. Numbering corresponds to the position of the amino acids in the pre-proprotein. In several peptides, a heptose residue could be identified on threonine or serine residues. These residues are circled in the sequence.



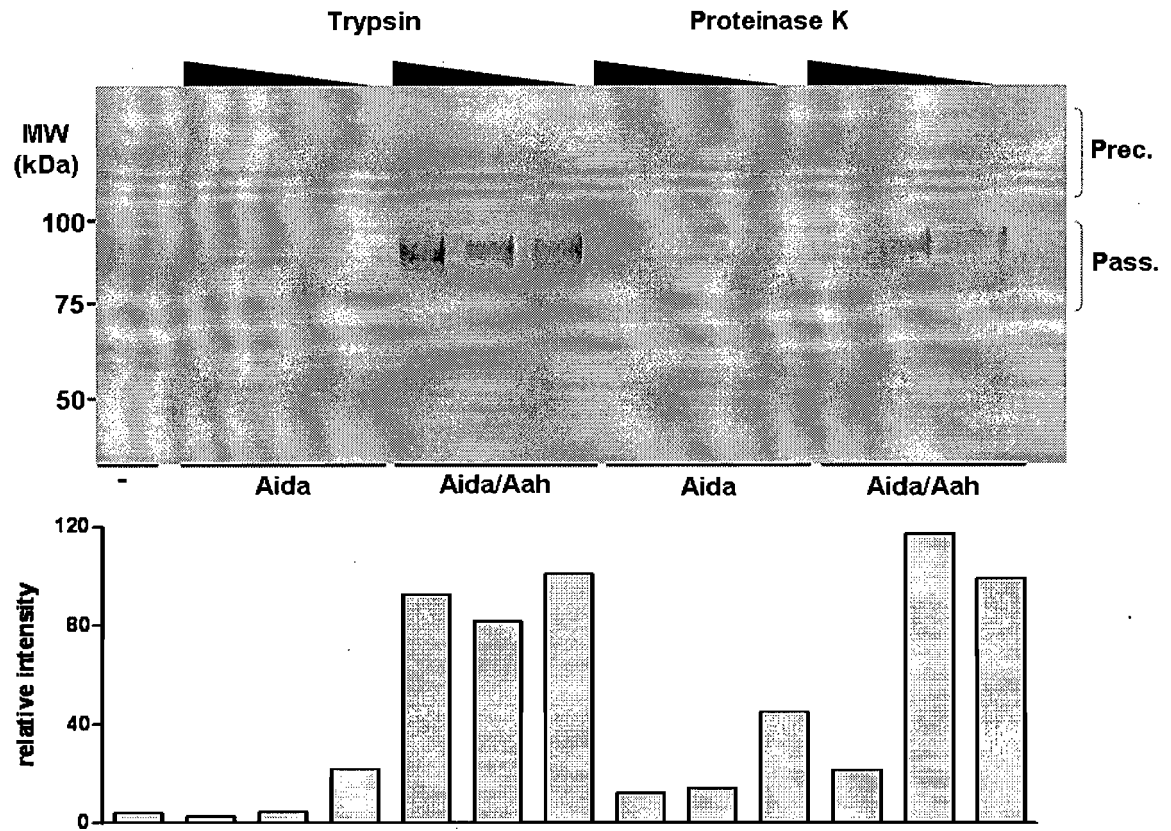
**Fig. 2: Effect of glycosylation on the function of AIDA-I.**

*A.* Adhesion assay. Bacteria bearing an empty vector (-), or expressing unglycosylated AIDA-I (Aida) or glycosylated AIDA-I (Aida/Aah) were inoculated onto monolayer of confluent Hep-2 cells and adhering bacteria were plated, counted. The *E. coli* strain 2787, from which AIDA-I was originally identified (1), was used as a control. The adhesion is calculated by dividing the cfu of adhering bacteria recovered by the cfu found in the inoculum after 3 hours of incubation. *B.* Biofilm formation. The same strains were grown in minimal medium for 24 hours at 30°C in microtiter plates and biofilms were stained with crystal violet. *C.* Auto-aggregation assay. Cultures of the same strains were left standing at 4°C and the turbidity at the top of the culture was measured. Pictures of the culture tubes were taken after an overnight incubation at 4°C. Experiments were performed at least three times in duplicate (*A, C*) or quadruplicate (*B*) and the values represent means  $\pm$  SEM.



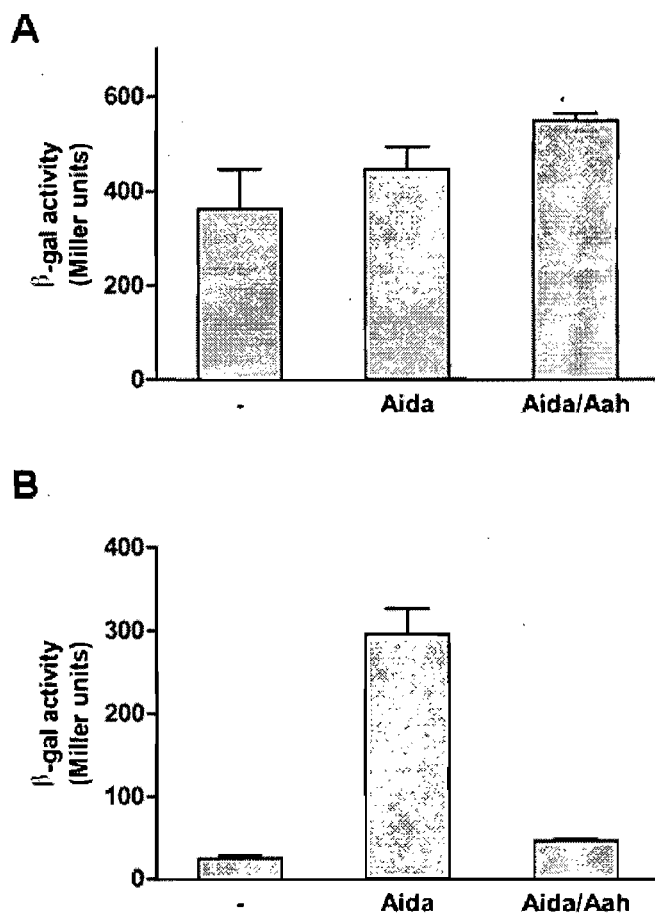
**Fig. 3: Effect of glycosylation on the expression level and on the mild heat extraction of AIDA-I.**

*A.* Whole cell extracts of bacteria bearing an empty vector (-), or expressing unglycosylated AIDA-I (Aida) or glycosylated AIDA-I (Aida/Aah) were separated by SDS-PAGE and probed by immunoblotting with antiserum against the HisG tag fused to mature AIDA-I. *B.* Bacteria harboring the same plasmids were heat-extracted and the extracts recovered by centrifugation prior to separation by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining.



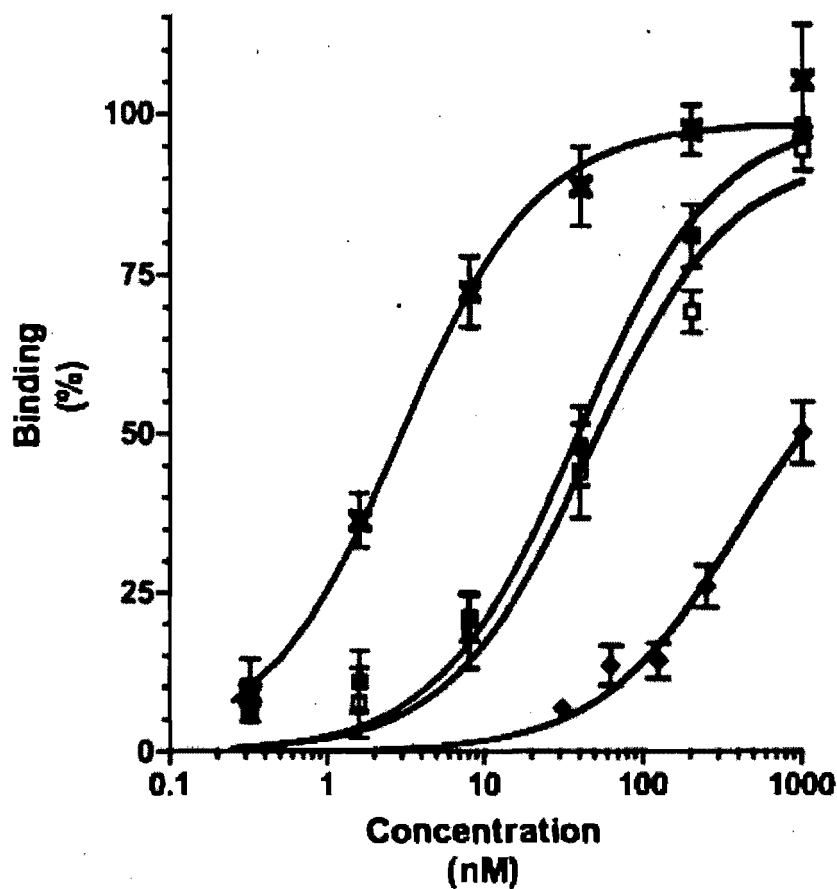
**Fig. 4: Effect of glycosylation on the resistance to proteases.**

Bacteria bearing an empty vector (-), or expressing unglycosylated AIDA-I (Aida) or glycosylated AIDA-I (Aida/Aah) were pelleted and resuspended in PBS in the presence or absence of trypsin or proteinase K ( $0.3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  and  $3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). The amount of AIDA-I was revealed by immunoblotting with an anti-HisG antibody (upper panel), and the intensity of the bands was quantitated by densitometry and normalized (lower panel).



**Fig. 5: Induction of an extracytoplasmic stress by the non-glycosylated AIDA-I.**

An empty vector (-), or plasmids allowing expression of unglycosylated AIDA-I (Aida) or glycosylated AIDA-I (Aida/Aah) were transformed into the SR1364 (*pRpoH::lacZ*) (A) and SR1458 (*pdegP::lacZ*) (B) reporter strains. The  $\beta$ -galactosidase activity measured in these strains and presented in Miller units indicate cytoplasmic and extracytoplasmic stress, respectively. The experiment was performed three times in duplicate. The values represent means  $\pm$  SEM and were compared by an ANOVA (\*,  $p < 0.01$ ).



**Fig. 6: Binding of unglycosylated mature AIDA-I to cultured epithelial cells.**

The glycosylated (open squares) or unglycosylated (closed squares) fusion of GST to mature AIDA-I (encompassing amino acids 50 to 847) were purified by affinity chromatography. Various amounts of the proteins were incubated with fixed Hep-2 cells. Pure GST (diamonds) and pure whole AIDA-I (crosses) were used as a control. Bound proteins were revealed with an anti-GST antiserum directly coupled to HRP or an anti-AIDA-I serum and a secondary antibody coupled to HRP. Background was subtracted and the absorption was normalized by dividing the absorption of each well by the maximal absorption measured on the plate in order to obtain percentages of maximal binding.

## ARTICLE 2


### **The autotransporter AIDA-I mediates autoaggregation by a cadherin-like mechanism**

**Victoria Girard, Marie-Ève Charbonneau, Manuel Campos, Frédéric Berthiaume, and Michael Mourez\***

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

Running title: Autoaggregation of the AIDA-I autotransporter

Keywords: Autotransporter, AIDA-I, *Escherichia coli*, Bacterial adhesin, Autoaggregation, SPR

\*Corresponding author : Michael Mourez, Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Quebec, Canada. Phone : 

Soumission à venir dans Journal of Biological Chemistry

## ABSTRACT

The Adhesin Involved in Diffuse Adherence (AIDA-I) is a bacterial adhesin associated with certain diarrheagenic *Escherichia coli* strains. AIDA-I is a surface-displayed autotransporter that belongs to the Self-Associating Autotransporter (SAAT) family because of its capacities to autoaggregate and form biofilms, in addition to its adhesive function. Here we studied AIDA-I/AIDA-I interaction and its role in bacterial autoaggregation. By using surface plasmon resonance on purified protein and chemical crosslinking on bacterial cells, we showed that the extracellular domain of AIDA-I promotes autoaggregation by interacting with itself. The self-association of AIDA-I, despite being of high affinity ( $K_d = 45$  nM), appears to be modulated by ionic strength, as high salt concentrations inhibits both AIDA-I/AIDA-I interaction and autoaggregation of bacterial cells. Circular dichroism also suggested that a conformational change occurred upon oligomerization of the protein. Lastly, we showed that oligomers of AIDA-I occur at the surface of the same bacterial cells and are a prerequisite for autoaggregation. Taken together, our experiments provide evidence that autoaggregation is mediated by a cadherin-like mechanism where oligomers at the surface of the same bacterial cells interact with oligomers from neighbouring cells.

## INTRODUCTION

Many bacterial species have the ability to form aggregates which can be visualized microscopically and macroscopically by the clumping of bacterial cells and the settling from static liquid suspensions, respectively. A wide variety of bacteria can autoaggregate, both Gram-positive or Gram-negative, such as *Bordetella pertussis* (25), *Staphylococcus aureus* (24) or *Streptococcus pyogenes* (7, 13). In most cases, autoaggregation is conferred by surface-exposed adhesins such as curli (17), fimbriae (11, 27, 32) or autotransporters (22). Bacterial aggregates can enhance colonization, participate in biofilm formation, enable the bacteria to resist host defences or allow the expression of multicellular phenotypes such as swarming (2, 13, 30, 33, 40). The multicellular behaviour of microorganisms is today a major research area (12, 31, 35, 41). To date, studies have mainly focused on intercellular communication mediated by quorum sensing signaling



molecules and on the properties of biofilms (6, 20). Less emphasis has been placed on the physical contact necessary for communication to occur. In eukaryotic organisms, this contact is ensured by specific cell adhesion molecules, which are engaged in homophilic interactions, such as cadherins (23). Bacterial proteins conferring autoaggregation could play a similar role to eukaryotic cell adhesion molecules.

A newly described family of *Escherichia coli* proteins, the Self-Associating Autotransporters (SAAT), is involved in autoaggregation (18, 21, 37, 38). This family comprises three proteins, the Adhesin Involved in Diffuse Adherence (AIDA-I) (8, 37), the autoaggregation factor Antigen 43 (Ag43) (18, 21, 36) and the TibA adhesin/invasin of enterotoxigenic *E. coli* (38). AIDA-I, originally discovered in the diarrheagenic *E. coli* strain 2787 (1), is associated with a high percentage of pathogenic strains of *E. coli* involved in neo-natal and postweaning diarrhea in piglets and causes major economic losses worldwide (15, 16, 28, 29). In experimental infections, it has been hypothesized that bacterial autoaggregation and biofilm formation, and not adhesion to epithelial cells, is essential to the pathogenesis of AIDA-expressing strains (28). AIDA-I is synthesized as a 132 kDa preproprotein (39). The protein comprises an N-terminal signal sequence, the extracellular mature AIDA-I adhesin and a membrane-embedded domain, AIDAc. The latter forms a  $\beta$ -barrel in the outer membrane, which is important for the translocation of mature AIDA-I to the bacterial surface. After translocation, AIDA-I is cleaved but despite cleavage, mature AIDA-I and AIDAc remain strongly associated (8, 39).

In this study, we characterize the autoaggregation of AIDA-I. We confirm that the extracellular domain of AIDA-I mediates autoaggregation. We also show by SPR and chemical crosslinking that AIDA-I interacts with itself *in vitro* and at the surface of bacterial cells and that this interaction is salt-sensitive. We finally show that bacterial autoaggregation requires the formation of oligomers at the surface of each bacterium and we propose a cadherin-like model for autoaggregation mediated by SAAT autotransporters.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** The *Escherichia coli* K-12 strain C600 (*F thr-1 leuB6 thi-1 lacY1 supE 44 rfbD1 fhuA21*) obtained from New England Biolabs was used in

this study. The plasmid pAgH has been described previously (8) and contains the whole *aah-aida* operon with a six-histidine and glycine tag (HisG) in the N-terminal part of AIDA-I. Plasmids pAngH and pAah, which allow expression of HisG-tagged AIDA-I and the AIDA-specific glycosyltransferase, Aah, respectively, have been described elsewhere (8). The autoaggregation-deficient mutant I24 is the result of a five amino-acid insertion at position 578 and was obtained in a previous study by random mutagenesis of AIDA-I (10). The uncleaved point mutant S846L was obtained by site-directed mutagenesis in a previous study (8). Bacterial cultures were grown at 30°C on LB agar plates or in LB medium containing 100 µg/ml of ampicillin. Overnight cultures from *E.coli* C600 were diluted 1:100 in fresh medium and grown to an O.D.<sub>600nm</sub> of 0.8, and the expression of AIDA-I was induced overnight with 10 µM of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), unless indicated otherwise.

**Purification of whole AIDA-I.** The purification of his-tagged AIDA-I was performed essentially as previously described (8). Briefly, 1-liter cultures of C600 expressing glycosylated AIDA-I, either wild-type or mutated, were grown until the O.D.<sub>600nm</sub> was 0.8 and then were induced overnight with 10 µM IPTG. Cells were harvested and resuspended in 40 ml of Tris-Buffered Saline (TBS; 50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl) containing lysozyme (50 µg/ml final concentration) and EDTA (10 mM final concentration). The cells were lysed using a French Press and an ultrasonic processor. The lysate was centrifuged for 50 min in an ultracentrifuge at 250,000 g. The pellets, containing bacterial membranes, were resuspended in TBS containing 1% Triton- X100, incubated for one hour on ice and centrifuged for 50 min in an ultracentrifuge at 250,000 g. The supernatant, containing the HisG-tagged AIDA-I, was purified by immobilized metal affinity chromatography using a His Trap HP column (Amersham Biosciences) and the purification was performed using an ÄKTA purifier system, according to the instruction of the manufacturer. Purity was evaluated by SDS-PAGE followed by staining with Coomassie Blue. The concentration of the protein was measured with the BCA Protein Assay kit (Pierce).

**Purification of heat-extracted protein.** Briefly, 1 liter from overnight culture of *E.coli* C600 expressing pAgH was grown until the O.D.<sub>600nm</sub> was 0.8 and induced overnight with

10  $\mu$ M IPTG. Cells were harvested and resuspended in 15 ml of 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7. In order to release the cleaved mature AIDA-I, the sample was heated at 60°C for 20 min and centrifuged for 15 min at 16,000  $\times$  g. The supernatant, containing the HisG-tagged heat-extracted AIDA-I, was purified by immobilized metal affinity chromatography using a His Trap HP column (Amersham Biosciences) as described above.

**Subcellular fractionation.** Cell lysates and membrane fractions were prepared as previously described (8). Briefly, 500 ml of bacterial cultures induced overnight with IPTG were adjusted to the same O.D.<sub>600nm</sub>, harvested and resuspended in 20 ml of Tris-buffered saline (TBS; 50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl) containing lysozyme (0.4 mg  $\cdot$  ml<sup>-1</sup> final concentration) and EDTA, pH 8 (10 mM final concentration). The bacteria were lysed using an ultrasonic processor and the lysates were centrifuged for 1 h in an ultracentrifuge at 250,000  $\times$  g. The pellets, containing bacterial membranes, were resuspended in 10 ml TBS.

**Autoaggregation assays.** Autoaggregation assays were performed as previously described (8). In some cases, the assays were performed in 96-well plates: overnight cultures of C600 harboring an empty vector or the plasmid pAgH were normalized in 1.5 ml of LB to an O.D.<sub>600nm</sub> of 1 in deep-well 96-well plates and left standing at 4°C. Samples (100  $\mu$ l) were taken at the surface every 30 minutes and the O.D.<sub>600nm</sub> was measured. For the inhibition experiments, purified protein, in its storage buffer or dialyzed overnight in TBS, cell lysates and membrane preparations were added to the wells prior to measurement. In the case of overnight dialysis, the absence of Triton X-100 was assessed by measuring the absorbance of the protein at 280 nm and comparing it to the BCA dosage. For the inhibition of autoaggregation by purified AIDA-I, the IC<sub>50</sub> was obtained by non-linear regression fitting to a sigmoidal dose-response, using Prism 4.0 (GraphPad Software). To study the effect of salt on autoaggregation, cultures were harvested and resuspended in TBS at different NaCl concentrations.

**Phase-contrast microscopy.** Autoaggregation assays were also performed on microscope slides. Overnight cultures of C600 harboring the empty vector or the plasmid pAgH were

grown until the O.D.<sub>600nm</sub> was 0.8 and induced overnight with 10  $\mu$ M IPTG. The cultures were normalized to the same O.D.<sub>600nm</sub> of 0.04 in 1 ml LB and vortexed for 10 seconds. 20  $\mu$ l of each suspension was spotted on a microscope slide and incubated at 4°C. Aggregates of bacteria were examined after 3 h of incubation with a phase-contrast Leica DMI4000B microscope (Meyer Instruments).

**Heat-treatment of bacterial cells.** Overnight cultures of C600 harboring the empty vector or the plasmid pAgH were grown until the O.D.<sub>600nm</sub> was 0.8 and induced overnight with 10  $\mu$ M IPTG. The cultures were normalized to the same O.D.<sub>600nm</sub> in 10 ml LB broth, harvested and resuspended in 1ml of 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7) before heat-treatment at 60°C for 5 min. The samples were centrifuged for 5 min at 12,000  $\times$  g in microcentrifuge tubes and resuspended in 10 ml of LB broth. The heat-treatment was repeated once. Treated samples were left standing and the autoaggregation assay was performed as described above.

**Surface Plasmon Resonance.** SPR measurements were carried out using a Biacore 3000 instrument (Biacore AB, Uppsala, Sweden). Experiments were performed on research-grade CM5 sensor chips at 25°C using filtered (0.2  $\mu$ m) and degassed HBS-EP (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% (v/v) Tween-20) for the immobilisation procedure. Immobilized sensor chip surfaces were prepared using the Amine Coupling Kit (Biacore AB). Briefly, 70  $\mu$ L of freshly mixed solution I (200 mM EDC and 50 mM NHS in water) was injected (10  $\mu$ l/min) to activate surface-exposed carboxymethyl groups to reactive esters. Next, 100  $\mu$ g/ml of AIDA-I in sodium acetate, pH 4, was injected to generate amine-coupled AIDA-I surfaces (immobilization levels ranging between 1000 and 6000 RU). Finally, 70  $\mu$ l of solution II (1 M ethanolamine pH 8.5) was injected to deactivate excess reactive groups and remove any non-specifically bound ligand. Corresponding reference surfaces were prepared in a similar manner with addition of BSA at the same immobilization levels. To assess steady-state binding affinity, AIDA-I diluted in TBS-BSA (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 2% (v/v) BSA) at various concentrations (1-1000 nM) was injected over the immobilized surface at 30  $\mu$ l/min using 'KINJECT' mode (5 min association + 8 min dissociation). Raw data were exported in the

GraphPad Prism software and kinetic parameters were determined by plotting the concentration of AIDA-I against the steady state SPR response. To assess the effect of ionic strength, AIDA-I (10 nM) was injected over immobilized surface at 30  $\mu\text{l}/\text{min}$ , in running buffers varying in ionic strength. For all SPR assays, surfaces were regenerated between sample injections using one 60 seconds pulse of 1M NaCl at 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ . All binding data are representative of duplicate injections acquired from at least two independent trials.

**Far-UV CD spectroscopy.** Far-UV circular dichroism (CD) spectra of the protein were recorded on a spectropolarimeter (Jasco Spectroscopic Co. Ltd.; model J-810) using a 0.1-cm-path-length cuvette. The Far-UV CD spectra of AIDA-I were recorded between 200 and 260 nm. For each spectrum, five to ten accumulations were averaged and the contribution of buffer to the measured ellipticity was subtracted. To study the effect of salt, the protein samples were dialyzed for 4h at 4°C in TBS buffer and then diluted in the same buffer with different concentrations of NaCl prior to measurement. Ellipticities were converted to mean residual ellipticities.

**Chemical crosslinking.** For cell-surface cross-linking, overnight cultures from *E.coli* C600, harboring the different plasmids, were diluted 1:100 in fresh medium and grown to an O.D.<sub>600nm</sub> of 0.4, at which point the expression of AIDA-I was induced for three hours with 10  $\mu\text{M}$  IPTG. The cultures were normalized to the same O.D.<sub>600nm</sub> of 1 and washed with Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.5. 25  $\mu\text{l}$  of each suspension was resuspended in the same buffer and incubated for 30 min at room temperature with different concentrations of bis[sulfosuccinimidyl] suberate (BS<sup>3</sup>, Pierce), which is a membrane-impermeable NHS-ester reagent, reacting with amino-groups to form stable amid bonds. The reaction was stopped by incubating for an additional 15 min with 50 mM Tris pH 7.5. Samples were diluted in 2x SDS-PAGE loading buffer containing  $\beta$ -mercaptoethanol and denatured by heating at 100°C for 10 min. The samples were then separated by SDS-PAGE at 4°C on 7% acrylamide gels and analyzed by immunoblotting. Immunodetection was performed with a serum raised against heat-extracted mature AIDA-I diluted 1:50,000 in blocking buffer (5% skim milk, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.05% Triton X-100). A goat anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody (Sigma) was

used as a secondary antibody according to the instructions of the manufacturer. Immune complexes were revealed using a 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution for membranes (Sigma).

## RESULTS

**The extracellular domain of AIDA-I mediates autoaggregation.** Previous reports (21, 37, 38) suggest that AIDA-I participates in cell-cell interactions, resulting in autoaggregation of bacteria. Similarly, we observed that cultures of C600 harboring the plasmid pAgH settle at the bottom of culture tubes whereas cultures harboring the empty vector do not (Figure 1A). Large aggregates of cells can also be observed by phase-contrast microscopy in cultures of C600 harboring the plasmid pAgH and not in cultures harboring the empty vector. This result was previously noted with AIDA-I (37) and other SAAT (21, 38) and suggested that these proteins directly mediate autoaggregation, rather than indirectly triggering another autoaggregation mechanism. However, formal proof of the direct involvement of the protein, e.g. of direct SAAT/SAAT interaction, is lacking. To address this question, we first evaluated if autoaggregation could still occur after the mature adhesin is released by heat-extraction (1). After heating at 60°C for 10 min, the bacterial cells could not autoaggregate, arguing again for the direct involvement of AIDA-I (Figure 1B). We then tested whether purified AIDA-I can inhibit autoaggregation. Whole glycosylated AIDA-I was purified from membrane extracts, dialyzed in TBS, and added as a competitor to bacterial cells expressing AIDA-I. As shown in Figure 2A, the protein can inhibit autoaggregation in a dose-dependent and saturable manner with an  $IC_{50}$  of approximately 34 nM. In a previous random mutagenesis study, we obtained an AIDA-I mutant unable to autoaggregate (10). The mutant protein, I24, bears a five amino acids insertion at residue 578. We would expect this protein to be unable to inhibit autoaggregation. As shown in Figure 2B, this was indeed the case. We also observed previously that the mature adhesin released by heat-extraction is aberrantly folded (8). If AIDA-I were to directly mediate autoaggregation by defined and specific homophilic interactions, we would expect that an aberrantly folded version of the protein would be unable to inhibit aggregation, which is also what we observed (Figure 2B). Altogether, our

results provide strong evidence that the extracellular domain of AIDA-I is directly involved in autoaggregation.

**AIDA-I self-associates with high affinity.** To get further insight into the mechanism of autoaggregation, we assessed if purified AIDA-I protein could interact with itself *in vitro*. We used Surface Plasmon Resonance (SPR) to follow the real-time binding of AIDA-I to itself. Purified AIDA-I was immobilized on a BIAcore chip, followed by injection of soluble AIDA-I at varying concentrations on the surface of the chip. Typical binding curves show an increasing response to AIDA-I from 1 nM to 1  $\mu$ M (Figure 3A). A control experiment was performed where AIDA-I was heated at 60°C for 20 minutes prior to injection on the chip. No binding response could be observed in these conditions (data not shown). As noted above, such a heat treatment is known to denature the mature portion of AIDA-I but does not affect AIDAc (8, 39). This control strongly suggests that the binding observed in SPR does not involve interaction between AIDAc molecules. The  $K_d$  of the AIDA-I/AIDA-I interaction was determined from the binding isotherms generated by plotting the concentration of AIDA-I against the steady state response (Figure 3B). The interaction observed was of high affinity (48.2 nM  $\pm$  9.8 nM) with relative fast association rates and slow dissociation rates and was not affected by the level of protein immobilized on the chip. Interestingly, the  $K_d$  of the interaction is in excellent agreement with the  $IC_{50}$  observed in our inhibition experiment with purified AIDA-I (Figure 2A). Taken together, our results showed that AIDA-I can interact with itself *in vitro* with a high affinity and constitutes a formal proof of a direct SAAT/SAAT interaction.

**AIDA-I/AIDA-I interaction and autoaggregation of bacteria expressing AIDA-I are disrupted by high salt concentrations.** In many protein-protein interactions, ionic forces play an important role (4, 26). To assess the involvement of electrostatic interactions in the self-association of AIDA-I, we measured AIDA-I/AIDA-I binding at different NaCl concentrations. Typical binding curves (Figure 4A) showed that AIDA-I/AIDA-I interaction is salt-sensitive with a decrease in binding with increasing NaCl concentrations. To assess the correlation of AIDA-I/AIDA-I interaction with bacterial autoaggregation, we investigated the effect of ionic strength on the settling of cultures of bacterial cells

expressing AIDA-I, by resuspending the bacteria in buffers at different ionic strengths (Figure 4B). The various buffers did not trigger autoaggregation of bacteria bearing an empty vector (data not shown). We observed a significant decrease in the settling of cells at 300 mM NaCl and practically no aggregation at 500 mM NaCl. These results correlate well with the SPR measurements and suggest that electrostatic interactions are involved in the self-association of AIDA-I *in vitro* and *in vivo*.

**AIDA-I/AIDA-I interaction is accompanied by a conformational change.** To assay if the oligomerization of AIDA-I is accompanied by a change in secondary structure, we performed far-UV CD spectroscopy on purified AIDA-I at different ionic strengths (Figure 5). As observed before (8), the spectrum of AIDA-I shows a clear single minimum of ellipticity at 218 nm, a characteristic of  $\beta$ -strands, in agreement with the predicted structure of AIDA-I (10). As shown in Figure 5A, upon increase of NaCl concentration, the CD spectrum of AIDA-I changed, with a slight blue-shift and a notable decrease in ellipticity, demonstrating the occurrence of a conformational change. Since we observed that high NaCl concentration prevented AIDA-I/AIDA-I interactions, this result suggests that conformational changes are correlated with the self-association of AIDA-I.

If the difference in NaCl concentration had a direct effect on the conformation of AIDA-I, rather than an effect on the ability of AIDA-I to interact with itself, we would expect a similar conformation change to occur with the I24 mutant, which is unable to mediate or prevent autoaggregation. However, I24 had the same CD spectrum at low and high NaCl concentration and its spectrum was similar to the one of AIDA-I in the presence of high salt concentration, which corresponds to an absence of AIDA-I/AIDA-I interaction (Figure 5B). These results suggest that when AIDA-I interacts with itself, it adopts a different overall conformation.

**AIDA-I can oligomerize *in vivo* on the surface of bacterial cells.** AIDA-I is directly involved in autoaggregation, as shown by the inhibition of autoaggregation by the purified protein (Figure 2). SPR measurements also show that AIDA-I can interact with itself *in vitro* (Figure 3). To assess if autoaggregation involves direct interactions between AIDA-I molecules *in vivo* on the surface of bacterial cells, we performed cell-surface cross-linking



experiments with BS<sup>3</sup>, a NHS-ester reagent bridging primary amino-groups of proteins. When 300  $\mu$ M of BS<sup>3</sup> was added to cultures expressing pAgH, a band of 200 kDa, corresponding to a dimer of AIDA-I, can be observed by immunoblotting with an anti-AIDA antibody (Figure 6, lane 2). This result shows that AIDA-I interacts with itself *in vivo*. This dimerization can be due to interactions between adjacent molecules at the surface of the same bacterial cell or between molecules from neighbouring cells, or both. To distinguish between these possibilities, we used the mutant S846L for which the cleavage is almost abolished and which appeared as a 150 kDa band in SDS-PAGE (8). This mutant autoaggregates at the wild-type level (8). When BS<sup>3</sup> is added to cultures expressing S846L, a band above 250 kDa is observed, which corresponds probably to a dimer of uncleaved AIDA-I (Figure 6, lane 4). We then performed the cross-link using a mix of pAgH and pAgH S846L. If AIDA-I bridges bacteria by associating with AIDA-I molecules from neighbouring cells, we would expect to observe an additional band of 250 kDa corresponding to the interaction between cleaved and uncleaved AIDA-I. As shown in Figure 6 (lane 6), this is not the case. The same results are obtained with higher concentrations of cross-linker (data not shown). These results show that the existence of *trans* oligomers could not be observed, in our cross-link conditions where *cis* and *trans* oligomerisation can be differentiated. We also observed that no cross-link of AIDA-I occurs for the non-aggregative mutant I24, for which only a band at 100 kDa can be observed in the presence of BS<sup>3</sup> (Figure 6, lane 8), arguing for the role of oligomers in autoaggregation.

Altogether, our results show the *in vivo cis* oligomerisation of AIDA-I at the surface of the same bacterium.

**Autoaggregation is not inhibited by subcellular extracts of C600 ptr99a.** As no interbacterial cross-link was observed in our conditions, the existence of an accessory molecule bridging the two oligomers in *trans* could thus not be excluded. To address this question, we added different subcellular extracts of C600 harboring the empty vector or the plasmid pAgH to bacterial cells expressing AIDA-I (Figure 7). We reasoned that, if an accessory factor bridges the two oligomers, autoaggregation would be inhibited in the presence of a high concentration of this factor, which should be found in any bacterial cell

lysate. As observed in figure 7, autoaggregation is totally inhibited by the addition of a lysate and a membrane extract of C600 containing AIDA-I. By contrast, the addition of a cell lysate and a membrane extract of C600 harboring the empty vector at the same concentration can only weakly inhibit autoaggregation. These results suggest, but do not prove, that no accessory factor is involved in autoaggregation, as the addition of a high concentration of an extract containing this factor has no effect on the settling of bacterial cells.

**Bacterial autoaggregation requires *cis* oligomers of AIDA-I.** Lastly, we wanted to determine the role of *cis* oligomerization in autoaggregation of bacterial cells. To address this question, we performed the inhibition of autoaggregation with purified protein in the presence of 0,1% Triton X-100. This detergent inhibits the self-interaction of AIDA-I in the SPR measurements (Figure 8A) and prevents the conformational change observed in CD (Figure 8B). However, the autoaggregation of bacterial cells is not inhibited by Triton X-100 (data not shown). We reasoned that, if bacterial autoaggregation still occurs in the presence of Triton X-100, the *trans* interactions are logically not inhibited by the detergent or else the bacteria would not settle. Consequently, we can consider that the detergent inhibits the *cis* interactions of AIDA-I with itself. Only the self-interaction of purified protein would be inhibited, as the detergent would encircle the  $\beta$  barrels of whole AIDA-I and cause a steric hindrance preventing the association. The autoaggregation of bacterial cells would not be affected by the detergent as the  $\beta$  barrels are embedded in the outer membrane. Based on this hypothesis, we measured the inhibition of autoaggregation by the purified protein in its storage buffer containing 0, 1 % Triton X-100 to assess the role of *cis* oligomerization. We observed that the autoaggregation of bacterial cells is not modified when 200 nM of purified protein containing Triton X-100 are added to the wells compared to the addition of the protein dialysed overnight in TBS (Figure 8C). These results show that AIDA-I inhibits autoaggregation only in its *cis* oligomeric form, suggesting that *cis* oligomers of the protein are present at the surface of bacterial cells.

Altogether, our results show that AIDA-I/AIDA-I interaction involves the formation of *cis* oligomers on the surface of the same bacterial cells that could interact in *trans* with oligomers from neighbouring cells to mediate autoaggregation (Figure 9).

## DISCUSSION

In the present study, we confirmed that AIDA-I mediates autoaggregation, as previously observed (21, 37, 38). Indeed, the release of the mature AIDA-I by heat-treatment abolished autoaggregation and purified AIDA-I inhibited the settling of bacterial cells. In addition, our study sheds new light on the mechanism of autoaggregation by bringing the formal proof of a direct AIDA-I/AIDA-I interaction. The SPR study shows that AIDA-I can self-associate with high affinity. This interaction, as well as autoaggregation of bacterial cells, is disrupted by high salt concentrations. This result suggests that the self-association of AIDA-I is due to polar interactions, as they will be less effective at higher ionic strengths. Autoaggregation is inhibited by 300 mM of NaCl and abolished by 500 mM of NaCl in a context of AIDA-I overexpression. These results suggest that physiological concentrations of salt, encountered by the bacteria in the host, could inhibit autoaggregation. It is therefore tempting to speculate that environmental factors can modulate this phenotype and help the bacteria to adapt to different environmental niches:

Another conclusion of our study is that autoaggregation between two bacterial cells required the oligomerization of AIDA-I at the surface of each of the bacterial cells. Crosslink experiments showed the formation of dimers of AIDA-I. These dimers are most likely occurring at the surface of the same bacterial cells because no interbacterial crosslink could be observed when two different strains expressing cleaved and uncleaved AIDA-I are mixed together. Furthermore, oligomerization seems to be required for autoaggregation to occur, as no inhibition of autoaggregation is observed in the presence of the detergent Triton X-100 which forces the protein to stay in its monomeric form. A model for autoaggregation of the SAAT autotransporters is emerging from our results (Figure 8). We propose that *cis* dimers at the surface of the same bacterial cell occur by interaction of the extracellular domains of AIDA-I, as shown by the crosslink experiments and the abolition of autoaggregation after heat-extraction of the protein. *Cis* oligomers on the surface of bacterial cells would then interact *in trans* with oligomers of neighbouring cells. This interaction could be direct or indirect. The existence of an accessory protein bridging the two oligomers in *trans* cannot be excluded. However, we believe that the interaction most

likely occurs by a direct contact between the oligomers, as no inhibition of autoaggregation is observed in the presence of a bacterial cell lysate, susceptible to contain this hypothetical factor. The segments of the protein mediating both interactions are not known but the N-terminal domain of the protein is not involved in autoaggregation, as shown by our previous structure-function analysis of AIDA-I (10).

The eukaryotic cell-cell adhesion molecules cadherins and the autotransporter AIDA-I share some interesting similarities. First, their mechanisms of autoaggregation seem to be very similar. Cadherins interact with themselves by *cis* dimerization of their extracellular domains at the cell surface, followed by a *trans* interaction of dimers on opposing cells (5, 23), similar to what we propose in our model. Moreover, cadherins and AIDA-I are both glycoproteins containing repeats in their extracellular domain (3, 9, 10), their autoaggregation is modulated by environmental factors (19, 37) and they both engage other substrates in addition to themselves (34, 37). Cadherins and AIDA-I could therefore play the same role, *ie* ensuring the physical contact necessary for the emergence of multicellular structures (14). The multicellular behaviour of microorganisms has received much attention in the past few years (12, 31, 35, 41). However, studies have focused mainly on the chemical signaling molecules (6, 20) rather than on the mechanisms by which bacteria interact. Physical contact between bacteria is logically an integral part of the multicellular behavior of microorganisms. Autoaggregation mediated by AIDA-I and other adhesins could ensure this contact. Hence, we hypothesize that the main role of autoaggregating adhesins could be to act as “bacterial cell adhesion molecules” similar to the eukaryotic cell adhesion molecules organizing multicellular organisms. Further work on this type of adhesins is warranted to extend our knowledge on the mechanism by which they would ensure their specific role.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by financial contributions from the Groupe de Recherche et d'Etudes sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC discovery grant 262746) and the Canada Research Chair program. We thank M. Ramjeet for his insightful comments on the manuscript.

## REFERENCES

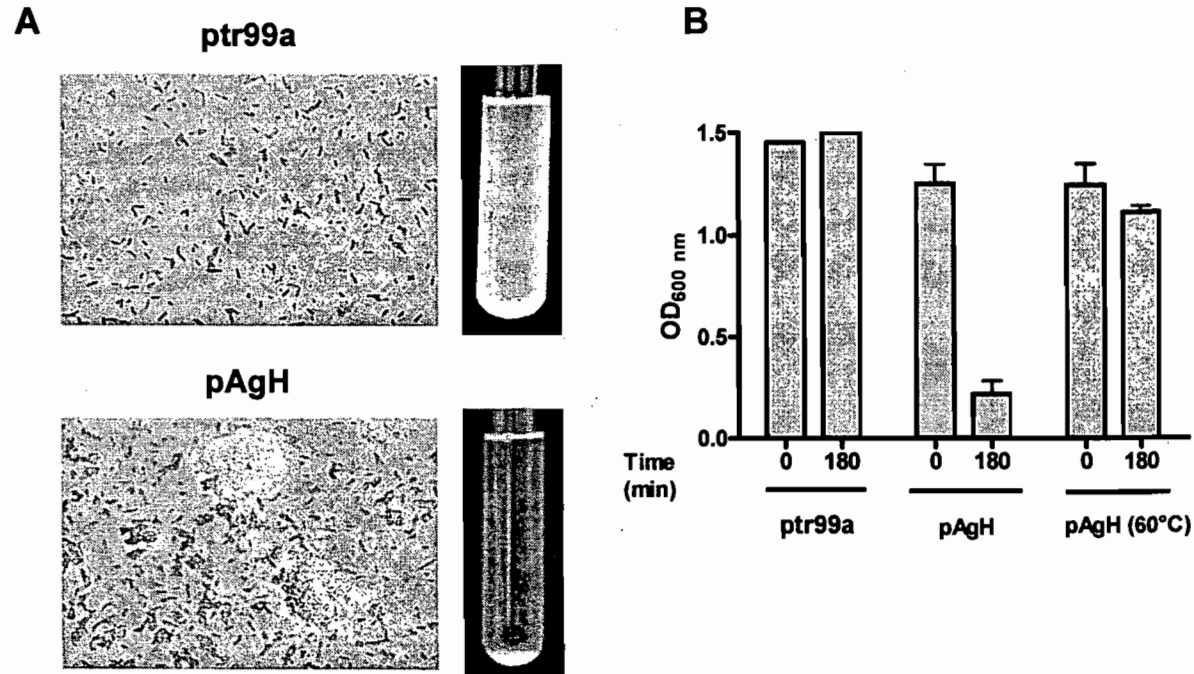
1. **Benz, I., and M. A. Schmidt.** 1989. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **57**:1506-11.
2. **Berge, A., B. M. Kihlberg, A. G. Sjöholm, and L. Björck.** 1997. Streptococcal protein H forms soluble complement-activating complexes with IgG, but inhibits complement activation by IgG-coated targets. *J Biol Chem* **272**:20774-81.
3. **Boggon, T. J., J. Murray, S. Chappuis-Flament, E. Wong, B. M. Gumbiner, and L. Shapiro.** 2002. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* **296**:1308-13.
4. **Bosshard, H. R., D. N. Marti, and I. Jelesarov.** 2004. Protein stabilization by salt bridges: concepts, experimental approaches and clarification of some misunderstandings. *J Mol Recognit* **17**:1-16.
5. **Brieher, W. M., A. S. Yap, and B. M. Gumbiner.** 1996. Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin. *J Cell Biol* **135**:487-96.
6. **Camilli, A., and B. L. Bassler.** 2006. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* **311**:1113-6.
7. **Caparon, M. G., D. S. Stephens, A. Olsen, and J. R. Scott.** 1991. Role of M protein in adherence of group A streptococci. *Infect Immun* **59**:1811-7.
8. **Charbonneau, M. E., F. Berthiaume, and M. Mourez.** 2006. Proteolytic processing is not essential for multiple functions of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I). *J Bacteriol* **188**:8504-12.
9. **Charbonneau, M. E., V. Girard, A. Nikolakakis, M. Campos, F. Berthiaume, F. Dumas, F. Lepine, and M. Mourez.** 2007. O-linked glycosylation ensures the normal conformation of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. *J Bacteriol* **189**:8880-9.
10. **Charbonneau, M. E., and M. Mourez.** 2007. Functional organization of the autotransporter Adhesin Involved in Diffuse Adherence (AIDA-I). *J Bacteriol*.

11. **Czeczulin, J. R., S. Balepur, S. Hicks, A. Phillips, R. Hall, M. H. Kothary, F. Navarro-Garcia, and J. P. Nataro.** 1997. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* **65**:4135-45.
12. **Dunny, G. M., T. J. Brickman, and M. Dworkin.** 2008. Multicellular behavior in bacteria: communication, cooperation, competition and cheating. *Bioessays* **30**:296-8.
13. **Frick, I. M., M. Morgelin, and L. Bjorck.** 2000. Virulent aggregates of *Streptococcus pyogenes* are generated by homophilic protein-protein interactions. *Mol Microbiol* **37**:1232-47.
14. **Gumbiner, B. M.** 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**:345-57.
15. **Ha, S. K., C. Choi, and C. Chae.** 2003. Prevalence of a gene encoding adhesin involved in diffuse adherence among *Escherichia coli* isolates in pigs with postweaning diarrhea or edema disease. *J Vet Diagn Invest* **15**:378-81.
16. **Ha, S. K., C. Choi, K. Jung, J. Kim, D. U. Han, Y. Ha, S. D. Lee, S. H. Kim, and C. Chae.** 2004. Genotypic prevalence of the adhesin involved in diffuse adherence in *Escherichia coli* isolates in pre-weaned pigs with diarrhoea in Korea. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **51**:166-8.
17. **Hammar, M., Z. Bian, and S. Normark.** 1996. Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:6562-6.
18. **Hasman, H., T. Chakraborty, and P. Klemm.** 1999. Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. *J Bacteriol* **181**:4834-41.
19. **Haussinger, D., T. Ahrens, H. J. Sass, O. Pertz, J. Engel, and S. Grzesiek.** 2002. Calcium-dependent homoassociation of E-cadherin by NMR spectroscopy: changes in mobility, conformation and mapping of contact regions. *J Mol Biol* **324**:823-39.
20. **Hughes, D. T., and V. Sperandio.** 2008. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat Rev Microbiol* **6**:111-20.

21. **Klemm, P., L. Hjerrild, M. Gjermansen, and M. A. Schembri.** 2004. Structure-function analysis of the self-recognizing Antigen 43 autotransporter protein from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **51**:283-96.
22. **Klemm, P., R. M. Vejborg, and O. Sherlock.** 2006. Self-associating autotransporters, SAATs: functional and structural similarities. *Int J Med Microbiol* **296**:187-95.
23. **Leckband, D., and A. Prakasam.** 2006. Mechanism and dynamics of cadherin adhesion. *Annu Rev Biomed Eng* **8**:259-87.
24. **McDevitt, D., P. Francois, P. Vaudaux, and T. J. Foster.** 1994. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **11**:237-48.
25. **Menozi, F. D., P. E. Boucher, G. Riveau, C. Gantiez, and C. Locht.** 1994. Surface-associated filamentous hemagglutinin induces autoagglutination of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **62**:4261-9.
26. **Nakamura, H.** 1996. Roles of electrostatic interaction in proteins. *Q Rev Biophys* **29**:1-90.
27. **Nataro, J. P., Y. Deng, D. R. Maneval, A. L. German, W. C. Martin, and M. M. Levine.** 1992. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun* **60**:2297-304.
28. **Ngeleka, M., J. Pritchard, G. Appleyard, D. M. Middleton, and J. M. Fairbrother.** 2003. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J Vet Diagn Invest* **15**:242-52.
29. **Niewerth, U., A. Frey, T. Voss, C. Le Bouguenec, G. Baljer, S. Franke, and M. A. Schmidt.** 2001. The AIDA autotransporter system is associated with F18 and stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**:143-9.
30. **Ochiai, K., T. Kurita-Ochiai, Y. Kamino, and T. Ikeda.** 1993. Effect of co-aggregation on the pathogenicity of oral bacteria. *J Med Microbiol* **39**:183-90.

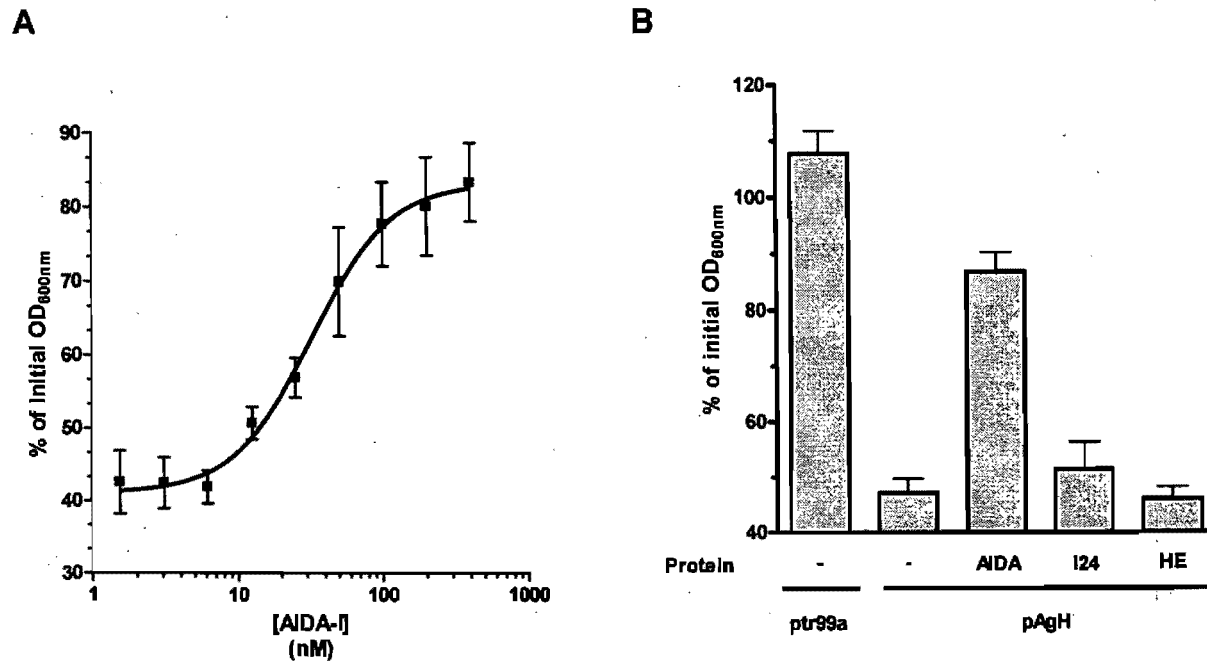
31. **Parsek, M. R., and E. P. Greenberg.** 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* **13**:27-33.
32. **Schembri, M. A., G. Christiansen, and P. Klemm.** 2001. FimH-mediated autoaggregation of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **41**:1419-30.
33. **Schembri, M. A., L. Hjerrild, M. Gjermansen, and P. Klemm.** 2003. Differential expression of the *Escherichia coli* autoaggregation factor antigen 43. *J Bacteriol* **185**:2236-42.
34. **Shan, W. S., H. Tanaka, G. R. Phillips, K. Arndt, M. Yoshida, D. R. Colman, and L. Shapiro.** 2000. Functional cis-heterodimers of N- and R-cadherins. *J Cell Biol* **148**:579-90.
35. **Shapiro, J. A.** 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu Rev Microbiol* **52**:81-104.
36. **Sherlock, O., U. Dobrindt, J. B. Jensen, R. Munk Vejborg, and P. Klemm.** 2006. Glycosylation of the self-recognizing *Escherichia coli* Ag43 autotransporter protein. *J Bacteriol* **188**:1798-807.
37. **Sherlock, O., M. A. Schembri, A. Reisner, and P. Klemm.** 2004. Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. *J Bacteriol* **186**:8058-65.
38. **Sherlock, O., R. M. Vejborg, and P. Klemm.** 2005. The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infect Immun* **73**:1954-63.
39. **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.
40. **Velicer, G. J., and Y. T. Yu.** 2003. Evolution of novel cooperative swarming in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Nature* **425**:75-8.
41. **West, S. A., A. S. Griffin, A. Gardner, and S. P. Diggle.** 2006. Social evolution theory for microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **4**:597-607.





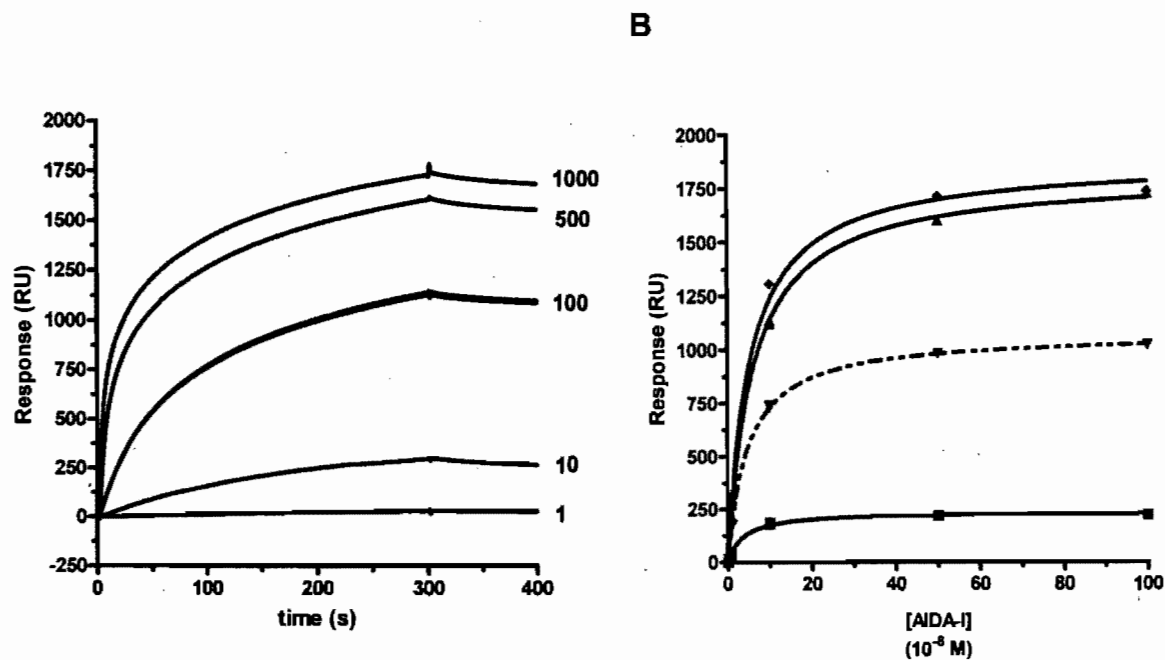
**Fig 1: Autoaggregation of bacterial cells is conferred by the mature AIDA-I adhesin.**

Phase-contrast microscopy and macroscopic cell settling (A) and autoaggregation assay (B) of C600 bearing the empty vector ptr99a or plasmid pAgH. Heat-treatment of the cells is indicated by the bar pAgH (60°C). For the autoaggregation assay, cultures were left standing at 4°C, and the OD<sub>600</sub> at the top of the culture was measured at the beginning of the assay and after 180 min.



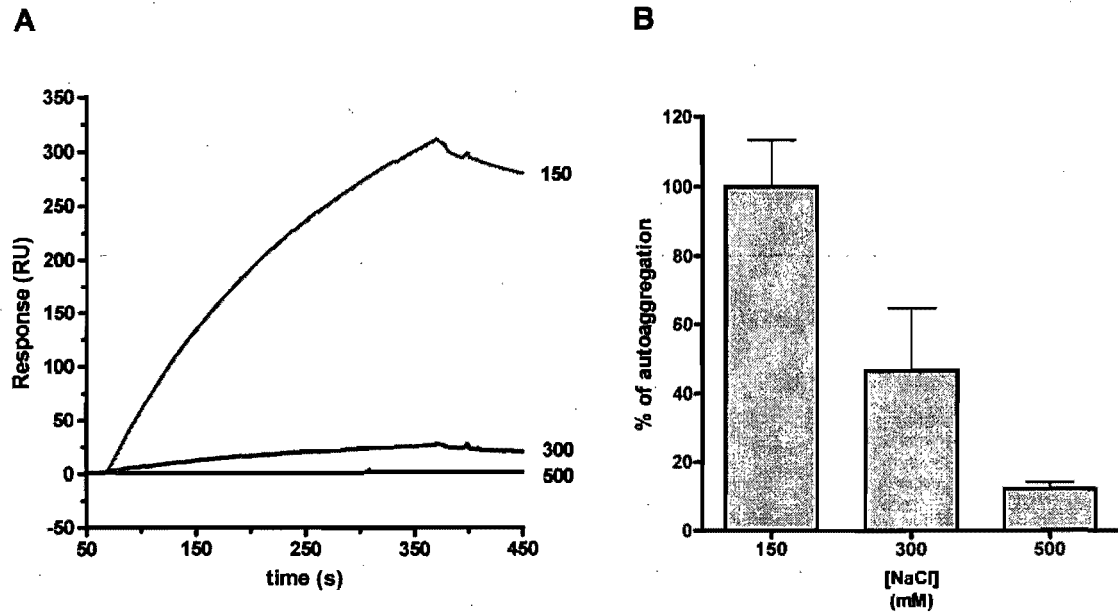
**Fig 2. : Inhibition of autoaggregation by the wild-type protein AIDA-I, the I24 protein and the heat-extracted protein (HE)**

(A) Dose-dependent inhibition of autoaggregation of bacterial cells by the wild-type protein. Normalized bacterial cultures of C600 harboring the plasmid pAgH were incubated with various concentrations of purified AIDA-I. An IC<sub>50</sub> of around 34 nM was obtained by non-linear regression fitting to a sigmoidal dose-response. (B) Normalized bacterial cultures of C600 harboring the empty vector ptr99a or the plasmid pAgH were incubated without protein or with 200 nM of wild-type protein, mutated protein I24 or heat-extracted purified protein (HE). For both assays, cultures were left standing in deep-well plates at 4°C, and the OD<sub>600</sub> at the top of the culture was measured after 90 min of incubation. The autoaggregation was evaluated by dividing the OD of each well at 90 min by the OD measured at the beginning of the assay.



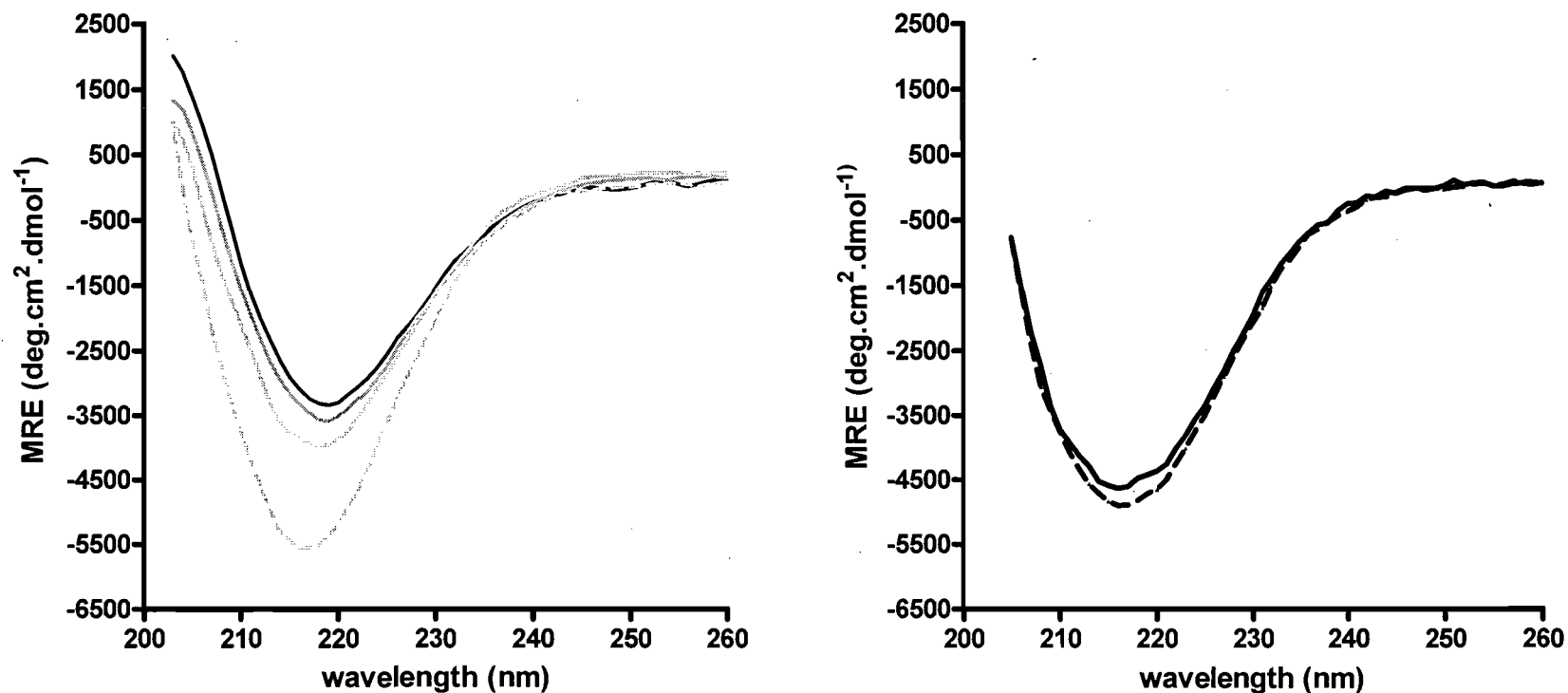
**Fig 3. : SPR analysis of AIDA-I/AIDA-I interaction.**

(A) Representating binding curves obtained by injection of various concentrations of AIDA-I (1 to 1000 nM) on the surface of the chip coupled with 6700 RU of AIDA-I. (B) Determination of the  $K_d$  of the interaction by plotting the concentration of AIDA-I against the steady state SPR response from four independent trials differing in the amount of AIDA-I immobilized on the chip.  $K_d$  of 35,5 nm (open square), 46,8 nm (filled square), 58,8 nm (open circle) and 51,6 nm (filled circle) were obtained by injecting AIDA-I on surfaces immobilized with 6700 RU, 6500 RU, 2500 RU and 1000 RU respectively.



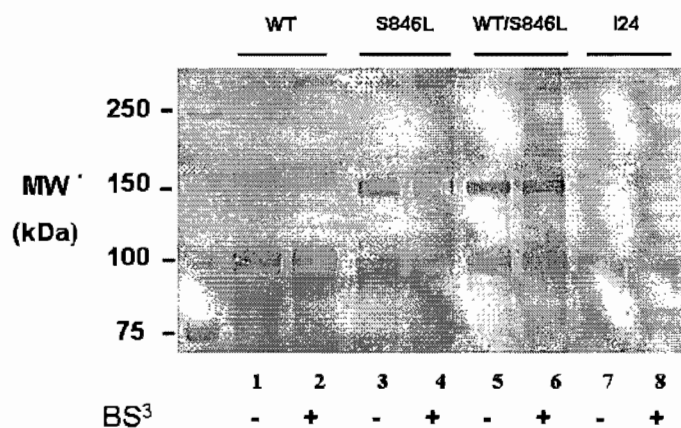
**Fig 4. : Effect of ionic strength on AIDA-I/AIDA-I interaction and autoaggregation.**

(A) SPR analysis of the effect of ionic strength on AIDA-I/AIDA-I interaction. Soluble AIDA-I was injected for 5 min at 30  $\mu$ l/ min at a concentration of 10 nM in TBS at different NaCl concentrations. Experiments were performed three times. The data represented are typical binding curves. (B) Effect of ionic strength on the autoaggregation of bacterial cells. Cultures resuspended in buffers at different ionic strengths were left standing at 4°C, and the OD<sub>600</sub> at the top of the culture was measured at the beginning of the assay and after 180 min. The data are the percentages of autoaggregation compared to bacteria resuspended in TBS 150 mM NaCl .



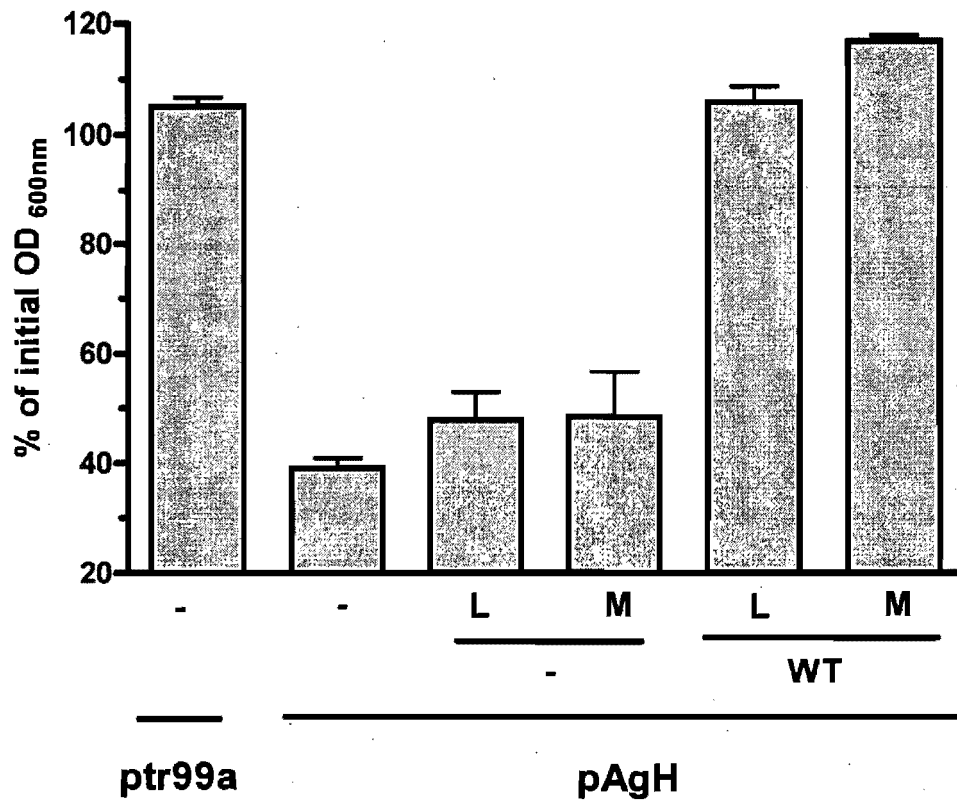
**Fig 5 : CD analysis of the protein at different ionic strengths.**

The figure shows far-UV CD spectra of purified protein obtained from C600 bearing the plasmid pAgH (A) or from the I24 mutant (B). Both proteins were dialysed in TBS prior to measurement and NaCl was added to the buffer at various concentrations. Multiple spectra were recorded at a rate of 5°C per min at a concentration of 150 mM (dark), 333 mM (dark grey), 666 mM (light grey) and 1M NaCl (dashed line) for the wild-type protein (A) and at 150 mM (solid line) and 1M NaCl (dashed line) for the I24 mutant protein (B). MRE, mean residual ellipticity.



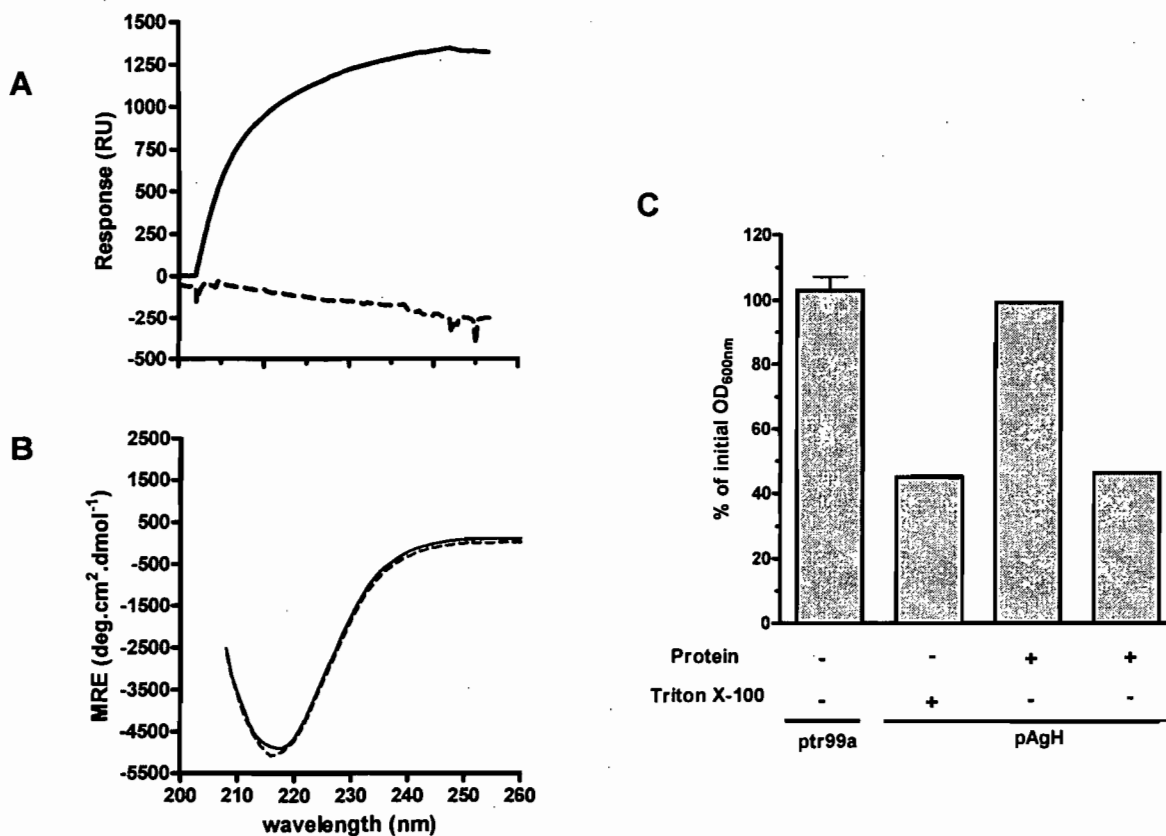
**Fig 6. : Cross-linking of AIDA-I at the surface of bacterial cells.**

Induced cultures of C600 bearing the plasmid pAgH (bar WT), the mutated plasmids S846L or I24 were incubated with no cross-link reagent or with 300  $\mu$ M of BS<sup>3</sup> for 30 min. Samples were diluted in 2X loading buffer and immunoblotted with an anti-AIDA antibody.



**Fig. 7: Effect of bacterial extracts on autoaggregation.**

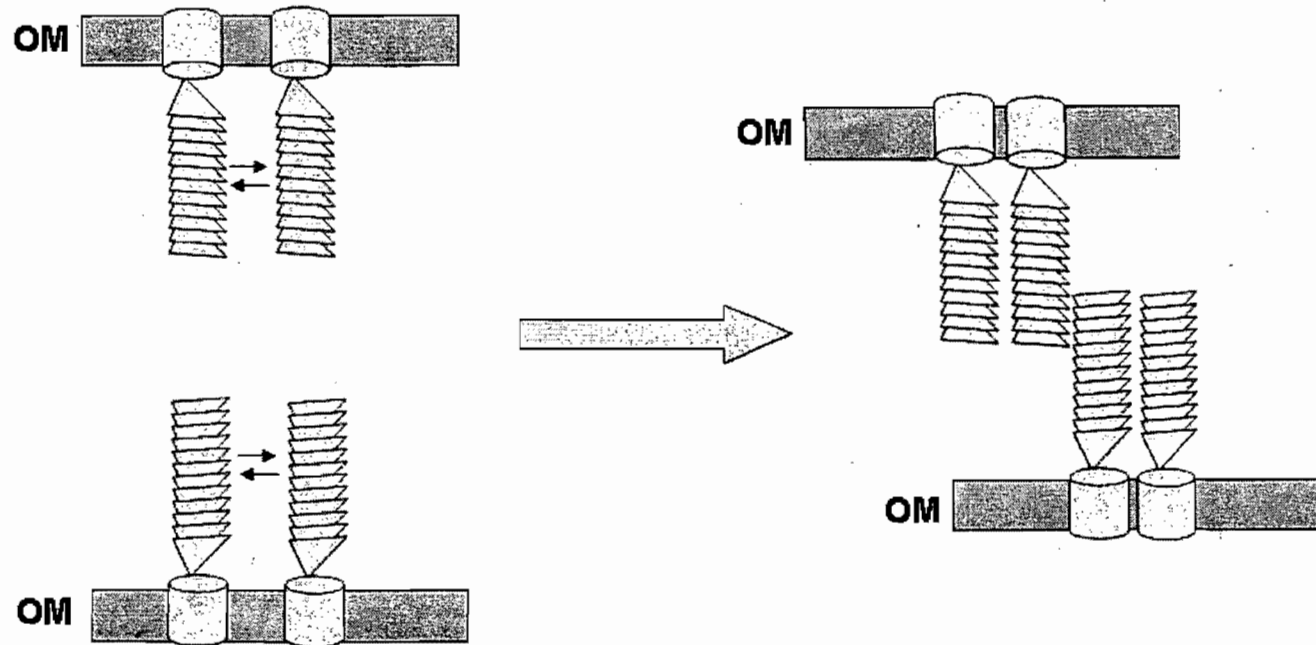
Bacterial cultures bearing the empty vector ptr99a or the plasmid pAgH were incubated with or without lysates (L) or membrane extracts (M) prepared from cultures harbouring the empty vector (bar -) or pAgH (bar WT). The assay was performed as described in the legend of Fig 2.



**Fig 8. : Effect of Triton X-100 on autoaggregation**

(A) SPR analysis of the effect of Triton X-100 on AIDA-I/AIDA-I interaction. Soluble AIDA-I was injected for 5 min at 30  $\mu$ l/ min at a concentration of 100 nM in TBS (solid line) or in TBS 0,05% Triton X-100 (dashed line) (B) CD analysis of the protein in Triton X-100 at 150 mM (solid line) and 1M NaCl (dashed line). The assay was performed as described in the legend of figure 5. MRE, mean residual ellipticity. (C) Bacterial cultures bearing the empty vector ptr99a or the plasmid pAgH were incubated with AIDA-I in the absence or the presence of 0,1% Triton X-100. The assay was performed as described in the legend of Fig 2.





**Fig 9. : Model for the autoaggregation of the AIDA-I autotransporter.**

Oligomers of AIDA-I on the surface of the same bacterial cell could interact with oligomers from neighbouring cells, probably by an overlap between different domains of the protein.

**ARTICLE 3****Design of peptide inhibitors of the adhesin involved in diffuse adherence  
(AIDA-I)****Victoria Girard, Manuel Campos, Frédéric Berthiaume and Michael Mourez\***

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

Running title: Inhibition of the AIDA-I autotransporter

Keywords: Autotransporter, AIDA-I, *Escherichia coli*, Phage Display, Peptide inhibitor

\*Corresponding author. Mailing address: Canada Research Chair on Bacterial Animal  
Diseases, Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, 3200 Sicotte, St-  
Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada. Phone: [REDACTED]  
[REDACTED]

Soumission à venir dans Antimicrobial Agents and Chemotherapy

## ABSTRACT

Adhesion of bacteria to host cells is a crucial event in pathogenesis of every bacterial disease and involves the specific interaction of a bacterial adhesin with a cell-surface ligand on the host cell. Inhibiting adhesion represents a powerful strategy to prevent infection and can be achieved by screening peptide libraries to identify inhibitors of adhesin-ligand interactions. We used this technique to isolate peptides from a phage display library that binds to the Adhesin Involved in Diffuse Adherence (AIDA-I), therefore precluding adhesion of bacteria expressing AIDA-I to epithelial cells. Panning was performed using purified protein, either immobilized or in solution, and whole bacteria expressing AIDA-I. Our results demonstrate that one peptide (P1 = GKMHAHPHLHNR) can specifically bind to AIDA-I on the surface of the bacteria and prevent adhesion in an *in vitro* model with an  $IC_{50}$  of 419  $\mu$ M. Our work represents a promising strategy to combat a variety of bacterial diseases.

## INTRODUCTION

The increase of antibiotic resistance of bacterial pathogens is a well-known threat (16, 19, 34) and the emergence of multidrug-resistant bacteria severely impairs the efficacy of classical antimicrobial chemotherapy (17, 33). It is therefore necessary to develop alternative ways of treating bacterial infections, like for example targeting bacterial virulence to inhibit pathogenesis (5, 14). This strategy consists in inhibiting mechanisms that promote infection, as for example adhesion of the pathogen to the host. Adhesion, which occurs early in the infectious process, enables the bacteria to resist to hydrodynamic flow forces, to colonize tissues, to form biofilms or to invade host cells (9). In most cases, specific bacterial proteins called adhesins bind to a cell-surface receptor on the host cell. Adhesins can be divided into two main groups : fimbrial adhesins and afimbrial adhesins (31). Two strategies have emerged to inhibit adhesion (5). The first consists in interrupting adhesion assembly, like for example pilus assembly (15, 26). The other consists in physically precluding pathogen adhesion to host cells. In the case of fimbrial adhesins

which are usually lectins (13), the use of carbohydrates derivatives of host ligand has showed efficacy to block adhesion (4, 12, 25, 28, 29). However, for many afimbrial adhesins, the receptor is unknown and other strategies to inhibit adhesion must be investigated, as in the case of the Adhesin Involved in Diffuse Adherence, AIDA-I. The receptor of AIDA-I at the surface of host cells is unknown, precluding the use of analogs of the receptor to inhibit adhesion. We used another strategy, which is the screen of peptide libraries, to identify inhibitors of protein-ligand interactions (20).

AIDA-I, isolated from the Diffusively Adherent *Escherichia coli* (DAEC) strain 2787, is a surface protein which mediates diffuse adherence to animal epithelial cells (3). The presence of the protein is frequently associated with diarrhea in piglets, an infectious disorder causing major economic losses (10, 11, 22, 23). AIDA-I is synthesized as a 132 kDa preprotein (32). A cleavable N-terminal signal sequence allows secretion across the inner membrane via the *Sec* pathway. The proprotein is then inserted in the outer membrane and is cleaved, which separates the surface-exposed N-terminal fragment, the mature AIDA-I adhesin, from the C-terminal membrane-embedded fragment, AIDAc. Despite cleavage, the two domains remain strongly associated at the bacterial surface (6, 32). AIDA-I is a multifunctional protein which mediates adhesion, invasion, biofilm formation and autoaggregation (30).

Here, we report the design and test of a peptide inhibitor that binds to AIDA-I, thereby blocking the adhesion of the bacteria to host cells. We identified a dodecameric peptide from a phage-display library that binds to AIDA-I and inhibits adhesion with an  $IC_{50}$  in the high micromolar range. This peptide represents a good starting point to develop a polyvalent inhibitor of adhesion.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and plasmids.** The *Escherichia coli* K-12 strain C600 (*F* *thr-1 leuB6 thi-1 lacY1 supE 44 rfbD1 fhuA21*) obtained from New England Biolabs and the pathogenic strain 2787 (3) were used in this study. The plasmids pAg and pAgH have been described previously (6). An AIDA-I negative mutant of 2787, 2787  $\Delta$ *aida*, was generated by allelic

exchange, as described previously for the porcine strain PD20 (27). Briefly, the donor strain *E. coli* SM10  $\lambda$ pir transformed with the suicide plasmid (pRE7AIDA::Gm) carrying the  $\Delta$ *aida* allele (27) was mated with the recipient *E. coli* 2787 cell. After incubation at 37°C overnight on blood agar plates, the exconjugants were selected onto M9 agar plates without thiamine containing ampicillin. The resulting colonies were spread onto LB agar plates containing 10% sucrose and gentamicin, and incubated at 30 °C for 18 h, in order to promote a double crossover event. A few desired colonies ( $Gm^r/Amp^s$ ) were cultured and confirmed for  $\Delta$ *aida* mutation by PCR.

**Bacterial and cell culture growth conditions.** Bacterial cultures containing the different plasmids were grown at 30°C on Luria-Bertani (LB) agar plates or in LB medium containing 100  $\mu$ g/ml of ampicillin. Overnight cultures from *E.coli* C600 were diluted 1:100 in LB and grown to an O.D.<sub>600nm</sub> of 0.8, at which point the expression of AIDA-I was induced overnight with 10  $\mu$ M of isopropyl- $\beta$ -d-thiogalactopyranoside (IPTG). Strain 2787 and 2787  $\Delta$ *aida* were grown on I-medium at 37°C (3).

Hep2 cells (ATCC CCL-23) were grown at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco), containing 10 mM sodium pyruvate (Sigma), bovine growth serum (Hyclone), 2.5  $\mu$ g/ml of fungizone and 100  $\mu$ g/ml of penicillin/streptomycin (Gibco).

**Purification of heat-extracted mature AIDA-I.** Heat-extracted mature AIDA-I was purified by gel filtration. 1-liter cultures of C600 harboring the plasmid pAg were grown until the O.D.<sub>600nm</sub> was 0.8 and induced overnight with 10  $\mu$ M IPTG. Cells were harvested and resuspended in 1/60 volume of 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7) and heated at 60 °C for 20 min to detach the adhesin from the cell surface. The treated samples were centrifuged for 20 min at 16,000 g to recover the heat extracts which were concentrated to a volume of 5 ml using Amicon Ultra centrifugal filters (Millipore). The supernatants were loaded on a Superdex 75 gel filtration column (3-70 kDa fractionation range; Amersham Biosciences) and run with 10mM sodium phosphate buffer (pH 7) with a flow rate of 1 ml/min. Fractions containing AIDA-I were collected in the void volume and protein was

detected by measuring the absorbance at 280 nm. The purity of the purified protein was evaluated by SDS-PAGE followed by staining with Coomassie Blue.

**Purification of whole his-tagged AIDA-I.** Purification of whole AIDA-I from membrane preparations was performed as previously described (6). Briefly, 1-liter cultures of C600 harboring the plasmid pAgH were grown until the O.D.<sub>600nm</sub> was 0.8 and induced overnight with 10  $\mu$ M IPTG. Cells were harvested and resuspended in 40 ml of Tris-Buffered Saline (TBS; 50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl) containing lysozyme (50  $\mu$ g/ml final concentration) and EDTA (10 mM final concentration). The cells were lysed using a French Press and an ultrasonic processor. The lysate was centrifuged for 50 min in an ultracentrifuge at 250,000 g. The pellets, containing bacterial membranes, were resuspended in TBS containing 1% Triton X-100, incubated for one hour on ice and centrifuged for 50 min in an ultracentrifuge at 250,000 g. The supernatant, containing the HisG-tagged AIDA-I, was purified by immobilized metal affinity chromatography using a His Trap HP column (Amersham Biosciences) and the purification was performed using an ÄKTA purifier system according to the instruction of the manufacturer. The purity of the protein was evaluated by SDS-PAGE followed by staining with Coomassie Blue. The concentration of the protein was measured with the BCA Protein Assay kit (Pierce).

**Phage-display selection.** M13 phage libraries (New England Biolabs, Beverly, MA) displaying random 12-mer, 7-mer and cyclic 7-mer peptides were used for panning. Only the 12-mer library gave reliable results. Three types of selections were performed. For each selection, all the tubes were blocked with 2% BSA in PBS for 1 h and washed with PBS buffer. In selection A, heat-extracted purified mature AIDA-I (2  $\mu$ g/ml) was coated in Maxisorp tubes (Nunc, Denmark) in PBS overnight at 4°C. An M13 phage library ( $1.510^{11}$  pfu in PBS) was added in an empty plastic tube for 1 h at room temperature and the supernatant was transferred to the tube containing AIDA-I. After 1 h binding at room temperature, the tubes were washed with PBS-Tween 0.5%. The remaining bound phages were eluted by adding heat-extracted purified AIDA-I (10  $\mu$ g/ml and 1 hour at room temperature). The amplified phage pool was panned again as described above for three to four times, except that the binding and elution incubation times varied between rounds. For

selection B, the M13 library at the same concentration was added to tubes containing purified His-tagged whole AIDA-I in PBS (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 30 min. Bound phages were trapped with 200  $\mu\text{l}$  of nickel-agarose beads (Amersham Biosciences) for 20 min. After extensive washing of the beads with PBS-Tween 0.5%, the remaining bound phages were eluted with 300 mM imidazole for 20 min. The amplified phage pool was panned again as described above for three times. For selection C on whole bacteria, the M13 library ( $1.5 \times 10^{11}$  pfu in PBS) was panned against  $10^8$  cfu/ml of 2787 resuspended in PBS. After 1 h incubation at room temperature, mild-heat elution (60°C, 20 min) was performed to release AIDA-I from the bacterial surface (3) and phages adsorbed to it. Finally, a counter-selection was performed with  $10^8$  pfu/ml of the *aida*<sup>-</sup> isogenic mutant of 2787 (2787 $\Delta$ *aida*) for 1 h at room temperature, in order to eliminate phages that bound to other proteins on the surface of bacteria. The amplified phage pool was panned again as described above for three times, except that the binding and elution incubation times varied between rounds.

**Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.** For ELISA on purified protein, 1  $\mu\text{g}$  of protein (His-tagged whole AIDA-I, MBP or GST) was coated in the wells of a 96-well plate overnight at 4°C at 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS. The wells were blocked with PBS-BSA 2% for 2 h. Phages ( $2 \times 10^{10}$  pfu) were allowed to bind to the coated surface for 1 h. After extensive washing with PBS, bound phages were revealed using a monoclonal M13 antibody coupled to horseradish peroxidase. Immune complexes were revealed using a 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine solution for an enzyme-linked immunosorbent assay (Sigma).

For ELISA on bacteria, each well of a 96-well plate was coated overnight at 37°C with  $10^8$  bacteria from cultures of C600 bearing the empty plasmid or pAgH induced for 3 hours with 10  $\mu\text{M}$  IPTG. The bacteria were then fixed with methanol for 2 hours at 37°C and the wells were blocked with PBS-BSA 2% for 2 h. Phages ( $1 \times 10^{10}$  pfu) were allowed to bind to the coated surface for 1 h and after extensive washing, bound phages were revealed as previously described. Experiments were performed in duplicate at least twice.

**Peptide synthesis.** Peptides were synthesized from Canpeptide (Montréal, Canada). Their N-termini were acetylated and their C-termini amidated. All peptides were purified to >90% homogeneity and characterized by HPLC and mass spectrometry.

**Adhesion assays.** The adhesion assay was performed as previously described (6). Hep-2 cells were grown in 24-well plates or 96-well plates and inoculated with  $10^6$  CFU per well of C600 harboring empty vector or pAgH in the presence of different concentrations of peptides. Cells were washed with PBS. Bacteria adhering to cells were recovered with 100  $\mu$ l of 1% Triton X-100 and plated for numbering. Adherence was calculated by dividing the number of adherent bacteria by the number of bacteria found in the inoculum after 3 h of incubation. The  $IC_{50}$  was obtained by non-linear regression fitting to a sigmoidal dose-response using Prism 4.0 (GraphPad Software).

**Autoaggregation assays.** Autoaggregation assays were performed on microscope slides. Overnight cultures of C600 harboring the empty vector or the plasmid pAgH were grown until the  $O.D._{600nm}$  was 0.8 and induced overnight with 10  $\mu$ M IPTG. The cultures were normalized to the same  $O.D._{600nm}$  of 0.04 in 1 ml LB and vortexed for 10 seconds. 20  $\mu$ l of each suspension was spotted on a microscope slide and incubated at 4°C in the absence or in the presence of 1.5 mM of peptide. Aggregates of bacteria were examined after 3 h of incubation with a phase-contrast Leica DMI4000B microscope (Meyer Instruments).

**Surface Plasmon Resonance.** SPR measurements were carried out using a Biacore 3000 instrument (Biacore AB, Uppsala, Sweden). Experiments were performed on research-grade CM5 sensor chips at 25°C using filtered (0.2  $\mu$ m) and degassed HBS-EP (10 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% (v/v) Tween-20) for the immobilisation procedure. Immobilized sensor chip surfaces were prepared using the Amine Coupling Kit (Biacore AB), according to the instructions of the manufacturer. Corresponding blank surfaces were prepared in a similar manner without any ligand addition. To assess the binding of the peptides to AIDA-I, the peptides diluted in HBS-EP at 1.5 mg/ml were injected over immobilized surface for 5 min at 15  $\mu$ l/min using 'KINJECT' mode. No regeneration was needed between sample injections. Raw data were exported in the GraphPad Prism software. All binding data are representative of duplicate injections acquired from at least two independent trials.



## RESULTS

**Selection of phages binding to AIDA-I by phage display.** To develop an inhibitor of adhesion, we used phage-display to identify peptides that bind to AIDA-I. Three protocols were designed to select members of phage libraries that bind to the adhesin (Figure 1). The first protocol consisted in immobilizing purified heat-extracted mature AIDA-I on a polystyrene surface and exposing it to libraries of M13 phages presenting random 12-residues, 7-residues or cyclic 7-residues. After incubation, phages of interest were eluted by adding heat-extracted mature AIDA-I in excess (Figure 1A). We used heat-extracted protein so as to screen the library for binding to the extracellular portion of AIDA-I, which is released by this treatment. However, heat-extraction causes AIDA-I to partially denature (6). It is possible that selected phages will bind only to linear epitopes of the protein. To alleviate this problem, we used solubilized His-tagged whole AIDA-I in a second protocol. After the incubation with the protein, phages bound to AIDA-I were trapped by nickel-agarose beads and eluted by adding imidazole (Figure 1B). Lastly, a third selection was performed on the wild-type strain 2787 expressing AIDA-I on its surface to select phages binding to AIDA-I in its native context (Figure 1C). The phages bound to the protein on the surface of 2787 were eluted by a brief heat treatment, which is known to release the mature AIDA-I from the bacterial surface (3). A counter selection was performed on the *aida*<sup>-</sup> isogenic mutant of 2787 to eliminate phages bound to other bacterial surface components.

After three to four cycles for each protocol, we isolated phages displaying different peptides which can be classified into two groups based on their sequence similarities. Only the selection with the library presenting 12-mer residues gave reliable results. In the first group, the consensus sequence AHXHLHNR was identified. Four 12-mer peptides share the sequence H[N/H]R and three the extended sequence LH[N/H]R (Figure 2). This extended sequence was obtained 15 times during the different screens, some peptides being isolated more than one time. Five 12-mer peptides also share the sequence H[P/R]H and four the extended sequence AH[P/R]H. In the second group, the consensus sequence TLPXP was identified. Three 12-mer peptides share the sequence LP[N/S]P and two the extended sequence TLP[N/S]P.

**Binding of the selected phages to AIDA-I.** We selected one phage from the first group displaying the peptide P1 (GKMHAHPHLHNR) which contained the consensus sequence AHXHLHNR and two phages from the second group displaying peptides P2 (TLPSPLALLTVH) and P3 (ENYTLPNPSLFS) which shared the extended sequence TLP[N/S]P. We tested their ability to bind to AIDA-I either coated on a polystyrene plate or presented on the surface of methanol-fixed bacteria (Figure 3). A phage isolated from a screen against GST was used as control. ELISA showed that each of the selected phages bind to AIDA-I and did not bind to the irrelevant proteins GST and MBP, which showed that the phages had a good specificity towards AIDA-I (Figure 3A). The three phages can also bind specifically to AIDA-I on the surface of bacteria fixed on a polystyrene plate (Figure 3B). This result suggested that the phages can also bind to native AIDA-I if we consider that the protein is not altered during the fixation step of bacterial cells.

Altogether, our results showed that the three phages bearing the peptides P1, P2 and P3 had a good specificity towards AIDA-I.

**Inhibitory activity of the selected peptides.** The three dodecapeptides (P1 to P3) were synthesized and P1 and P2 were tested for their ability to bind to AIDA-I in real-time using SPR (Figure 3C). We observed that only P1 can bind to AIDA-I immobilized on the surface of the chip. It was not possible to measure the affinity of P1 for AIDA-I as the concentration needed to reach a steady-state plateau was too high but the data obtained indicated that the affinity was in the millimolar range. P1 binding also appeared to exceed the theoretical maxima predicted for 1:1 binding stoichiometry with AIDA-I ( $R_{max}$  : 96 RU for 5000 RU AIDA-I surface), suggesting that P1 can bind on different sites on the protein.

The peptides were then tested for their capacity to inhibit adhesion *in vitro* by incubating Hep-2 cells with bacteria expressing AIDA-I in the presence of different concentrations of peptides. At a concentration of 100  $\mu$ M, no peptide had any inhibitory activity (data not shown). At 1mM, only P1 was found to disrupt significantly the binding of bacteria to the cells (Figure 4A). The control peptide used for the ELISA assays was not soluble in water and cannot be used for the adhesion test. The peptides were also tested for their ability to inhibit autoaggregation. AIDA-I is able to autoaggregate, presumably by

interacting with itself (30). We performed the autoaggregation assays on microscopic slides instead of glass tubes to reduce the amount of peptides needed. We incubated bacteria expressing AIDA-I with 1.5 mM of peptide and left the cultures autoaggregate for 3h at 4°C. The results showed that P1 had a noticeable effect on autoaggregation while P2 and P3 had minor effects (Figure 4C). To further quantify the inhibitory activity of P1, we measured the adhesion of bacteria expressing AIDA-I in the presence of different concentrations of peptide. As shown in Figure 4C, P1 can inhibit adhesion in a dose-dependent and saturable manner with an  $IC_{50}$  of approximately 419  $\mu$ M. Viable cell counts showed that P1 did not affect bacterial viability (data not shown). Altogether, our results showed that P1 can inhibit adhesion and autoaggregation.

## DISCUSSION

In this study, we used phage display screening to design peptide inhibitors of bacterial adhesion. Our work represents a novel anti-adhesion approach. The strategy of screening peptide libraries has mainly been used to design inhibitors of toxin assembly (2, 21) or of essential bacterial enzymes (8, 24) but, to our knowledge, not to target adhesins. In contrast to the use of carbohydrates to block adhesion (4, 12, 25, 28, 29), our approach does not require a known receptor for the adhesin and may be broadly applicable to inhibit adhesion of a wide range of pathogens. In the context of bacterial resistance to antibiotics, our strategy may thus represent a valuable tool to quickly combat infection.

The main obstacle of our screening was the multifunctionality of the protein. The mature AIDA-I contains approximately 35 imperfect repeats of a 19-amino-acid sequence (30), which could be at first considered as repeat motifs of the same binding site. A recent study by our team showed that it was not the case and that AIDA-I contained multiple binding domains and probably engaged multiple receptors (7). The variety of peptide sequences obtained in our study may thus reflect the fact that AIDA-I can bind to a wide variety of substrates. However, the analysis of all the peptides sequences obtained in this study with the RELIC suite of programs, which evaluates statistical properties of affinity-selected peptides (18), showed that the screening was statistically significant. The affinity-selected peptides contained a less diverse population compared to the parent library.

Among all the peptides selected, we identified a peptide, P1, which can inhibit adhesion. However, its low affinity for AIDA-I and its weak inhibitory activity precludes its direct use as an inhibitor. It still represents a good starting point to develop a more effective polyvalent inhibitor. Multivalency has been used in many cases to increase the affinity of the carbohydrates for the target adhesins (1, 12, 28). In our case, P1 could be attached to a polymer with a flexible backbone in order to enhance its affinity towards the surface of bacteria expressing multiple copies of AIDA-I (2, 21).

In conclusion, our study represents the proof of principle of a novel anti-adhesion approach using the screen of random peptide libraries. Considering the fact that most pathogens present multiple adhesins that can be expressed differentially during the time course of infection, universal anti-adherence drugs represent a major challenge and are often used in combination with antibiotics (5). In this regard, our approach could allow the rapid and inexpensive discovery of adhesion inhibitors that could be valuable adjuncts to antibiotic therapy.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by financial contributions from the Groupe de Recherche et d'Etudes sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC discovery grant 262746) and the Canada Research Chair program.

#### **REFERENCES**

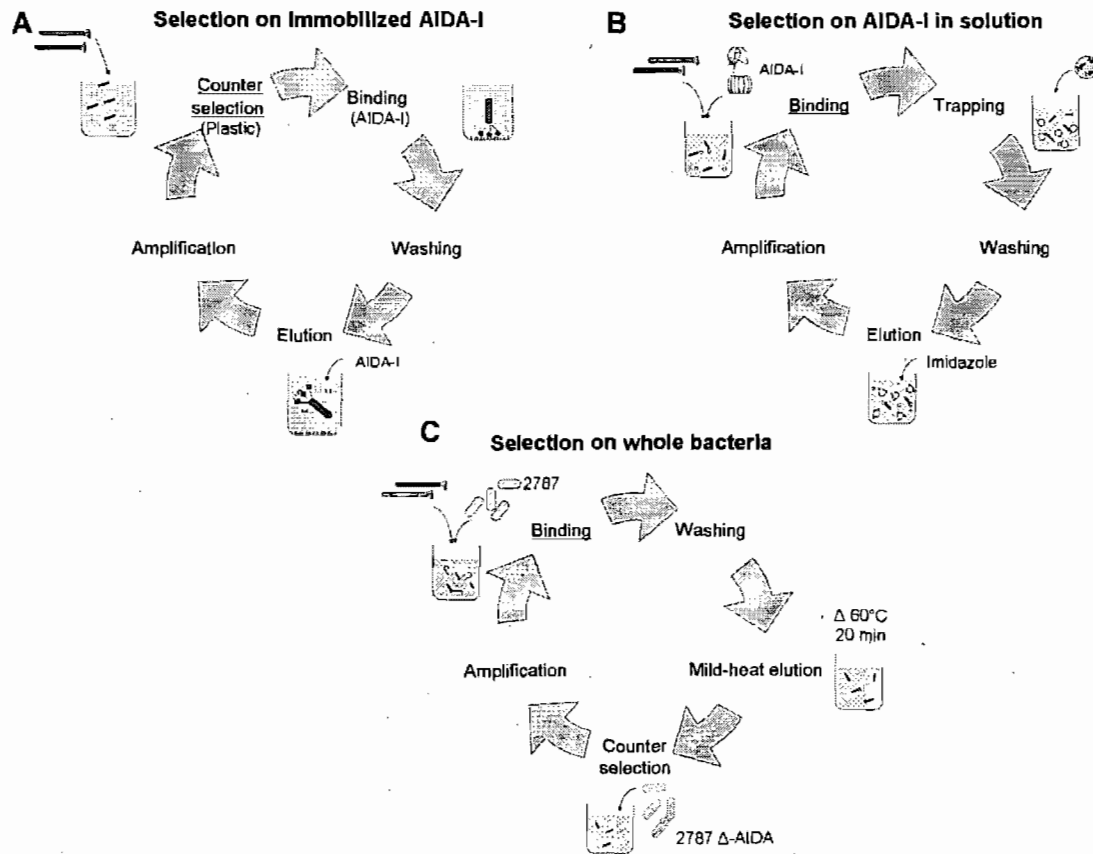
1. **Autar, R., A. S. Khan, M. Schad, J. Hacker, R. M. Liskamp, and R. J. Pieters.** 2003. Adhesion inhibition of F1C-fimbriated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* PAK and PAO by multivalent carbohydrate ligands. *Chembiochem* **4**:1317-25.
2. **Basha, S., P. Rai, V. Poon, A. Saraph, K. Gujraty, M. Y. Go, S. Sadacharan, M. Frost, J. Mogridge, and R. S. Kane.** 2006. Polyvalent inhibitors of anthrax toxin that target host receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:13509-13.
3. **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.
4. **Bouckaert, J., J. Berglund, M. Schembri, E. De Genst, L. Cools, M. Wuhrer, C. S. Hung, J. Pinkner, R. Slattegard, A. Zavialov, D. Choudhury, S. Langermann, S. J. Hultgren, L. Wyns, P. Klemm, S. Oscarson, S. D. Knight, and H. De Greve.** 2005. Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the *Escherichia coli* FimH adhesin. *Mol Microbiol* **55**:441-55.
5. **Cegelski, L., G. R. Marshall, G. R. Eldridge, and S. J. Hultgren.** 2008. The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nat Rev Microbiol* **6**:17-27.
6. **Charbonneau, M. E., F. Berthiaume, and M. Mourez.** 2006. Proteolytic processing is not essential for multiple functions of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I). *J Bacteriol* **188**:8504-12.
7. **Charbonneau, M. E., and M. Mourez.** 2007. Functional organization of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. *J Bacteriol* **189**:9020-9.
8. **El Zoeiby, A., F. Sanschagrin, A. Darveau, J. R. Brisson, and R. C. Levesque.** 2003. Identification of novel inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* MurC enzyme derived from phage-displayed peptide libraries. *J Antimicrob Chemother* **51**:531-43.
9. **Finlay, B. B., and P. Cossart.** 1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* **276**:718-25.
10. **Ha, S. K., C. Choi, and C. Chae.** 2003. Prevalence of a gene encoding adhesin involved in diffuse adherence among *Escherichia coli* isolates in pigs with postweaning diarrhea or edema disease. *J Vet Diagn Invest* **15**:378-81.

11. **Ha, S. K., C. Choi, K. Jung, J. Kim, D. U. Han, Y. Ha, S. D. Lee, S. H. Kim, and C. Chae.** 2004. Genotypic prevalence of the adhesin involved in diffuse adherence in *Escherichia coli* isolates in pre-weaned pigs with diarrhoea in Korea. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **51**:166-8.
12. **Joosten, J. A., V. Loimaranta, C. C. Appeldoorn, S. Haataja, F. A. El Maate, R. M. Liskamp, J. Finne, and R. J. Pieters.** 2004. Inhibition of *Streptococcus suis* adhesion by dendritic galabiose compounds at low nanomolar concentration. *J Med Chem* **47**:6499-508.
13. **Karlsson, K. A.** 1995. Microbial recognition of target-cell glycoconjugates. *Curr Opin Struct Biol* **5**:622-35.
14. **Klemm, P., V. Hancock, M. Kvist, and M. A. Schembri.** 2007. Candidate targets for new antivirulence drugs: selected cases of bacterial adhesion and biofilm formation. *Future Microbiol* **2**:643-53.
15. **Larsson, A., S. M. Johansson, J. S. Pinkner, S. J. Hultgren, F. Almqvist, J. Kihlberg, and A. Linusson.** 2005. Multivariate design, synthesis, and biological evaluation of peptide inhibitors of FimC/FimH protein-protein interactions in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Med Chem* **48**:935-45.
16. **Levy, S. B.** 2005. Antibiotic resistance-the problem intensifies. *Adv Drug Deliv Rev* **57**:1446-50.
17. **Levy, S. B., and T. F. O'Brien.** 2005. Global antimicrobial resistance alerts and implications. *Clin Infect Dis* **41 Suppl 4**:S219-20.
18. **Mandava, S., L. Makowski, S. Devarapalli, J. Uzubell, and D. J. Rodi.** 2004. RELIC--a bioinformatics server for combinatorial peptide analysis and identification of protein-ligand interaction sites. *Proteomics* **4**:1439-60.
19. **Morell, V.** 1997. Antibiotic resistance: road of no return. *Science* **278**:575-6.
20. **Mourez, M., and R. J. Collier.** 2004. Use of phage display and polyvalency to design inhibitors of protein-protein interactions. *Methods Mol Biol* **261**:213-28.
21. **Mourez, M., R. S. Kane, J. Mogridge, S. Metallo, P. Deschatelets, B. R. Sellman, G. M. Whitesides, and R. J. Collier.** 2001. Designing a polyvalent inhibitor of anthrax toxin. *Nat Biotechnol* **19**:958-61.

22. **Ngeleka, M., J. Pritchard, G. Appleyard, D. M. Middleton, and J. M. Fairbrother.** 2003. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J Vet Diagn Invest* **15**:242-52.
23. **Niewerth, U., A. Frey, T. Voss, C. Le Bouguenec, G. Baljer, S. Franke, and M. A. Schmidt.** 2001. The AIDA autotransporter system is associated with F18 and stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**:143-9.
24. **Paradis-Bleau, C., F. Sanschagrín, and R. C. Levesque.** 2005. Peptide inhibitors of the essential cell division protein FtsA. *Protein Eng Des Sel* **18**:85-91.
25. **Pieters, R. J.** 2007. Intervention with bacterial adhesion by multivalent carbohydrates. *Med Res Rev* **27**:796-816.
26. **Pinkner, J. S., H. Remaut, F. Buelens, E. Miller, V. Aberg, N. Pemberton, M. Hedenstrom, A. Larsson, P. Seed, G. Waksman, S. J. Hultgren, and F. Almqvist.** 2006. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:17897-902.
27. **Ravi, M., M. Ngeleka, S. H. Kim, C. Gyles, F. Berthiaume, M. Mourez, D. Middleton, and E. Simko.** 2007. Contribution of AIDA-I to the pathogenicity of a porcine diarrheagenic *Escherichia coli* and to intestinal colonization through biofilm formation in pigs. *Vet Microbiol* **120**:308-19.
28. **Salminen, A., V. Loimaranta, J. A. Joosten, A. S. Khan, J. Hacker, R. J. Pieters, and J. Finne.** 2007. Inhibition of P-fimbriated *Escherichia coli* adhesion by multivalent galabiose derivatives studied by a live-bacteria application of surface plasmon resonance. *J Antimicrob Chemother* **60**:495-501.
29. **Sharon, N.** 2006. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochim Biophys Acta* **1760**:527-37.
30. **Sherlock, O., M. A. Schembri, A. Reisner, and P. Klemm.** 2004. Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. *J Bacteriol* **186**:8058-65.
31. **Soto, G. E., and S. J. Hultgren.** 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol* **181**:1059-71.

32. **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.
33. **Wenzel, R. P., and M. B. Edmond.** 2000. Managing antibiotic resistance. *N Engl J Med* **343**:1961-3.
34. **Williams, R. J., and D. L. Heymann.** 1998. Containment of antibiotic resistance. *Science* **279**:1153-4.





**Fig. 1 : Selection of bacteriophages binding on AIDA-I by panning a 12-mer peptide library against immobilized AIDA-I (A), AIDA-I in solution (B) or AIDA-I on the surface of bacterial cells (C).**

All the selections include the steps of binding, washing, elution and amplification. See text for details.

**A**

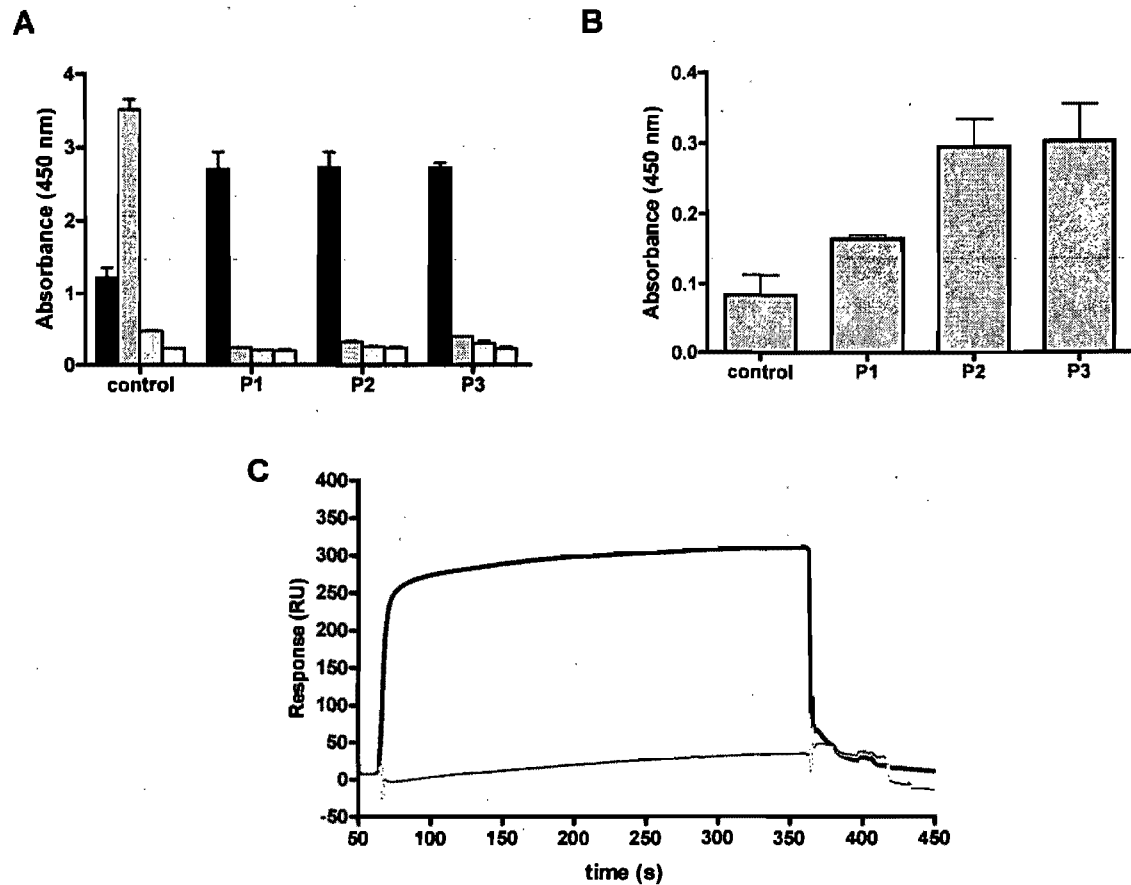
WPVAGH <b>QL</b> HTRG	(B) (1)
DSLRP <b>SHLHN</b> WH	(B) (1)
GKAHHG <b>HNR</b> IMP	(A) (1)
FLPLHSS <b>SLHHR</b>	(B) (1)
<b>LHNR</b> NKTNLRQP	(A) (5)
GKMHA <b>PHLHN</b> R	(A) (9)
<b>AHP</b> WHNSLSRH	(B) (1)
<b>AHR</b> HPISFLSTL	(C) (1)
KHPWSD <b>MAHR</b> RT	(B) (1)
ST <b>HRH</b> YHDTLA	(C) (1)

**B**

QVYVHR <b>L</b> PNIHT	(B) (1)
ENY <b>TLP</b> NSLFS	(B) (1)
<b>ALPN</b> PPWTSHTA	(B) (1)
HSS <b>LKLP</b> NLSHR	(B) (1)
<b>TLPS</b> PLALLTVH	(C) (1)
NN <b>LPS</b> YLLALPW	(C) (1)
<b>FLPL</b> HSSSLHHR	(B) (1)
NY <b>LPL</b> LESSLQY	(C) (1)
AMVTN <b>LPL</b> RA	(A) (1)

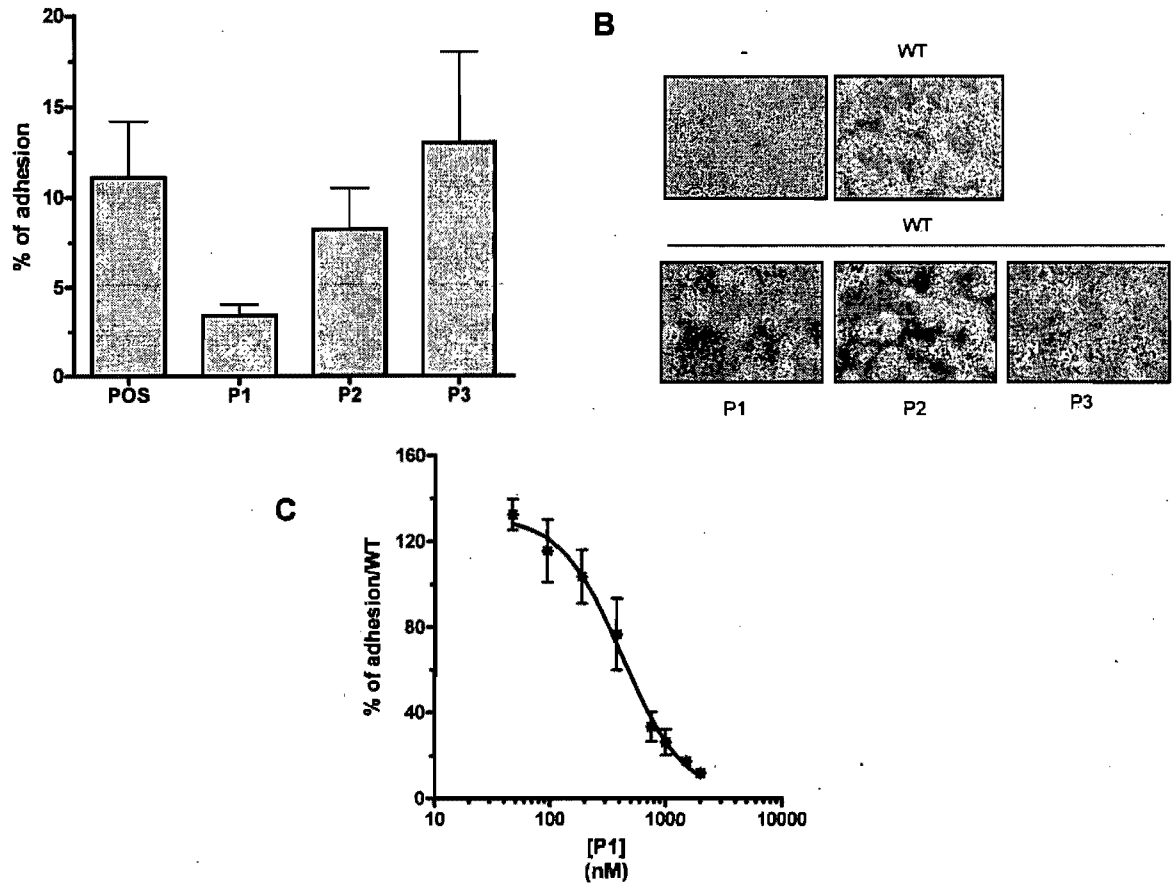
**Fig. 2 : Sequences of peptides isolated from screening the 12-mer phage display library.**

The letters indicate the selection from which the peptides were isolated according to the legend of Figure 1. The consensus sequences are shown in bold. The numbers in brackets indicate the number of times the phages were isolated.



**Figure 3: Affinity and specificity of the selected phages and peptides.**

(A) Phages were added to wells containing 1  $\mu$ M of AIDA-I (black bars), GST (dark grey bars), MBP (light grey bars) or polystyrene (white bars). (B) Phages were allowed to bind to wells containing methanol-fixed C600 harboring the empty vector or the plasmid pAgH. Binding to AIDA-I was evaluated by subtracting the data obtained for C600 ptr99a to the data obtained for C600 pAgH. (C) Representative binding curves obtained by injection of 1.5 mg/ml of the synthesized peptides P1 (black line) and P2 (grey line) on the surface of a chip coupled with 5000 RU of AIDA-I.



**Figure 4 : Inhibitory activities of the selected peptides.**

(A) Inhibition of adhesion of C600 pAgH to Hep2 cells in the presence of 100  $\mu$ M of selected peptides. The percentage of adhesion is calculated by dividing the number of adherent bacteria by the number of bacteria found in the inoculum after 3 h of incubation. (B) Phase-contrast microscopy of C600 overnight cultures harbouring the empty plasmid ptr99 (-) or the plasmid pAgH (WT) in the presence of 1.5 mM of peptides. (C) Dose-dependant inhibition of adhesion obtained by inoculation of Hep-2 cells with  $10^6$  CFU per well of C600 harboring empty vector or pAgH in the presence of different concentrations of peptides. The data represented here are the percentage of adhesion relative to the strain C600 pAgH in the absence of peptides. An  $IC_{50}$  of around 419  $\mu$ M was obtained by non-linear regression fitting to a sigmoidal dose-response.

## **DISCUSSION**

## 1. Étude de la glycosylation du domaine extracellulaire d'AIDA-I

Notre étude de la glycosylation du domaine passager a permis d'identifier dix peptides présentant un nombre variable de résidus heptoses. Le nombre total d'heptoses trouvés suggère qu'au moins 19 résidus peuvent être greffés sur une molécule d'AIDA-I, ce qui est en accord avec l'étude réalisée par le groupe de Schmidt en 2001 (25). De plus, nous avons montré que les heptoses étaient greffés sur les résidus sérine et thréonine, démontrant ainsi pour la première fois la O-glycosylation d'AIDA-I.

Un des points restant à élucider est de savoir comment la glycosyltransférase Aah reconnaît son substrat. Pour AIDA-I et Ag43 (138, 261), les heptoses sont retrouvés au niveau de la région de la protéine composée de répétitions imparfaites de 19 acides aminés. Benz et Schmidt proposent que ces séquences présentes chez tous les SAAT servent de sites de reconnaissance pour les heptosyltransférases (25). Cependant, concernant AIDA-I, le nombre de 30 répétitions ne corrèle pas avec les 19 résidus heptoses identifiés. A cet égard, il est intéressant de noter que, contrairement à la N-glycosylation, aucune séquence consensus n'a été identifiée pour la O-glycosylation, aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes (286, 308).

D'autres mécanismes de reconnaissance du substrat ont été proposés. L'enzyme pourrait par exemple reconnaître une structure tertiaire spécifique de la protéine ou glycosyler préférentiellement les résidus accessibles une fois la protéine repliée. Par exemple, dans le modèle de glycosylation de la flagelline de *Campylobacter jejuni*, seuls les résidus Ser/Thr exposés à l'extérieur de la protéine repliée sont glycosylés (292). Cette hypothèse semble improbable pour Aah. La glycosylation d'AIDA-I semble en effet cytoplasmique : Aah ne possède pas de séquence signal et il est possible d'obtenir AIDA-I glycosylée en fusion avec GST dans le cytoplasme (Figure 6, article 1). Or, avant son transport par le système *Sec*, AIDA-I n'est pas repliée puisque ce système ne prend en charge que les substrats dépliés. Cela exclut donc la possibilité qu'Aah reconnaisse une structure tertiaire spécifique de la protéine, comme par exemple une partie de l'hélice  $\beta$ .

Par contre, Aah pourrait reconnaître des éléments de structure secondaire, tels les brins  $\beta$ , qui peuvent déjà être formés au niveau du cytoplasme. Aah grefferait alors les

heptoses sur les résidus Ser/Thr situés à proximité de ces brins. Si l'on se base sur la prédiction de structure d'AIDA-I, il est intéressant de noter que la majorité des sérines glycosylées sont situées dans les boucles entre deux brins  $\beta$  (Figure 8). De plus, sur les 35 sérines présentes dans la boucle  $\beta 1/\beta 2$ , 9 sont glycosylées alors que sur les 19 sérines de la boucle  $\beta 2/\beta 3$  et les 31 sérines de la boucle  $\beta 3/\beta 1$ , 3 seulement sont glycosylées pour chaque boucle. Il est donc tentant de spéculer qu'Aah reconnaît préférentiellement la boucle  $\beta 1/\beta 2$  dans le cytoplasme, s'y « ancre » et glycosyle les sérines situées entre ces deux brins. Cependant, si la séquence répétée est effectivement reconnue par la glycosyltransférase, pourquoi seulement 19 résidus heptoses sont-ils greffés alors qu'il existe trente répétitions de cette séquence ? Par ailleurs, la glycosylation spécifique de motifs particuliers de la protéine n'explique pas pourquoi la glycosylation d'AIDA-I et d'Ag43 (261) est hétérogène.

Pour les thréonines, notre étude ne permet pas de suggérer un motif puisque nous n'avons identifié qu'une seule thréonine modifiée. Pour Ag43, les 9 thréonines glycosylées par Aah ne sont pas situées au sein des motifs répétés (138). On ne sait donc pas comment Aah reconnaît les résidus thréonines et il ne semble pas que ce soit un mécanisme similaire à celui de la reconnaissance des sérines, ce qui peut sembler surprenant.

Notre étude montre aussi le rôle de la glycosylation sur la stabilité de la protéine. De nombreux rôles ont en effet été spéculés pour la glycosylation des protéines procaryotes, comme par exemple permettre l'évasion du système immunitaire (92, 277) ou la résistance aux protéases (286). Dans cette étude, nous montrons que la glycosylation est nécessaire à l'adhésion mais pas à l'autoagrégation et la formation de biofilm, ce qui confirme les observations des groupes de Schmidt et Klemm (25, 262). Il a été proposé que les sucres soient impliqués dans la reconnaissance du récepteur, comme cela a déjà été démontré pour la protéine de membrane externe de *Chlamydia trachomatis* (146, 283). Cependant, contrairement à cette étude où l'ajout de sucres dans le tampon inhibe l'adhésion de manière dose-dépendante, l'ajout d'heptoses n'inhibe pas l'adhésion d'Ag43 ni d'AIDA-I aux cellules épithéliales (25, 261). Nous proposons donc que la glycosylation affecte plutôt la conformation et la stabilité de la protéine. Cette hypothèse repose sur plusieurs données expérimentales obtenues au cours de notre étude.

Premièrement, AIDA-I non glycosylée est présente en moins grande quantité à la surface de la bactérie par rapport à AIDA-I glycosylée, en accord avec une observation précédente du groupe de Schmidt (25). De plus, AIDA-I non glycosylée présente un profil de dégradation important et est plus sensible à la dégradation par la trypsine et la protéinase K. Cela suggère que la forme non glycosylée est dans une conformation moins stable et est donc par conséquent plus sensible aux protéases. L'induction d'un stress extra-cytoplasmique par la présence de la forme non glycosylée de la protéine conforte aussi cette hypothèse. En effet, la présence de protéines dans une conformation anormale ou mal repliée est le plus souvent à l'origine d'un stress induisant la production de catalyseurs de repliement et d'enzymes, comme la protéine DegP (184). L'utilisation d'une souche rapportrice contenant le gène *lacZ* fusionné au promoteur de *degP* nous a permis de montrer que DegP était activé en présence d'AIDA-I non glycosylée, ce qui suggère que celle-ci serait mal repliée ou dans une conformation aberrante. Rien n'indique cependant que DegP dégrade la forme non glycosylée de la protéine.

Nous proposons donc que les sucres sont nécessaires pour qu'AIDA-I adopte une conformation stable lui permettant d'adhérer aux cellules. Le fait que l'adhésion soit affectée par la glycosylation serait du à la conformation anormale et instable de la forme non glycosylée. AIDA-I non glycosylée ne pourrait plus interagir avec le récepteur à la surface des cellules épithéliales et serait aussi rapidement dégradée à la surface de la bactérie, du fait de sa plus grande sensibilité aux protéases. Finalement, nous montrons aussi que la forme non glycosylée de la protéine fusionnée à la GST adhère aussi bien aux cellules épithéliales que la forme glycosylée, ce qui conforte l'hypothèse que les sucres ne sont pas impliqués dans l'adhésion.

L'influence de la glycosylation sur la stabilité de la protéine a été mis en évidence pour d'autres protéines procaryotes (113, 120, 153). Par exemple, l'antigène de 19kDa de *Mycobacterium tuberculosis* est protégé du clivage protéolytique par la glycosylation (113). Les cellulases glycosylées de *Cellulomonas fimi* sont aussi moins susceptibles aux protéases que leurs équivalents non glycosylés (153). Notre hypothèse est aussi corroborée par deux études récentes sur l'adhésine TPS HMW1 d'*Haemophilus influenzae* (99) et sur Ag43 (138). L'étude sur HMW1 montre que la glycosylation a un effet sur la stabilité de l'adhésine et sur son ancrage à la membrane externe (99). En



l'absence de glycosylation, la protéine est relâchée dans le surnageant, ce qui diminue l'adhésion de la bactérie aux cellules. L'étude sur Ag43 montre que la forme glycosylée de la protéine est plus résistante à la dénaturation thermique et chimique (138). De plus, sa cinétique de repliement est plus rapide. Dans cette optique, il serait intéressant de comparer les formes glycosylées et non glycosylées d'AIDA-I par des techniques classiques, telles que la dénaturation chimique ou le dichroïsme circulaire. Étant donné que nous ne pouvons pas purifier la forme non glycosylée d'AIDA-I en raison de son instabilité, il serait nécessaire de déglycosyler la protéine par une méthode chimique, par exemple en employant de l'hydrazine (39, 147). Nous pourrions aussi muter les sérines et thréonine glycosylées afin d'identifier quels sont les résidus qui affectent la conformation de la protéine.

Une autre observation intéressante est que la glycosylation n'est pas nécessaire à l'autoagrégation pour TibA, AIDA-I et Ag43 (136). Si la glycosylation affecte effectivement la stabilité de la protéine, pourquoi l'autoagrégation, contrairement à l'adhésion, est-elle encore possible en l'absence de sucres ? La première étude du groupe de Klemm sur la glycosylation d'Ag43 (261) montre qu'aucun heptose ne se retrouve dans les 70 premiers acides aminés du domaine passager, ce qui correspond à la région responsable de l'autoagrégation (134). Il était alors tentant de spéculer que le segment de la protéine permettant l'autoagrégation n'était pas glycosylé et ne nécessitait donc pas la stabilité amenée par les résidus heptoses. Cependant, l'étude récente sur Ag43 (138) ainsi que notre étude contredisent cette hypothèse. Trois nouveaux résidus modifiés ont en effet été trouvés dans les 70 premiers acides aminés d'Ag43 responsable de l'autoagrégation. Notre étude montre aussi que les résidus heptoses sont retrouvés tout le long du domaine passager et notamment dans la région qui pourrait médier l'autoagrégation (43). Il est alors difficile d'expliquer pourquoi les sucres ne jouent aucun rôle dans l'autoagrégation. Une hypothèse possible est qu'une conformation anormale de la protéine non glycosylée ou sa dégradation partielle n'entrave pas l'autoagrégation qui reposerait sur de faibles contraintes structurales, contrairement à l'adhésion. L'adhésion nécessite en effet une interaction spécifique adhésine-récepteur qui est logiquement affectée par un changement de conformation de la protéine ou par sa dégradation. L'autoagrégation repose sur un contact protéine-protéine de nature électrostatique qui ne

nécessite donc pas que la protéine soit dans sa conformation la plus stable (cf. Article 2). Dans cette optique, il est aussi possible qu'un intermédiaire de dégradation de la protéine soit encore capable de médier l'autoagrégation.

## 2. Étude de l'autoagrégation d'AIDA-I

Notre étude a permis tout d'abord de confirmer le rôle du domaine extracellulaire d'AIDA-I dans l'autoagrégation. En effet, si l'on chauffe les bactéries à 60°C de manière à libérer la partie AIDA-I mature, les bactéries n'autoagrègent plus. De plus, l'ajout de protéine purifiée à une culture bactérienne exprimant AIDA-I inhibe l'autoagrégation. L'implication du domaine extracellulaire des SAAT dans l'autoagrégation avait déjà été démontré par d'autres groupes (134, 262, 263). Cependant, la nouveauté de notre étude consiste à apporter la preuve formelle d'une interaction AIDA-I/AIDA-I par les expériences de SPR et de pontage chimique extracellulaire. Cette étude constitue l'une des rares analyses démontrant l'interaction avec elle-même d'une protéine médiant l'autoagrégation, avec celles concernant la protéine Fha de *Bordetella pertussis* (181) et la protéine H de *Streptococcus pyogenes* (87). Tout d'abord, notre étude montre qu'AIDA-I est capable de s'associer avec elle-même avec un Kd de 45 nM, ce qui correspond à une liaison de forte affinité. Cette interaction, ainsi que l'autoagrégation des bactéries, est abolie par une force ionique importante. L'influence de la force ionique sur la formation des oligomères protéiques a été observée auparavant pour d'autres protéines (112, 309). Elle démontre dans notre cas l'importance des ponts salins dans l'interaction AIDA-I/AIDA-I. Plus généralement, cela indique que l'autoagrégation est un phénomène modulable par les facteurs environnementaux. Un pH acide semble aussi favoriser l'autoagrégation des bactéries (134, 262). Il est tentant de spéculer qu'aux pH acides rencontrés au niveau de la barrière stomacale, la bactérie se trouve favorisée par une autoagrégation maximale afin de résister à cet environnement. Globalement, la modulation de l'autoagrégation pourrait représenter un moyen pour la bactérie de s'adapter à son milieu de colonisation.

Nous avons démontré dans un deuxième temps que l'interaction AIDA-I/AIDA-I a effectivement lieu à la surface des bactéries grâce à des expériences de pontage

chimique. Nous avons en effet détecté l'existence de dimères d'AIDA-I par Western Blot après l'ajout d'un agent pontant. Ces dimères sont probablement des dimères en *cis* à la surface d'une même bactérie puisqu'aucun pontage inter-bactérien n'est observé lorsque la souche sauvage est mélangée avec la souche S846L. Le mutant I24, qui est non-agrégatif, ne forme pas de dimères. Ces résultats montrent qu'AIDA-I interagit avec elle-même en formant des oligomères à la surface bactérienne et que cette interaction serait à l'origine de l'autoagrégation. De plus, l'autoagrégation n'est pas inhibée par la protéine sous sa forme monomérique, c'est-à-dire en présence de Triton X-100, ce qui suggère que l'autoagrégation a effectivement lieu par une interaction entre oligomères.

De ces expériences est né un modèle d'interaction semblable à celui des cadhérines eucaryotes. Les cadhérines constituent une famille de glycoprotéines qui sont capables d'interagir entre elles pour former des jonctions cellulaires (158). Nous proposons qu'AIDA-I forme des oligomères en *cis* à la surface de la même bactérie qui ensuite s'associent en *trans* avec des oligomères des bactéries adjacentes. Ce type d'interaction se retrouve pour les cadhérines. Il est en effet couramment admis que les cadhérines s'associent avec elles-mêmes à la surface d'une même cellule en formant des dimères latéraux ou *cis*. Ces dimères latéraux adhèrent ensuite aux dimères de cadhérines situés sur les cellules adjacentes en formant des associations en *trans* (Figure 10) (158). L'existence de ces dimères a été démontrée la première fois *in vitro* en 1996 par des techniques biochimiques de pontage chimique et de filtration sur gel (33). Des études ultérieures, utilisant différentes lignées cellulaires exprimant des cadhérines avec différents épitopes ainsi que des expériences de pontage chimique, ont apporté une preuve supplémentaire de l'existence de deux types d'interactions (45, 137, 211, 254, 255, 302). Finalement, la microscopie électronique a permis d'observer les dimères *cis* et *trans* (3, 295). Dans le cas d'AIDA-I, les dimères observés sont probablement des dimères en *cis* à la surface d'une même bactérie. Les dimères en *trans* ne sont pas observés dans les conditions de pontage chimique que nous avons utilisées. Une protéine accessoire assurant la liaison entre les oligomères ne peut donc être exclue. Cependant, lorsqu'on ajoute à des bactéries exprimant AIDA-I un lysat bactérien ou un extrait membranaire de C600 ptr99a susceptible de contenir ce facteur accessoire, aucune inhibition de l'autoagrégation n'est observable.

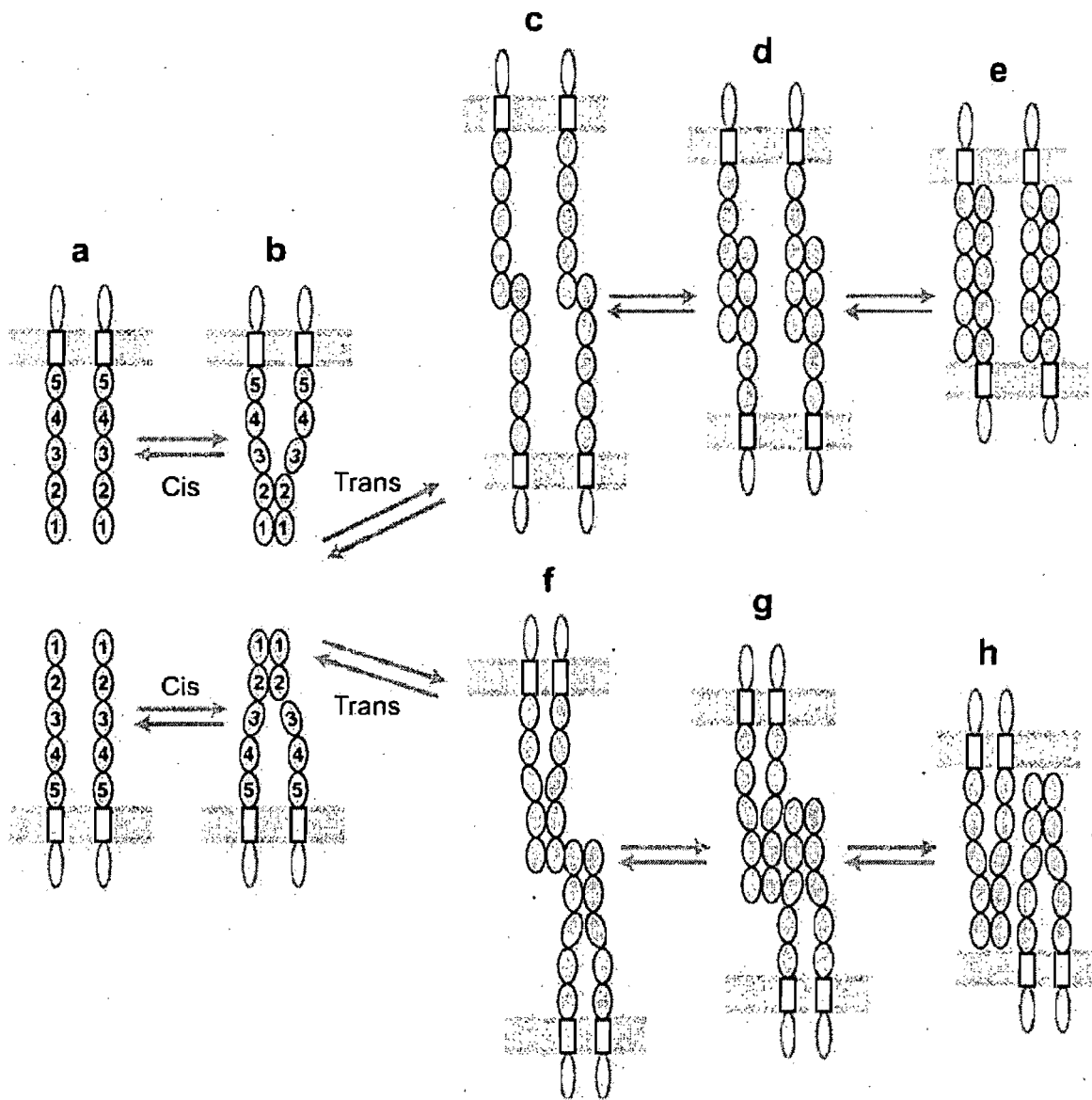


Figure 10 : Modèles possibles d'interaction des cadhérines eucaryotes. Les dimères *cis* ou latéraux (a, b) se lient aux dimères des cadhérines opposées. Les dimères latéraux peuvent se dissocier au profit des dimères *trans* (b, c) ou restés dimerisés (b, f). Les complexes en *trans* s'emboîtent ensuite pour permettre l'adhésion (c,d,e et f,g,h). Figure adaptée de la référence (158).

Un autre point non élucidé est la nécessité de la dimérisation en *cis* dans le processus d'autoagrégation. Concernant les cadhérines, les débats à ce sujet sont encore houleux. Le premier modèle suggère que les cadhérines restent dimérisées en *cis* et ensuite s'associent en *trans* afin d'augmenter la force de l'interaction (Figure 10, f, g, h). L'autre modèle suggère que les dimères en *cis* ne servent qu'à regrouper les cadhérines au site d'interaction et qu'ils se dissocient ensuite au profit des dimères en *trans* (Figure 10, c, d, e). Deux études montrent en effet que les deux types de dimères utilisent le même site de liaison et s'interconvertissent à la surface de la cellule (137, 302). Cependant, les observations de microscopie électronique montrent un processus de liaison en deux étapes, où les protéines s'associent d'abord en *cis* à la surface des cellules et se lient ensuite par leurs domaines C-terminaux à d'autres oligomères par des associations en *trans* (3, 141, 295). En ce qui concerne AIDA-I, il serait nécessaire de mettre en place un système d'étude permettant de différencier aisément les dimères *cis* des dimères *trans* afin de connaître la part de chacun dans l'interaction.

D'autres questions subsistent concernant AIDA-I : quels sont les segments de la protéine intervenant dans l'autoagrégation ? Les liaisons *cis* et *trans* sont-elles médiées par le même site d'interaction ? Ces questions ne sont toujours pas résolues pour les cadhérines après plus de 10 ans de recherche. Le domaine extracellulaire situé à l'extrémité N-terminale de la protéine, le domaine EC1 (Figure 11), a en effet longtemps été considéré comme le seul domaine impliqué dans l'adhésion. Une étude en 1990 montra, en échangeant les domaines N-terminaux, que la spécificité d'interaction des cadhérines réside dans le domaine N-terminal de la protéine (197). De plus, les structures cristallographiques obtenues à ce jour montrent une interaction en *cis* ou en *trans* exclusivement par l'intermédiaire du domaine EC1 (Figure 12) (29, 215, 257). Le résidu tryptophane en position 2, W2, semble indispensable à cette interaction (131, 155, 223, 255, 288, 301) et est très conservé au sein des cadhérines (217). Par ailleurs, l'observation par tomographie électronique de sections d'épidermes humains révèle que le site prédominant d'interaction entre les cadhérines au sein des desmosomes est effectivement l'extrémité N-terminale de la protéine (4, 5, 108). L'ensemble de ces observations a mené à un modèle d'interaction impliquant uniquement le domaine EC1

pour les interactions en *cis* et en *trans*. Cependant, de nombreuses données récentes remettent en cause ce modèle. Le domaine extracellulaire des cadhérines ou ectodomaine est en effet formé de cinq domaines extracellulaires (EC) en tonneau  $\beta$ , numérotés de 1 à 5 en partant de l'extrémité N-terminale (Figure 11) (257, 258). Or, l'analyse des propriétés de liaison d'une série de cadhérines purifiées, possédant un ou plusieurs domaines extracellulaires, suggère que tous les domaines EC contribuent à la formation des liaisons *trans* (41). Des données biophysiques montrent aussi l'implication de plusieurs domaines EC dans l'interaction cadhérine-cadhérine (20, 41, 44, 222, 231, 254, 268, 326). Une des méthodes pour évaluer les domaines impliqués dans la liaison consiste à mesurer la force d'interaction entre des monocouches de cadhérines immobilisées sur des bicouches lipidiques en fonction de leurs distances de séparation (157). Par exemple, il a été montré que l'ectodomaine de la cadhérine C de *Xenopus* forme trois liaisons homophiles à trois distances différentes. En connaissant la taille de l'ectodomaine et de chacun des domaines extracellulaires, il est possible de déduire quels sont les domaines interagissant entre eux. Ainsi, trois liaisons ont été identifiées : la liaison dite externe entre les domaines EC1 N-terminaux, la liaison dite interne entre tous les domaines extracellulaires des cadhérines et la liaison dite intermédiaire impliquant les domaines EC1 à EC3. Cette technique a aussi permis de montrer que la liaison interne est la liaison la plus forte, suivie de la liaison intermédiaire et de la liaison externe entre les domaines N-terminaux (267, 268, 326). Des mesures de force avec différents mutants de délétion ont aussi permis d'identifier les domaines responsables de chacune des trois liaisons (326).

L'ensemble de ces données remet donc en cause le modèle d'interaction impliquant uniquement le domaine EC1 et montre combien il est complexe d'étudier des interactions homophiles. Concernant AIDA-I, le domaine responsable de l'autoagrégation n'est pas connu avec précision. Le groupe de Schembri montra, par des expériences d'échanges entre variants agrégatifs et non-aggrégatifs, que le domaine N-terminal d'Ag43 semble responsable de l'autoagrégation (134). Ces résultats sont en contradiction avec l'étude par notre laboratoire qui montre que ce domaine n'est pas nécessaire à l'autoagrégation d'AIDA-I (43). De plus, le seul mutant non-aggrégatif obtenu dans cette

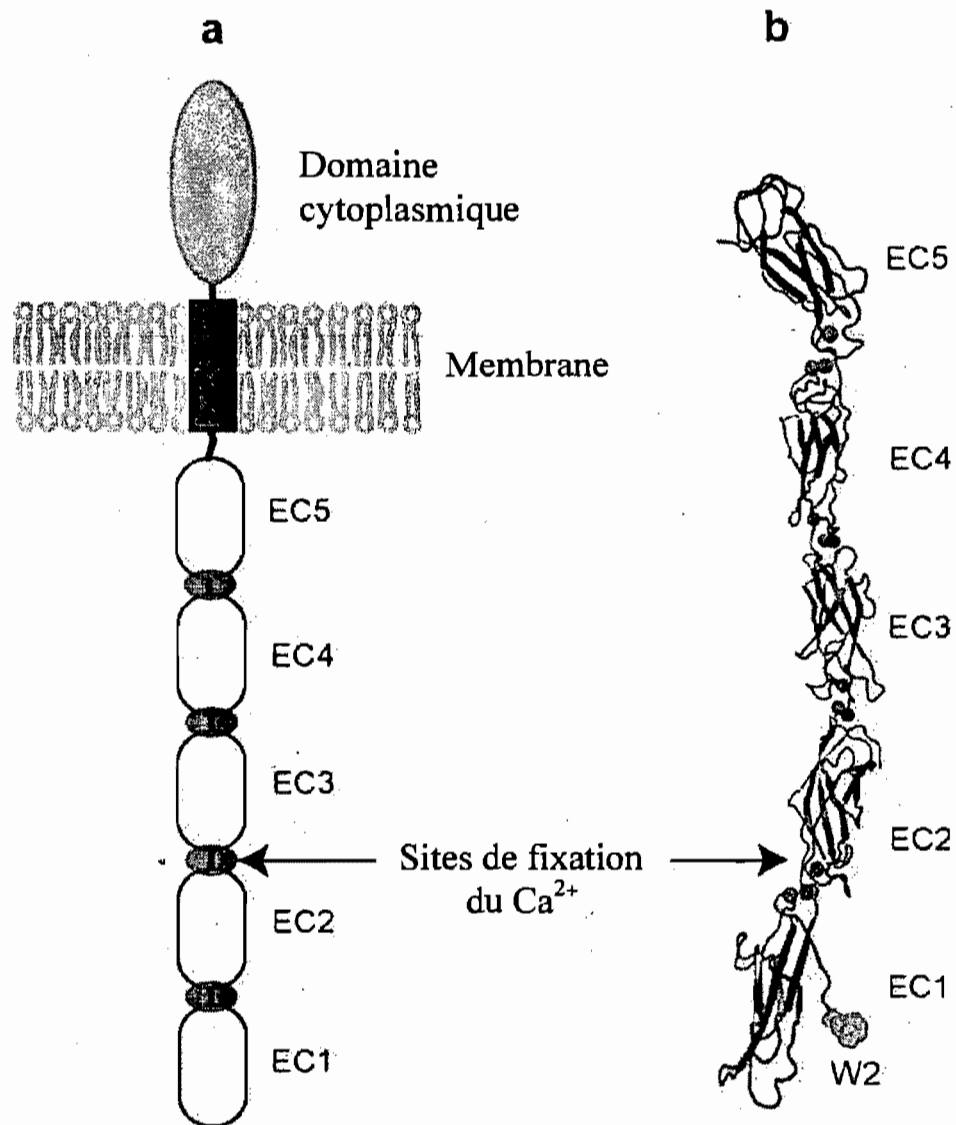


Figure 11 : Organisation de l'ectodomaine des cadhérines. (a) Structure schématique des cadhérines montrant les domaines extracellulaires (EC1 à EC5), membranaire et cytoplasmique. (b) L'ectodomaine de la cadherine C. Les cercles représentent les ions calcium se liant au niveau des jonctions entre les différents domaines. Adaptée de la référence (158).

étude, le mutant I24, contient une insertion au niveau de la partie C-terminale du domaine extracellulaire. D'autres études sont donc nécessaires pour déterminer l'interface médiant l'autoagrégation. Il serait par exemple intéressant d'utiliser certains des mutants de l'étude de Charbonneau *et al* (43), contenant des cystéines réparties sur l'ensemble du domaine extracellulaire. Il est en effet possible de catalyser la formation des ponts disulfures par l'utilisation d'un mélange de cuivre et de phénanthroline (177). La formation de ces ponts a lieu uniquement lorsque les molécules sont distantes d'environ 3 à 4 Å et reflète une proximité entre deux molécules. La réalisation d'homopontages et d'hétéropontages entre les différents mutants permettrait donc de définir les segments de la protéine médiant l'autoagrégation.

Concernant l'interaction AIDA-I/AIDA-I d'un point de vue structural, nous disposons à l'heure actuelle de très peu de données. L'autoagrégation semble s'accompagner d'un changement de conformation, comme le montre les expériences de dichroïsme circulaire. Lorsqu'AIDA-I interagit avec elle-même, l'ellipticité à 218 nm diminue, ce qui témoigne d'une baisse dans le contenu en brins  $\beta$  de la protéine oligomérisée. Un tel changement conformationnel a déjà été observé pour la protéine Fur (57). Dans notre cas, il est possible que certains domaines de la protéine soient moins structurés sous formes d'oligomère que sous forme de monomère. Il serait intéressant d'étudier les oligomères d'AIDA-I par des techniques biochimiques classiques de chromatographie d'exclusion de taille (filtration sur gel) et de « light scattering ». Des expériences de microscopie électronique sont actuellement en cours en collaboration avec le Dr Isabelle Rouillé de l'Université McGill, dans le but de visualiser les différents états d'oligomérisation d'AIDA-I en fonction de la force ionique.

Dans le cas des cadhérines, plusieurs études cristallographiques ont permis d'établir un modèle reposant sur l'échange de 2 brins  $\beta$  entre les domaines EC1 (29, 106, 215, 257). Un élément-clef de cet échange est l'insertion de la chaîne latérale du résidu W2 d'un protomère dans une poche hydrophobe du protomère opposé (Figure 12) (29, 257). Un pont hydrogène entre le résidu N1 et le résidu opposé G89 contribue aussi à la stabilité de l'interaction (20, 102). D'abord proposé pour l'interaction en *cis* (257), le modèle a ensuite été réinterprété et semble maintenant considéré comme le modèle de



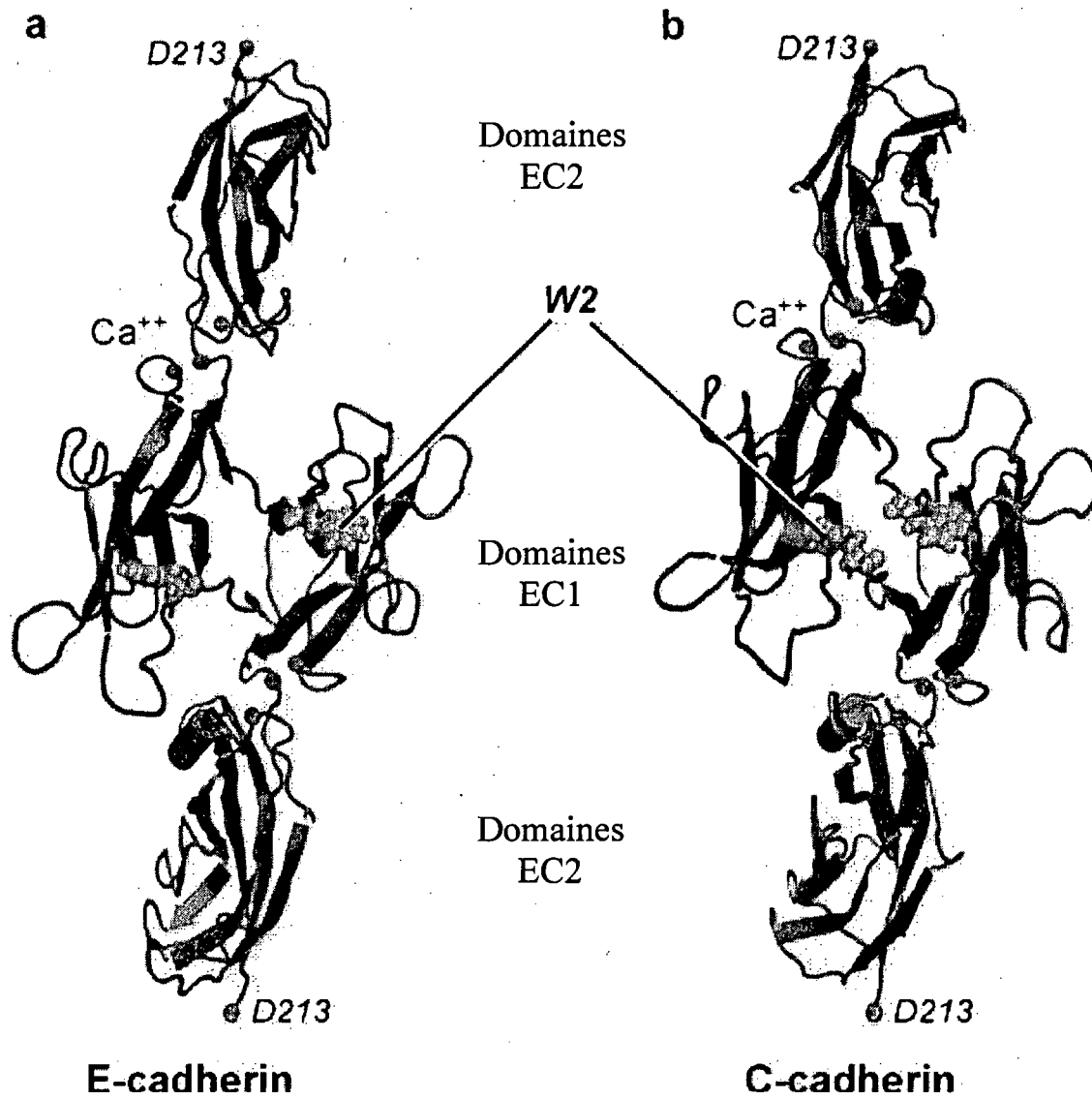


Figure 12 : Structure de deux dimères en *trans* de cadhérines. (a) Structure des domaines EC1 et EC2 de la cadhérine C. (b) Structure des domaines EC1 et EC2 de la cadhérine E. Adaptée de la référence (158).

l'interaction en *trans* (29). Cependant, si l'on considère que les dimères *cis* et *trans* sont mutuellement exclusifs, ils pourraient se former tous les deux selon le même modèle (215, 302). Des études plus poussées pourraient donc permettre de définir le modèle d'interaction AIDA-I/AIDA-I d'un point de vue structural et de déterminer éventuellement les domaines de la protéine qui sont impliqués.

Les cadhérines et AIDA-I présentent d'autres similarités intéressantes. Ce sont toutes deux des glycoprotéines présentant des répétitions dans leur domaine extracellulaire (29, 43). Leur autoggrégation est modulée par des facteurs environnementaux, le calcium dans le cas des cadhérines (107), la force ionique dans le cas d'AIDA-I. Elles sont aussi toutes les deux capables d'interagir avec d'autres substrats qu'elle-mêmes (255, 262). Nous proposons donc que les cadhérines et les autotransporteurs jouent le même rôle, à savoir assurer la communication et la formation de communautés intercellulaires. Le comportement multicellulaire des microorganismes est un phénomène connu et qui a été largement étudié (68, 216, 256, 314). Cependant, les études effectuées se sont focalisées sur la communication entre bactéries par les molécules de quorum sensing (35, 114). Peu d'attention a été portée sur le contact physique nécessaire à cette communication. Les autotransporteurs comme AIDA-I, ainsi que d'autres protéines médiant l'autoagrégation, pourraient avoir le rôle spécifique d'assurer ce contact et représenter ainsi des « molécules d'adhésion bactérienne », comparables aux molécules d'adhésion eucaryotes assurant la communication des cellules au sein d'un tissu.

### **3. Design et test biologique d'un inhibiteur peptidique d'AIDA-I.**

Notre troisième étude a permis d'identifier, par le criblage d'une banque de peptides aléatoires, un inhibiteur peptidique de la protéine AIDA-I qui, en se liant à l'adhésine, l'empêche d'interagir avec son récepteur. Cette approche est novatrice dans la mesure où le criblage de banques peptidiques a été utilisé pour cibler majoritairement des toxines bactériennes (19, 186, 187) ou des composés bactériens essentiels tels que des enzymes impliquées dans la division cellulaire ou la synthèse du peptidoglycan (72, 213). A notre connaissance, cette stratégie n'a pas été utilisée pour identifier de nouvelles

molécules anti-adhésives et représente donc une voie inexplorée. Des sucres analogues du récepteur ont été largement employés pour inhiber les adhésines de type lectines tels les fimbriae de type 1 (83, 204, 205, 252). Le ou les récepteurs d'AIDA-I ne sont pas connus et il n'est donc pas possible d'utiliser un analogue du récepteur. Une étude est cependant en cours dans notre laboratoire pour tenter d'identifier le ou les récepteurs d'AIDA-I par la technique de Biacore (Annexe 2). L'avantage de l'approche utilisée dans l'article 3 est qu'elle ne nécessite aucune connaissance préalable sur la cible. Elle peut donc être appliquée pour inhiber l'adhésion d'un grand nombre de bactéries pour lesquelles les récepteurs des adhésines ne sont pas connus, représentant ainsi un outil puissant dans la lutte contre les microorganismes pathogènes.

Nous avons identifié au cours de notre étude une grande variété de peptides se liant à AIDA-I. Les peptides interagissant avec les protéines se lient préférentiellement à des sites fonctionnels plutôt que de se fixer au hasard sur la surface de la protéine (115). Or AIDA-I semble posséder de nombreux sites de liaison et au moins deux domaines d'adhésion (43). La grande variété de peptides sélectionnés reflète donc la multiplicité de domaines de liaison d'AIDA-I. Malgré cette diversité, la population de phages sélectionnés est statistiquement différente de la banque de phages de départ, comme le montre l'analyse des séquences obtenues à l'aide du serveur bioinformatique RELIC. RELIC est un ensemble de programme permettant d'analyser les propriétés statistiques d'une population de phages criblés par phage display (171). Cette analyse montre en effet que la population de phages obtenus est enrichie en peptides statistiquement rares et appauvries en peptides les plus susceptibles d'être obtenus par hasard. De plus, les fréquences des acides aminés dans l'ensemble de la banque de peptides aléatoires et celles obtenues dans la population de phages sont différentes. Il y a donc bien eu sélection malgré la variété des peptides obtenus.

Les peptides sélectionnés pourraient aussi être des analogues de ligands de la protéine, comme dans le cas de l'interaction TonB-FhuA, pour laquelle des peptides sélectionnés contre TonB correspondent à des séquences retrouvées chez FhuA (37). Cependant, la comparaison des séquences obtenues au cours de l'étude avec celle du génome humain à l'aide du serveur RELIC n'a pas permis d'identifier d'homologies ayant une relevance biologique. Le site de liaison des peptides sur la protéine AIDA-I

demeure aussi inconnu. Cependant, l'étude de la liaison de P1 et P2 à AIDA-I par la technique de SPR suggère que P1 est capable de se lier à plusieurs sites sur AIDA-I. En effet, le signal maximum mesuré en RU ( $R_{max}$ ) est relié à la stœchiométrie de la réaction par la formule suivante :  $R_{max} = (MM_A/MM_L) \times R_L \times S$ , avec  $MM_A$  : masse moléculaire de l'analyte (peptide),  $MM_L$  : masse moléculaire du ligand (AIDA-I),  $R_L$  : quantité de ligand fixé en RU,  $S$  : stœchiométrie de la réaction. Sachant que la MM de P1 est de 1500 Da et celle d'AIDA-I de 125 kDa et que 5000 RU d'AIDA-I sont fixés sur la puce, la réponse maximale pour la liaison P1/AIDA-I avec une stœchiométrie 1:1 serait de 60 RU. Or nous obtenons une réponse d'environ 250 RU, ce qui suggère que P1 semble se lier à 4 sites sur AIDA-I.

Parmi tous les peptides testés, le peptide P1, de séquence GKMHAHPHLHNR, est capable d'inhiber l'adhésion *in vitro* avec une  $IC_{50}$  de l'ordre de 419  $\mu$ M. Plusieurs problèmes se posent concernant l'utilisation de ce peptide comme inhibiteur. Tout d'abord, son affinité pour AIDA-I doit être améliorée en greffant plusieurs copies du peptide sur un squelette polyvalent tel qu'un squelette de polyacrylamide (187) ou un liposome (19). L'adhésion est en effet un processus multivalent où plusieurs copies de l'adhésine à la surface de la bactérie engagent plusieurs copies du récepteur à la surface de la cellule. L'utilisation d'inhibiteurs polyvalents permet d'augmenter l'affinité de l'inhibiteur pour sa cible. Ainsi, de nombreux inhibiteurs polyvalents dérivés du récepteur ont été utilisés pour bloquer l'adhésion médiée par les lectines ou l'action de toxines de type AB5 (18, 166, 188, 190, 196, 242, 266). Concernant les inhibiteurs peptidiques issus du phage-display, l'exemple le plus frappant est celui de la toxine de l'anthrax : un inhibiteur polyvalent dirigé contre la toxine peut bloquer son assemblage *in vitro* et son action *in vivo* dans un modèle murin d'infection, et ce à très faible dose (187). Il serait donc possible, en greffant le peptide P1 sur un support polyvalent, d'en faire un inhibiteur polyvalent efficace. Cet inhibiteur polyvalent a été synthétisé par le laboratoire du Dr Ravi Kane (Rensselaer Polytechnic Institute, Albany). Les tests préliminaires en cours dans notre laboratoire suggèrent que l' $IC_{50}$  de l'inhibiteur polyvalent est trente fois plus faible que celle du peptide seul. L'optimisation du squelette utilisé devrait permettre d'améliorer encore ce résultat.

Un autre problème est la stabilité de l'inhibiteur peptidique. Un certain nombre de modifications sont possibles pour améliorer la stabilité d'un peptide tout en maintenant son activité inhibitrice (1, 151). Une stratégie simple et couramment employée consiste à protéger les extrémités N et C-terminales du peptide en rajoutant des groupements acétyls et amides respectivement. Cette modification, qui a été réalisée lors de la synthèse des peptides P1 à P3, rend les peptides plus stables mais ne leur confère pas une protection totale contre la dégradation (221). On peut aussi envisager de convertir le peptide linéaire en un peptide cyclique qui peut s'avérer plus stable et plus affiné pour sa cible (311). Cependant, dans notre cas, la sélection utilisant une banque de peptides aléatoires cycliques n'a donné aucun résultat. La chaîne latérale de certains acides aminés impliqués dans le site de reconnaissance de protéases peut aussi être modifiée. Les acides aminés concernés sont remplacés par des acides aminés naturels ou non, possédant des chaînes latérales semblables (179). L'idée est de modifier le site de reconnaissance de la protéase pour éviter le clivage tout en restant le plus proche de la séquence originale du peptide afin de maintenir son activité. Dans le même ordre d'idée, remplacer certains acides aminés L de la séquence peptidique par les acides aminés D correspondants peut conférer au peptide une résistance à la dégradation protéolytique (1). Les acides aminés naturels existent en effet uniquement sous la forme L et les protéases ne sont donc pas capables de reconnaître la forme D. De plus, les acides aminés D sont beaucoup moins immunogènes (1). Cependant, un obstacle majeur à l'usage d'acides aminés D est la perte d'activité du peptide due aux changements conformationnels (290). Le développement de peptides dits « rétro-inverses » permet de pallier ce problème. L'idée est de simultanément inverser la séquence du peptide et changer sa chiralité de manière à en faire un analogue plus proche du peptide original (290). D'autres modifications plus importantes, altérant la liaison peptidique, peuvent aussi être envisagées. On parle alors de « pseudopeptides » ou de « peptidomimétiques » (1).

De nombreuses modifications restent à faire pour pouvoir utiliser cet inhibiteur comme véritable médicament anti-adhésif. Notre étude constitue cependant une preuve de principe et montre qu'inhiber l'adhésion par une approche comparable à la nôtre représente une voie prometteuse dans le contexte actuel de résistance aux antibiotiques.

## **CONCLUSION**

Ce projet nous a permis d'élargir nos connaissances sur un membre de la famille des autotransporteurs, AIDA-I. Cette famille compte plus de 800 membres qui occupent des fonctions diverses, pour la majorité reliées à la virulence. La sous-famille des SAAT, qui comprend AIDA-I, TibA et Ag43 se distingue par la multifonctionnalité de ces membres. Les SAAT occupent en effet trois fonctions importantes dans la pathogénèse, que sont l'adhésion, l'autoagrégation et la formation de biofilm. Il apparaît donc essentiel de connaître les propriétés de ces adhésines et de tenter de les inhiber afin de combattre plus efficacement les infections bactériennes.

Cette étude nous a permis tout d'abord d'approfondir les connaissances sur une des particularités de ces adhésines qu'est leur glycosylation par des résidus heptoses. Cette modification est relativement inhabituelle pour une glycoprotéine. L'étude de la glycosylation d'AIDA-I nous a permis de montrer que la protéine était O-glycosylée par Aah. Deux études récentes montrent qu'il en est de même pour Ag43 (138, 260). TibA aussi est glycosylé (165) et il s'agit certainement de O-glycosylation puisque Aah peut glycosyler TibA. Cette modification est nécessaire à l'adhésion et les sucres ont longtemps été proposés comme participant directement à l'interaction adhésine-récepteur. Nous émettons l'hypothèse dans ce projet que la glycosylation serve plutôt à maintenir AIDA-I dans une conformation stable. La glycosylation semble avoir le même effet sur Ag43 (138) et des études sont en cours dans notre laboratoire pour déterminer l'influence de la glycosylation sur TibA. Cette étude contribue donc à donner une vision différente de celle couramment admise concernant le rôle de la glycosylation dans l'adhésion des SAAT.

Une autre caractéristique commune à tous les SAAT est l'autoagrégation. Ce phénotype, bien que très facilement mesurable et partagé par de nombreuses adhésines, a été peu étudié. L'autoagrégation pourrait cependant occuper un rôle important dans la pathogénèse en permettant le contact bactérie-bactérie nécessaire à l'établissement de comportements multicellulaires. Notre étude apporte la preuve formelle d'une interaction AIDA-I/AIDA-I *in vitro* et *in vivo* modulée par la force ionique. L'ensemble de nos données permet aussi de suggérer un modèle d'autoagrégation ressemblant à celui des cadhérines eucaryotes et impliquant la formation d'oligomères à la surface de la bactérie. Ag43 et TibA sont aussi capables d'autoaggréger en interagissant avec eux-mêmes ou en

formant des agrégats mixtes (261, 262). Dans ce contexte, notre étude apporte une nouvelle perspective sur le rôle de l'autoagrégation des SAAT et des autotransporteurs en général. Nous proposons en effet que la fonction principale de l'autoagrégation soit d'assurer le contact nécessaire pour former des structures multicellulaires permettant une action coordonnée des bactéries.

Finalement, notre dernière étude propose une stratégie rapide et peu coûteuse pour inhiber l'adhésion d'AIDA-I, qui consiste à cribler des banques de peptides aléatoires afin d'identifier un inhibiteur de l'interaction protéine-ligand. Étant donné que cette technique ne requiert aucune connaissance préalable sur l'adhésine ou son récepteur, il serait possible de l'appliquer à d'autres adhésines bactériennes et notamment à Ag43 et TibA. Il s'agit donc d'une approche innovatrice et prometteuse de lutte contre les microorganismes.

Globalement, l'étude de quelques spécificités d'AIDA-I et son inhibition apportent de nouvelles perspectives sur les facteurs de virulence multifonctionnels que sont les SAAT. Ce projet ouvre aussi la voie à d'autres études et notamment à la caractérisation des autres fonctions des autotransporteurs que sont l'adhésion et la formation de biofilm. En effet, les récepteurs des adhésines autotransporteurs, dont celui d'AIDA-I, sont le plus souvent inconnus et nécessiteraient d'être investigués. Il serait également intéressant d'étudier les liens entre les différentes fonctions afin de déterminer comment elles sont imbriquées et orchestrées par la bactérie au cours de l'infection.



# **BIBLIOGRAPHIE**

1. **Adessi, C., and C. Soto.** 2002. Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability. *Curr Med Chem* **9**:963-78.
2. **Aebi, C., E. R. Lafontaine, L. D. Cope, J. L. Latimer, S. L. Lumbley, G. H. McCracken, Jr., and E. J. Hansen.** 1998. Phenotypic effect of isogenic *uspA1* and *uspA2* mutations on *Moraxella catarrhalis* 035E. *Infect Immun* **66**:3113-9.
3. **Ahrens, T., O. Pertz, D. Haussinger, C. Fauser, T. Schulthess, and J. Engel.** 2002. Analysis of heterophilic and homophilic interactions of cadherins using the c-Jun/c-Fos dimerization domains. *J Biol Chem* **277**:19455-60.
4. **Al-Amoudi, A., D. C. Diez, M. J. Betts, and A. S. Frangakis.** 2007. The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes. *Nature* **450**:832-7.
5. **Al-Amoudi, A., and A. S. Frangakis.** 2008. Structural studies on desmosomes. *Biochem Soc Trans* **36**:181-7.
6. **Anderson, B. E., G. A. McDonald, D. C. Jones, and R. L. Regnery.** 1990. A protective protein antigen of *Rickettsia rickettsii* has tandemly repeated, near-identical sequences. *Infect Immun* **58**:2760-9.
7. **Anderson, G. G., J. J. Palermo, J. D. Schilling, R. Roth, J. Heuser, and S. J. Hultgren.** 2003. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* **301**:105-7.
8. **Apel, D., and M. G. Surette.** 2007. Bringing order to a complex molecular machine: The assembly of the bacterial flagella. *Biochim Biophys Acta*.
9. **Appeldoorn, C. C., J. A. Joosten, F. A. El Maate, U. Dobrindt, J. Hacker, R. M. Liskamp, A. S. Khan, and R. J. Pieters.** 2005. Novel multivalent mannose compounds and their inhibition of the adhesion of type 1 fimbriated uropathogenic *E. coli*. *Tet Asym* **16**:361-372.
10. **Armstrong, G. D., L. S. Frost, H. J. Vogel, and W. Paranchych.** 1981. Nature of the carbohydrate and phosphate associated with ColB2 and EDP208 pilin. *J Bacteriol* **145**:1167-76.
11. **Aronson, M., O. Medalia, L. Schori, D. Mirelman, N. Sharon, and I. Ofek.** 1979. Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl alpha-D-mannopyranoside. *J Infect Dis* **139**:329-32.
12. **Asakawa, R., H. Komatsuzawa, T. Kawai, S. Yamada, R. B. Goncalves, S. Izumi, T. Fujiwara, Y. Nakano, N. Suzuki, Y. Uchida, K. Ouhara, H. Shiba, M. A. Taubman, H. Kurihara, and M. Sugai.** 2003. Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol Microbiol* **50**:1125-39.
13. **Ashgar, S. S., N. J. Oldfield, K. G. Wooldridge, M. A. Jones, G. J. Irving, D. P. Turner, and D. A. Ala'Aldeen.** 2007. CapA, an autotransporter protein of *Campylobacter jejuni*, mediates association with human epithelial cells and colonization of the chicken gut. *J Bacteriol* **189**:1856-65.
14. **Bahrani-Mougeot, F. K., E. L. Buckles, C. V. Lockett, J. R. Hebel, D. E. Johnson, C. M. Tang, and M. S. Donnenberg.** 2002. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. *Mol Microbiol* **45**:1079-93.

15. **Balass, M., E. Katchalski-Katzir, and S. Fuchs.** 1997. The alpha-bungarotoxin binding site on the nicotinic acetylcholine receptor: analysis using a phage-epitope library. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:6054-8.
16. **Barnard, T. J., N. Dautin, P. Lukacik, H. D. Bernstein, and S. K. Buchanan.** 2007. Autotransporter structure reveals intra-barrel cleavage followed by conformational changes. *Nat Struct Mol Biol* **14**:1214-20.
17. **Barnhart, M. M., and M. R. Chapman.** 2006. Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol* **60**:131-47.
18. **Barthelson, R., A. Mobasser, D. Zopf, and P. Simon.** 1998. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to respiratory epithelial cells is inhibited by sialylated oligosaccharides. *Infect Immun* **66**:1439-44.
19. **Basha, S., P. Rai, V. Poon, A. Saraph, K. Gujraty, M. Y. Go, S. Sadacharan, M. Frost, J. Mogridge, and R. S. Kane.** 2006. Polyvalent inhibitors of anthrax toxin that target host receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:13509-13.
20. **Bayas, M. V., A. Leung, E. Evans, and D. Leckband.** 2006. Lifetime measurements reveal kinetic differences between homophilic cadherin bonds. *Biophys J* **90**:1385-95.
21. **Benz, I., and M. A. Schmidt.** 1992. AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol Microbiol* **6**:1539-46.
22. **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.
23. **Benz, I., and M. A. Schmidt.** 1990. Diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Res Microbiol* **141**:785-6.
24. **Benz, I., and M. A. Schmidt.** 1993. Diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* strains--processing of AIDA-I. *Zentralbl Bakteriol* **278**:197-208.
25. **Benz, I., and M. A. Schmidt.** 2001. Glycosylation with heptose residues mediated by the aah gene product is essential for adherence of the AIDA-I adhesin. *Mol Microbiol* **40**:1403-13.
26. **Benz, I., and M. A. Schmidt.** 1992. Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). *Infect Immun* **60**:13-8.
27. **Bernstein, H. D.** 2007. Are bacterial 'autotransporters' really transporters? *Trends Microbiol* **15**:441-7.
28. **Bieber, D., S. W. Ramer, C. Y. Wu, W. J. Murray, T. Tobe, R. Fernandez, and G. K. Schoolnik.** 1998. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **280**:2114-8.
29. **Boggon, T. J., J. Murray, S. Chappuis-Flament, E. Wong, B. M. Gumbiner, and L. Shapiro.** 2002. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* **296**:1308-13.
30. **Bos, M. P., V. Robert, and J. Tommassen.** 2007. Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annu Rev Microbiol* **61**:191-214.
31. **Bouckaert, J., J. Berglund, M. Schembri, E. De Genst, L. Cools, M. Wuhrer, C. S. Hung, J. Pinkner, R. Slattegard, A. Zavialov, D. Choudhury, S. Langermann, S. J. Hultgren, L. Wyns, P. Klemm, S. Oscarson, S. D. Knight,**

- and H. De Greve. 2005. Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the *Escherichia coli* FimH adhesin. *Mol Microbiol* **55**:441-55.
32. 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.
33. Briehner, W. M., A. S. Yap, and B. M. Gumbiner. 1996. Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin. *J Cell Biol* **135**:487-96.
34. Burrows, L. L. 2005. Weapons of mass retraction. *Mol Microbiol* **57**:878-88.
35. Camilli, A., and B. L. Bassler. 2006. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* **311**:1113-6.
36. Capitani, G., O. Eidam, R. Glockshuber, and M. G. Grutter. 2006. Structural and functional insights into the assembly of type 1 pili from *Escherichia coli*. *Microbes Infect* **8**:2284-90.
37. Carter, D. M., J. N. Gagnon, M. Damlaj, S. Mandava, L. Makowski, D. J. Rodi, P. D. Pawelek, and J. W. Coulton. 2006. Phage display reveals multiple contact sites between FhuA, an outer membrane receptor of *Escherichia coli*, and TonB. *J Mol Biol* **357**:236-51.
38. Cegelski, L., G. R. Marshall, G. R. Eldridge, and S. J. Hultgren. 2008. The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nat Rev Microbiol* **6**:17-27.
39. Chai, W., T. Feizi, C. T. Yuen, and A. M. Lawson. 1997. Nonreductive release of O-linked oligosaccharides from mucin glycoproteins for structure/function assignments as neoglycolipids: application in the detection of novel ligands for E-selectin. *Glycobiology* **7**:861-72.
40. Chapman, M. R., L. S. Robinson, J. S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, M. Hammar, S. Normark, and S. J. Hultgren. 2002. Role of *Escherichia coli* curlin operons in directing amyloid fiber formation. *Science* **295**:851-5.
41. Chappuis-Flament, S., E. Wong, L. D. Hicks, C. M. Kay, and B. M. Gumbiner. 2001. Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *J Cell Biol* **154**:231-43.
42. Charbonneau, M. E., F. Berthiaume, and M. Mourez. 2006. Proteolytic processing is not essential for multiple functions of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I). *J Bacteriol* **188**:8504-12.
43. Charbonneau, M. E., and M. Mourez. 2007. Functional organization of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. *J Bacteriol* **189**:9020-9.
44. Chien, Y. H., N. Jiang, F. Li, F. Zhang, C. Zhu, and D. Leckband. 2008. Two stage cadherin kinetics require multiple extracellular domains but not the cytoplasmic region. *J Biol Chem* **283**:1848-56.
45. Chitaev, N. A., and S. M. Troyanovsky. 1998. Adhesive but not lateral E-cadherin complexes require calcium and catenins for their formation. *J Cell Biol* **142**:837-46.
46. Choi, P. S., A. J. Dawson, and H. D. Bernstein. 2007. Characterization of a novel two-partner secretion system in *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **189**:3452-61.
47. Choudhury, D., A. Thompson, V. Stojanoff, S. Langermann, J. Pinkner, S. J. Hultgren, and S. D. Knight. 1999. X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **285**:1061-6.
48. Clantin, B., H. Hodak, E. Willery, C. Loch, F. Jacob-Dubuisson, and V. Villeret. 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**:6194-9.
49. **Cole, L. E., T. H. Kawula, K. L. Toffer, and C. Elkins.** 2002. The *Haemophilus ducreyi* serum resistance antigen DsrA confers attachment to human keratinocytes. *Infect Immun* **70**:6158-65.
  50. **Comanducci, M., S. Bambini, B. Brunelli, J. Adu-Bobie, B. Arico, B. Capecchi, M. M. Giuliani, V. Masignani, L. Santini, S. Savino, D. M. Granoff, D. A. Caugant, M. Pizza, R. Rappuoli, and M. Mora.** 2002. NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med* **195**:1445-54.
  51. **Connell, I., W. Agace, P. Klemm, M. Schembri, S. Marild, and C. Svanborg.** 1996. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:9827-32.
  52. **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.
  53. **Cotter, S. E., H. J. Yeo, T. Juehne, and J. W. St Geme, 3rd.** 2005. Architecture and adhesive activity of the *Haemophilus influenzae* Hsf adhesin. *J Bacteriol* **187**:4656-64.
  54. **Craig, L., M. E. Pique, and J. A. Tainer.** 2004. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **2**:363-78.
  55. **Crowther, L. J., R. P. Anantha, and M. S. Donnenberg.** 2004. The inner membrane subassembly of the enteropathogenic *Escherichia coli* bundle-forming pilus machine. *Mol Microbiol* **52**:67-79.
  56. **Czczulin, J. R., S. Balepur, S. Hicks, A. Phillips, R. Hall, M. H. Kothary, F. Navarro-Garcia, and J. P. Nataro.** 1997. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* **65**:4135-45.
  57. **D'Autreaux, B., L. Pecqueur, A. Gonzalez de Peredo, R. E. Diederix, C. Caux-Thang, L. Tabet, B. Bersch, E. Forest, and I. Michaud-Soret.** 2007. Reversible redox- and zinc-dependent dimerization of the *Escherichia coli* fur protein. *Biochemistry* **46**:1329-42.
  58. **Danese, P. N., L. A. Pratt, S. L. Dove, and R. Kolter.** 2000. The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* **37**:424-32.
  59. **Daniel, A., A. Singh, L. J. Crowther, P. J. Fernandes, W. Schreiber, and M. S. Donnenberg.** 2006. Interaction and localization studies of enteropathogenic *Escherichia coli* type IV bundle-forming pilus outer membrane components. *Microbiology* **152**:2405-20.
  60. **Daniell, S. J., E. Kocsis, E. Morris, S. Knutton, F. P. Booy, and G. Frankel.** 2003. 3D structure of EspA filaments from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **49**:301-8.
  61. **Dautin, N., and H. D. Bernstein.** 2007. Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol* **61**:89-112.
  62. **Desvaux, M., A. Scott-Tucker, S. M. Turner, L. M. Cooper, D. Huber, J. P. Nataro, and I. R. Henderson.** 2007. A conserved extended signal peptide region

- directs posttranslational protein translocation via a novel mechanism. *Microbiology* **153**:59-70.
63. **Doerrler, W. T.** 2006. Lipid trafficking to the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **60**:542-52.
  64. **Donnenberg, M. S., C. O. Tacket, S. P. James, G. Losonsky, J. P. Nataro, S. S. Wasserman, J. B. Kaper, and M. M. Levine.** 1993. Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J Clin Invest* **92**:1412-7.
  65. **Dorsey, C. W., M. C. Laarakker, A. D. Humphries, E. H. Weening, and A. J. Baumler.** 2005. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Mol Microbiol* **57**:196-211.
  66. **Duguid, J. P., and E. S. Anderson.** 1967. Terminology of bacterial fimbriae, or pili, and their types. *Nature* **215**:89-90.
  67. **Dunne, W. M., Jr.** 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* **15**:155-66.
  68. **Dunny, G. M., T. J. Brickman, and M. Dworkin.** 2008. Multicellular behavior in bacteria: communication, cooperation, competition and cheating. *Bioessays* **30**:296-8.
  69. **Dziva, F., P. M. van Diemen, M. P. Stevens, A. J. Smith, and T. S. Wallis.** 2004. Identification of *Escherichia coli* O157 : H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* **150**:3631-45.
  70. **Eden, C. S., R. Freter, L. Hagberg, R. Hull, S. Hull, H. Leffler, and G. Schoolnik.** 1982. Inhibition of experimental ascending urinary tract infection by an epithelial cell-surface receptor analogue. *Nature* **298**:560-2.
  71. **El Tahir, Y., and M. Skurnik.** 2001. *YadA*, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int J Med Microbiol* **291**:209-18.
  72. **El Zoeiby, A., F. Sanschagrin, A. Darveau, J. R. Brisson, and R. C. Levesque.** 2003. Identification of novel inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* MurC enzyme derived from phage-displayed peptide libraries. *J Antimicrob Chemother* **51**:531-43.
  73. **Elsinghorst, E. A., and J. A. Weitz.** 1994. Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic *Escherichia coli* *tib* locus is associated with a 104-kilodalton outer membrane protein. *Infect Immun* **62**:3463-71.
  74. **Emsley, P., I. G. Charles, N. F. Fairweather, and N. W. Isaacs.** 1996. Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature* **381**:90-2.
  75. **Eto, D. S., T. A. Jones, J. L. Sundsbak, and M. A. Mulvey.** 2007. Integrin-Mediated Host Cell Invasion by Type 1-Piliated Uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog* **3**:e100.
  76. **Fagan, R. P., M. A. Lambert, and S. G. Smith.** 2007. The Hek outer membrane protein of *Escherichia coli* strain RS218 binds to proteoglycan and utilizes a single extracellular loop for adherence, invasion and autoaggregation. *Infect Immun*.
  77. **Fan, E., E. A. Merritt, C. L. Verlinde, and W. G. Hol.** 2000. AB(5) toxins: structures and inhibitor design. *Curr Opin Struct Biol* **10**:680-6.
  78. **Fang, Y., M. Ngeleka, D. M. Middleton, and E. Simko.** 2008. Isolation and identification of AIDA-I receptors in porcine intestinal mucus. *Vet Microbiol* **126**:345-55.

79. **Fernandez, R. C., and A. A. Weiss.** 1994. Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun* **62**:4727-38.
80. **Fine, D. H., K. Velliyagounder, D. Furgang, and J. B. Kaplan.** 2005. The *Actinobacillus actinomycetemcomitans* autotransporter adhesin Aae exhibits specificity for buccal epithelial cells from humans and old world primates. *Infect Immun* **73**:1947-53.
81. **Fink, D. L., A. Z. Buscher, B. Green, P. Fernsten, and J. W. St Geme, 3rd.** 2003. The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter mediates microcolony formation and adherence to epithelial cells and extracellular matrix via binding regions in the C-terminal end of the passenger domain. *Cell Microbiol* **5**:175-86.
82. **Finn, T. M., and L. A. Stevens.** 1995. Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol Microbiol* **16**:625-34.
83. **Firon, N., I. Ofek, and N. Sharon.** 1982. Interaction of mannose-containing oligosaccharides with the fimbrial lectin of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **105**:1426-32.
84. **Fleckenstein, J. M., J. T. Holland, and D. L. Hasty.** 2002. Interaction of an outer membrane protein of enterotoxigenic *Escherichia coli* with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Infect Immun* **70**:1530-7.
85. **Fleckenstein, J. M., K. Roy, J. F. Fischer, and M. Burkitt.** 2006. Identification of a two-partner secretion locus of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **74**:2245-58.
86. **Frankel, G., and A. D. Phillips.** 2008. Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. *Cell Microbiol* **10**:549-56.
87. **Frick, I. M., M. Morgelin, and L. Bjorck.** 2000. Virulent aggregates of *Streptococcus pyogenes* are generated by homophilic protein-protein interactions. *Mol Microbiol* **37**:1232-47.
88. **Galan, J. E., and H. Wolf-Watz.** 2006. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**:567-73.
89. **Gangwer, K. A., D. J. Mushrush, D. L. Stauff, B. Spiller, M. S. McClain, T. L. Cover, and D. B. Lacy.** 2007. Crystal structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin p55 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:16293-8.
90. **Genevaux, P., P. Bauda, M. S. DuBow, and B. Oudega.** 1999. Identification of Tn10 insertions in the rfaG, rfaP, and galU genes involved in lipopolysaccharide core biosynthesis that affect *Escherichia coli* adhesion. *Arch Microbiol* **172**:1-8.
91. **Gerlach, R. G., and M. Hensel.** 2007. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol* **297**:401-15.
92. **Ghosh, S. K., J. Zhao, M. C. Philogene, A. Alzaharani, S. Rane, and A. Banerjee.** 2004. Pathogenic consequences of *Neisseria gonorrhoeae* pilin glycan variation. *Microbes Infect* **6**:693-701.
93. **Giltner, C. L., E. J. van Schaik, G. F. Audette, D. Kao, R. S. Hodges, D. J. Hassett, and R. T. Irvin.** 2006. The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces. *Mol Microbiol* **59**:1083-96.

94. **Girard, V., and M. Mourez.** 2006. Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: structural and functional features. *Res Microbiol* **157**:407-16.
95. **Giron, J. A., A. G. Torres, E. Freer, and J. B. Kaper.** 2002. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol* **44**:361-79.
96. **Gomez-Duarte, O. G., S. Chattopadhyay, S. J. Weissman, J. A. Giron, J. B. Kaper, and E. V. Sokurenko.** 2007. Genetic diversity of the gene cluster encoding longus, a type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**:9145-9.
97. **Goodson, R. J., M. V. Doyle, S. E. Kaufman, and S. Rosenberg.** 1994. High-affinity urokinase receptor antagonists identified with bacteriophage peptide display. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:7129-33.
98. **Goon, S., J. F. Kelly, S. M. Logan, C. P. Ewing, and P. Guerry.** 2003. Pseudaminic acid, the major modification on *Campylobacter* flagellin, is synthesized via the Cj1293 gene. *Mol Microbiol* **50**:659-71.
99. **Grass, S., A. Z. Buscher, W. E. Swords, M. A. Apicella, S. J. Barenkamp, N. Ozchlewski, and J. W. St Geme, 3rd.** 2003. The *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin is glycosylated in a process that requires HMW1C and phosphoglucomutase, an enzyme involved in lipooligosaccharide biosynthesis. *Mol Microbiol* **48**:737-51.
100. **Ha, S. K., C. Choi, and C. Chae.** 2003. Prevalence of a gene encoding adhesin involved in diffuse adherence among *Escherichia coli* isolates in pigs with postweaning diarrhea or edema disease. *J Vet Diagn Invest* **15**:378-81.
101. **Hammar, M., Z. Bian, and S. Normark.** 1996. Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:6562-6.
102. **Harrison, O. J., E. M. Corps, and P. J. Kilshaw.** 2005. Cadherin adhesion depends on a salt bridge at the N-terminus. *J Cell Sci* **118**:4123-30.
103. **Hartland, E. L., S. J. Daniell, R. M. Delahay, B. C. Neves, T. Wallis, R. K. Shaw, C. Hale, S. Knutton, and G. Frankel.** 2000. The type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli* involves EspA-EspB protein interactions. *Mol Microbiol* **35**:1483-92.
104. **Hasman, H., T. Chakraborty, and P. Klemm.** 1999. Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. *J Bacteriol* **181**:4834-41.
105. **Haugen, B. J., S. Pellett, P. Redford, H. L. Hamilton, P. L. Roesch, and R. A. Welch.** 2007. In vivo gene expression analysis identifies genes required for enhanced colonization of the mouse urinary tract by uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 dsdA. *Infect Immun* **75**:278-89.
106. **Haussinger, D., T. Ahrens, T. Aberle, J. Engel, J. Stetefeld, and S. Grzesiek.** 2004. Proteolytic E-cadherin activation followed by solution NMR and X-ray crystallography. *Embo J* **23**:1699-708.
107. **Haussinger, D., T. Ahrens, H. J. Sass, O. Pertz, J. Engel, and S. Grzesiek.** 2002. Calcium-dependent homoassociation of E-cadherin by NMR spectroscopy: changes in mobility, conformation and mapping of contact regions. *J Mol Biol* **324**:823-39.



108. He, W., P. Cowin, and D. L. Stokes. 2003. Untangling desmosomal knots with electron tomography. *Science* **302**:109-13.
109. Heise, T., and P. Dersch. 2006. Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:3375-80.
110. Henderson, I. R., and J. P. Nataro. 2005. Autotransporters proteins-module 8.7.3. In *Escherichia and Salmonella* : cellular and molecular biology-online.
111. 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.
112. Hernandez, J. A., M. T. Bes, M. F. Fillat, J. L. Neira, and M. L. Peleato. 2002. Biochemical analysis of the recombinant Fur (ferric uptake regulator) protein from *Anabaena* PCC 7119: factors affecting its oligomerization state. *Biochem J* **366**:315-22.
113. Herrmann, J. L., P. O'Gaora, A. Gallagher, J. E. Thole, and D. B. Young. 1996. Bacterial glycoproteins: a link between glycosylation and proteolytic cleavage of a 19 kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *Embo J* **15**:3547-54.
114. Hughes, D. T., and V. Sperandio. 2008. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat Rev Microbiol* **6**:111-20.
115. Hyde-DeRuyscher, R., L. A. Paige, D. J. Christensen, N. Hyde-DeRuyscher, A. Lim, Z. L. Fredericks, J. Kranz, P. Gallant, J. Zhang, S. M. Rocklage, D. M. Fowlkes, P. A. Wendler, and P. T. Hamilton. 2000. Detection of small-molecule enzyme inhibitors with peptides isolated from phage-displayed combinatorial peptide libraries. *Chem Biol* **7**:17-25.
116. Hyland, R. M., J. Sun, T. P. Griener, G. L. Mulvey, J. S. Klassen, M. S. Donnenberg, and G. D. Armstrong. 2008. The bundlin pilin protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is an N-acetyllactosamine-specific lectin. *Cell Microbiol* **10**:177-87.
117. Idanpaan-Heikkila, I., P. M. Simon, D. Zopf, T. Vullo, P. Cahill, K. Sokol, and E. Tuomanen. 1997. Oligosaccharides interfere with the establishment and progression of experimental pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* **176**:704-12.
118. Ieva, R., K. M. Skillman, and H. D. Bernstein. 2008. Incorporation of a polypeptide segment into the beta-domain pore during the assembly of a bacterial autotransporter. *Mol Microbiol* **67**:188-201.
119. Ilver, D., A. Arnqvist, J. Ogren, I. M. Frick, D. Kersulyte, E. T. Incecik, D. E. Berg, A. Covacci, L. Engstrand, and T. Boren. 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* **279**:373-7.
120. Imperiali, B., and S. E. O'Connor. 1999. Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Curr Opin Chem Biol* **3**:643-9.
121. Jacob-Dubuisson, F., C. Locht, and R. Antoine. 2001. Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol Microbiol* **40**:306-13.
122. Jallat, C., A. Darfeuille-Michaud, C. Rich, and B. Joly. 1994. Survey of clinical isolates of diarrhoeogenic *Escherichia coli*: diffusely adhering *E. coli* strains with multiple adhesive factors. *Res Microbiol* **145**:621-32.

123. **Jay, C. M., S. Bhaskaran, K. S. Rathore, and S. D. Waghela.** 2004. Enterotoxigenic K99+ *Escherichia coli* attachment to host cell receptors inhibited by recombinant pili protein. *Vet Microbiol* **101**:153-60.
124. **Jong, W. S., C. M. ten Hagen-Jongman, T. den Blaauwen, D. J. Slotboom, J. R. Tame, D. Wickstrom, J. W. de Gier, B. R. Otto, and J. Luirink.** 2007. Limited tolerance towards folded elements during secretion of the autotransporter Hbp. *Mol Microbiol* **63**:1524-36.
125. **Jose, J., J. Kramer, T. Klauser, J. Pohlner, and T. F. Meyer.** 1996. 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* **178**:107-10.
126. **Kallenius, G., R. Mollby, S. B. Svenson, J. Winberg, and H. Hultberg.** 1980. Identification of a carbohydrate receptor recognized by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection* **8 Suppl 3**:288-93.
127. **Kansau, I., C. Berger, M. Hospital, R. Amsellem, V. Nicolas, A. L. Servin, and M. F. Bernet-Camard.** 2004. Zipper-like internalization of Dr-positive *Escherichia coli* by epithelial cells is preceded by an adhesin-induced mobilization of raft-associated molecules in the initial step of adhesion. *Infect Immun* **72**:3733-42.
128. **Kelly, C. G., J. S. Younson, B. Y. Hikmat, S. M. Todryk, M. Czisch, P. I. Haris, I. R. Flindall, C. Newby, A. I. Mallet, J. K. Ma, and T. Lehner.** 1999. A synthetic peptide adhesion epitope as a novel antimicrobial agent. *Nat Biotechnol* **17**:42-7.
129. **Kingsley, R. A., D. Abi Ghanem, N. Puebla-Osorio, A. M. Kestra, L. Berghman, and A. J. Baumler.** 2004. Fibronectin binding to the *Salmonella* enterica serotype Typhimurium ShdA autotransporter protein is inhibited by a monoclonal antibody recognizing the A3 repeat. *J Bacteriol* **186**:4931-9.
130. **Kirn, T. J., M. J. Lafferty, C. M. Sandoe, and R. K. Taylor.** 2000. Delineation of pilin domains required for bacterial association into microcolonies and intestinal colonization by *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **35**:896-910.
131. **Kitagawa, M., M. Natori, S. Murase, S. Hirano, S. Taketani, and S. T. Suzuki.** 2000. Mutation analysis of cadherin-4 reveals amino acid residues of EC1 important for the structure and function. *Biochem Biophys Res Commun* **271**:358-63.
132. **Kjaergaard, K., M. A. Schembri, C. Ramos, S. Molin, and P. Klemm.** 2000. Antigen 43 facilitates formation of multispecies biofilms. *Environ Microbiol* **2**:695-702.
133. **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.
134. **Klemm, P., L. Hjerrild, M. Gjermansen, and M. A. Schembri.** 2004. Structure-function analysis of the self-recognizing Antigen 43 autotransporter protein from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **51**:283-96.
135. **Klemm, P., and M. Schembri.** 2004. Type 1 fimbriae, Curli, and Antigen 43 : Adhesion, Colonization and Biofilm Formation-chapter 8.3.2.6. In *Escherichia and Salmonella : cellular and molecular biology-online*.

136. **Klemm, P., R. M. Vejborg, and O. Sherlock.** 2006. Self-associating autotransporters, SAATs: functional and structural similarities. *Int J Med Microbiol* **296**:187-95.
137. **Klingelhofer, J., O. Y. Laur, R. B. Troyanovsky, and S. M. Troyanovsky.** 2002. Dynamic interplay between adhesive and lateral E-cadherin dimers. *Mol Cell Biol* **22**:7449-58.
138. **Knudsen, S. K., A. Stensballe, M. Franzmann, U. B. Westergaard, and D. E. Otzen.** 2008. Effect of glycosylation on the extracellular domain of the Ag43 bacterial autotransporter: enhanced stability and reduced cellular aggregation. *Biochem J*.
139. **Knurr, J., O. Benedek, J. Heslop, R. B. Vinson, J. A. Boydston, J. McAndrew, J. F. Kearney, and C. L. Turnbough, Jr.** 2003. Peptide ligands that bind selectively to spores of *Bacillus subtilis* and closely related species. *Appl Environ Microbiol* **69**:6841-7.
140. **Knutton, S., R. K. Shaw, R. P. Anantha, M. S. Donnenberg, and A. A. Zorgani.** 1999. The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. *Mol Microbiol* **33**:499-509.
141. **Koch, A. W., S. Pokutta, A. Lustig, and J. Engel.** 1997. Calcium binding and homoassociation of E-cadherin domains. *Biochemistry* **36**:7697-705.
142. **Konieczny, M. P. J., I. Benz, B. Hollinderbaumer, C. Beinke, M. Niederweis, and M. A. Schmidt.** 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.
143. **Kostakioti, M., and C. Stathopoulos.** 2004. Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* **72**:5548-54.
144. **Krogfelt, K. A., H. Bergmans, and P. Klemm.** 1990. Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Infect Immun* **58**:1995-8.
145. **Kukkonen, M., T. Raunio, R. Virkola, K. Lahteenmaki, P. H. Makela, P. Klemm, S. Clegg, and T. K. Korhonen.** 1993. Basement membrane carbohydrate as a target for bacterial adhesion: binding of type I fimbriae of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* to laminin. *Mol Microbiol* **7**:229-37.
146. **Kuo, C., N. Takahashi, A. F. Swanson, Y. Ozeki, and S. Hakomori.** 1996. An N-linked high-mannose type oligosaccharide, expressed at the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*, mediates attachment and infectivity of the microorganism to HeLa cells. *J Clin Invest* **98**:2813-8.
147. **Kuraya, N., and S. Hase.** 1992. Release of O-linked sugar chains from glycoproteins with anhydrous hydrazine and pyridylation of the sugar chains with improved reaction conditions. *J Biochem* **112**:122-6.
148. **Kyogashima, M., V. Ginsburg, and H. C. Krivan.** 1989. *Escherichia coli* K99 binds to N-glycolylsialoparagloboside and N-glycolyl-GM3 found in piglet small intestine. *Arch Biochem Biophys* **270**:391-7.
149. **Laarmann, S., D. Cutter, T. Juehne, S. J. Barenkamp, and J. W. St Geme.** 2002. The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter harbours two adhesive

- pockets that reside in the passenger domain and recognize the same host cell receptor. *Mol Microbiol* **46**:731-43.
150. **Laarmann, S., and M. A. Schmidt.** 2003. The *Escherichia coli* AIDA autotransporter adhesin recognizes an integral membrane glycoprotein as receptor. *Microbiology* **149**:1871-82.
  151. **Ladner, R. C., A. K. Sato, J. Gorzelany, and M. de Souza.** 2004. Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug Discov Today* **9**:525-9.
  152. **Lafontaine, E. R., L. D. Cope, C. Aebi, J. L. Latimer, G. H. McCracken, Jr., and E. J. Hansen.** 2000. The UspA1 protein and a second type of UspA2 protein mediate adherence of *Moraxella catarrhalis* to human epithelial cells in vitro. *J Bacteriol* **182**:1364-73.
  153. **Langsford, M. L., N. R. Gilkes, B. Singh, B. Moser, R. C. Miller, Jr., R. A. Warren, and D. G. Kilburn.** 1987. Glycosylation of bacterial cellulases prevents proteolytic cleavage between functional domains. *FEBS Lett* **225**:163-7.
  154. **Larsson, A., J. Ohlsson, K. W. Dodson, S. J. Hultgren, U. Nilsson, and J. Kihlberg.** 2003. Quantitative studies of the binding of the class II PapG adhesin from uropathogenic *Escherichia coli* to oligosaccharides. *Bioorg Med Chem* **11**:2255-61.
  155. **Laur, O. Y., J. Klingelhofer, R. B. Troyanovsky, and S. M. Troyanovsky.** 2002. Both the dimerization and immunochemical properties of E-cadherin EC1 domain depend on Trp(156) residue. *Arch Biochem Biophys* **400**:141-7.
  156. **Le Bouguenec, C., and J. P. Nataro.** 2005. Adhesins of Diffusely Adherent and Enteroaggregative *Escherichia coli*. In *Escherichia and Salmonella : cellular and molecular biology-online*.
  157. **Leckband, D., and J. Israelachvili.** 2001. Intermolecular forces in biology. *Q Rev Biophys* **34**:105-267.
  158. **Leckband, D., and A. Prakasham.** 2006. Mechanism and dynamics of cadherin adhesion. *Annu Rev Biomed Eng* **8**:259-87.
  159. **Lee, J. Y., H. T. Sojar, G. S. Bedi, and R. J. Genco.** 1992. Synthetic peptides analogous to the fimbrillin sequence inhibit adherence of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* **60**:1662-70.
  160. **Lee, K. K., W. Y. Wong, H. B. Sheth, R. S. Hodges, W. Paranchych, and R. T. Irvin.** 1995. Use of synthetic peptides in characterization of microbial adhesins. *Methods Enzymol* **253**:115-31.
  161. **Leininger, E., M. Roberts, J. G. Kenimer, I. G. Charles, N. Fairweather, P. Novotny, and M. J. Brennan.** 1991. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:345-9.
  162. **Levy, S. B.** 2005. Antibiotic resistance-the problem intensifies. *Adv Drug Deliv Rev* **57**:1446-50.
  163. **Leyton, D. L., L. M. Adams, M. Kelly, J. Sloan, M. Tauschek, R. M. Robins-Browne, and E. L. Hartland.** 2007. Contribution of a novel gene, *rpeA*, encoding a putative autotransporter adhesin to intestinal colonization by rabbit-specific enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **75**:4664-9.

164. Lillehoj, E. P., B. T. Kim, and K. C. Kim. 2002. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Mucl mucin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**:L751-6.
165. Lindenthal, C., and E. A. Elsinghorst. 1999. Identification of a glycoprotein produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **67**:4084-91.
166. Lindhorst, T. K., C. Kieburg, and U. Krallmann-Wenzel. 1998. Inhibition of the type 1 fimbriae-mediated adhesion of *Escherichia coli* to erythrocytes by multiantennary alpha-mannosyl clusters: the effect of multivalency. *Glycoconj J* **15**:605-13.
167. Luo, Y., E. A. Frey, R. A. Pfuetzner, A. L. Creagh, D. G. Knoechel, C. A. Haynes, B. B. Finlay, and N. C. Strynadka. 2000. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. *Nature* **405**:1073-7.
168. Macnab, R. M. 2003. How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* **57**:77-100.
169. Mahdavi, J., B. Sonden, M. Hurtig, F. O. Olfat, L. Forsberg, N. Roche, J. Angstrom, T. Larsson, S. Teneberg, K. A. Karlsson, S. Altraja, T. Wadstrom, D. Kersulyte, D. E. Berg, A. Dubois, C. Petersson, K. E. Magnusson, T. Norberg, F. Lindh, B. B. Lundskog, A. Arnqvist, L. Hammarstrom, and T. Boren. 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* **297**:573-8.
170. Mainil, J. G., E. Jacquemin, P. Pohl, A. Kaeckenbeeck, and I. Benz. 2002. DNA sequences coding for the F18 fimbriae and AIDA adhesin are localised on the same plasmid in *Escherichia coli* isolates from piglets. *Vet Microbiol* **86**:303-11.
171. Mandava, S., L. Makowski, S. Devarapalli, J. Uzubell, and D. J. Rodi. 2004. RELIC--a bioinformatics server for combinatorial peptide analysis and identification of protein-ligand interaction sites. *Proteomics* **4**:1439-60.
172. Marceau, M., K. Forest, J. L. Beretti, J. Tainer, and X. Nassif. 1998. Consequences of the loss of O-linked glycosylation of meningococcal type IV pilin on piliation and pilus-mediated adhesion. *Mol Microbiol* **27**:705-15.
173. Marceau, M., and X. Nassif. 1999. Role of glycosylation at Ser63 in production of soluble pilin in pathogenic *Neisseria*. *J Bacteriol* **181**:656-61.
174. Martindale, J., D. Stroud, E. R. Moxon, and C. M. Tang. 2000. Genetic analysis of *Escherichia coli* K1 gastrointestinal colonization. *Mol Microbiol* **37**:1293-305.
175. Martinez, J. J., and S. J. Hultgren. 2002. Requirement of Rho-family GTPases in the invasion of Type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **4**:19-28.
176. Martinez, J. J., M. A. Mulvey, J. D. Schilling, J. S. Pinkner, and S. J. Hultgren. 2000. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *Embo J* **19**:2803-12.
177. McIntosh, P. R., and R. B. Freedman. 1980. Characteristics of a copper-dependent cross-linking reaction between two forms of cytochrome P-450 in rabbit-liver microsomal membranes. *Biochem J* **187**:227-37.
178. McMichael, J. C., M. J. Fiske, R. A. Fredenburg, D. N. Chakravarti, K. R. VanDerMeid, V. Barniak, J. Caplan, E. Bortell, S. Baker, R. Arumugham, and D. Chen. 1998. Isolation and characterization of two proteins from *Moraxella catarrhalis* that bear a common epitope. *Infect Immun* **66**:4374-81.

179. Mendel, D., J. A. Ellman, Z. Chang, D. L. Veenstra, P. A. Kollman, and P. G. Schultz. 1992. Probing protein stability with unnatural amino acids. *Science* **256**:1798-802.
180. Meng, G., N. K. Surana, J. W. St Geme, 3rd, and G. Waksman. 2006. Structure of the outer membrane translocator domain of the *Haemophilus influenzae* Hia trimeric autotransporter. *Embo J* **25**:2297-304.
181. Menozzi, F. D., P. E. Boucher, G. Riveau, C. Gantiez, and C. Locht. 1994. Surface-associated filamentous hemagglutinin induces autoagglutination of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **62**:4261-9.
182. Mintz, K. P. 2004. Identification of an extracellular matrix protein adhesin, EmaA, which mediates the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to collagen. *Microbiology* **150**:2677-88.
183. Mobley, H. L., K. G. Jarvis, J. P. Elwood, D. I. Whittle, C. V. Lockett, R. G. Russell, D. E. Johnson, M. S. Donnenberg, and J. W. Warren. 1993. Isogenic P-fimbrial deletion mutants of pyelonephritogenic *Escherichia coli*: the role of alpha Gal(1-4) beta Gal binding in virulence of a wild-type strain. *Mol Microbiol* **10**:143-55.
184. Mogensen, J. E., and D. E. Otzen. 2005. Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. *Mol Microbiol* **57**:326-46.
185. Moormann, C., I. Benz, and M. A. Schmidt. 2002. Functional substitution of the TibC protein of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains for the autotransporter adhesin heptosyltransferase of the AIDA system. *Infect Immun* **70**:2264-70.
186. Mourez, M., and R. J. Collier. 2004. Use of phage display and polyvalency to design inhibitors of protein-protein interactions. *Methods Mol Biol* **261**:213-28.
187. Mourez, M., R. S. Kane, J. Mogridge, S. Metallo, P. Deschatelets, B. R. Sellman, G. M. Whitesides, and R. J. Collier. 2001. Designing a polyvalent inhibitor of anthrax toxin. *Nat Biotechnol* **19**:958-61.
188. Mulvey, G. L., P. Marcato, P. I. Kitov, J. Sadowska, D. R. Bundle, and G. D. Armstrong. 2003. Assessment in mice of the therapeutic potential of tailored, multivalent Shiga toxin carbohydrate ligands. *J Infect Dis* **187**:640-9.
189. Mysore, J. V., T. Wigginton, P. M. Simon, D. Zopf, L. M. Heman-Ackah, and A. Dubois. 1999. Treatment of *Helicobacter pylori* infection in rhesus monkeys using a novel antiadhesion compound. *Gastroenterology* **117**:1316-25.
190. Nagahori, N., R. T. Lee, S. Nishimura, D. Page, R. Roy, and Y. C. Lee. 2002. Inhibition of adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli* to highly mannosylated ligands. *Chembiochem* **3**:836-44.
191. Nataro, J. P., Y. Deng, D. R. Maneval, A. L. German, W. C. Martin, and M. M. Levine. 1992. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEP-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun* **60**:2297-304.
192. Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**:142-201.
193. Ngeleka, M., J. Pritchard, G. Appleyard, D. M. Middleton, and J. M. Fairbrother. 2003. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J Vet Diagn Invest* **15**:242-52.

194. **Niemann, H. H., W. D. Schubert, and D. W. Heinz.** 2004. Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. *Microbes Infect* **6**:101-12.
195. **Niewerth, U., A. Frey, T. Voss, C. Le Bouguenec, G. Baljer, S. Franke, and M. A. Schmidt.** 2001. The AIDA autotransporter system is associated with F18 and stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**:143-9.
196. **Nishikawa, K., K. Matsuoka, E. Kita, N. Okabe, M. Mizuguchi, K. Hino, S. Miyazawa, C. Yamasaki, J. Aoki, S. Takashima, Y. Yamakawa, M. Nishijima, D. Terunuma, H. Kuzuhara, and Y. Natori.** 2002. A therapeutic agent with oriented carbohydrates for treatment of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:7669-74.
197. **Nose, A., K. Tsuji, and M. Takeichi.** 1990. Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell* **61**:147-55.
198. **Nougayrede, J. P., P. J. Fernandes, and M. S. Donnenberg.** 2003. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol* **5**:359-72.
199. **Nowicki, B., A. Labigne, S. Moseley, R. Hull, S. Hull, and J. Moulds.** 1990. The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins AFA-I and AFA-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. *Infect Immun* **58**:279-81.
200. **Nuccio, S. P., and A. J. Baumler.** 2007. Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**:551-75.
201. **Nummelin, H., M. C. Merckel, J. C. Leo, H. Lankinen, M. Skurnik, and A. Goldman.** 2004. The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. *Embo J* **23**:701-11.
202. **Odenbreit, S., M. Till, D. Hofreuter, G. Faller, and R. Haas.** 1999. Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol Microbiol* **31**:1537-48.
203. **Ofek, I., D. L. Hasty, and N. Sharon.** 2003. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunol Med Microbiol* **38**:181-91.
204. **Ohlsson, J., J. Jass, B. E. Uhlin, J. Kihlberg, and U. J. Nilsson.** 2002. Discovery of potent inhibitors of PapG adhesins from uropathogenic *Escherichia coli* through synthesis and evaluation of galabiose derivatives. *Chembiochem* **3**:772-9.
205. **Ohlsson, J., A. Larsson, S. Haataja, J. Alajaaski, P. Stenlund, J. S. Pinkner, S. J. Hultgren, J. Finne, J. Kihlberg, and U. J. Nilsson.** 2005. Structure-activity relationships of galabioside derivatives as inhibitors of *E. coli* and *S. suis* adhesins: nanomolar inhibitors of *S. suis* adhesins. *Org Biomol Chem* **3**:886-900.
206. **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.
207. **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.
208. **Orskov, I., and F. Orskov.** 1990. Serologic classification of fimbriae. *Curr Top Microbiol Immunol* **151**:71-90.

209. **Otto, B. R., R. Sijbrandi, J. Luirink, B. Oudega, J. G. Heddle, K. Mizutani, S. Y. Park, and J. R. Tame.** 2005. Crystal structure of hemoglobin protease, a heme binding autotransporter protein from pathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**:17339-45.
210. **Ottow, J. C.** 1975. Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. *Annu Rev Microbiol* **29**:79-108.
211. **Ozawa, M.** 2002. Lateral dimerization of the E-cadherin extracellular domain is necessary but not sufficient for adhesive activity. *J Biol Chem* **277**:19600-8.
212. **Pallen, M. J., R. R. Chaudhuri, and I. R. Henderson.** 2003. Genomic analysis of secretion systems. *Curr Opin Microbiol* **6**:519-27.
213. **Paradis-Bleau, C., F. Sanschagrin, and R. C. Levesque.** 2005. Peptide inhibitors of the essential cell division protein FtsA. *Protein Eng Des Sel* **18**:85-91.
214. **Paradis, S. E., D. Dubreuil, S. Rioux, M. Gottschalk, and M. Jacques.** 1994. High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infect Immun* **62**:3311-9.
215. **Parisini, E., J. M. Higgins, J. H. Liu, M. B. Brenner, and J. H. Wang.** 2007. The crystal structure of human E-cadherin domains 1 and 2, and comparison with other cadherins in the context of adhesion mechanism. *J Mol Biol* **373**:401-11.
216. **Parsek, M. R., and E. P. Greenberg.** 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* **13**:27-33.
217. **Patel, S. D., C. P. Chen, F. Bahna, B. Honig, and L. Shapiro.** 2003. Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family. *Curr Opin Struct Biol* **13**:690-8.
218. **Paton, A. W., P. Srimanote, M. C. Woodrow, and J. C. Paton.** 2001. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun* **69**:6999-7009.
219. **Pautsch, A., and G. E. Schulz.** 2000. High-resolution structure of the OmpA membrane domain. *J Mol Biol* **298**:273-82.
220. **Pearson, M. M., E. R. Lafontaine, N. J. Wagner, J. W. St Geme, 3rd, and E. J. Hansen.** 2002. A hag mutant of *Moraxella catarrhalis* strain O35E is deficient in hemagglutination, autoagglutination, and immunoglobulin D-binding activities. *Infect Immun* **70**:4523-33.
221. **Permanne, B., C. Adessi, G. P. Saborio, S. Fraga, M. J. Frossard, J. Van Dorpe, I. Dewachter, W. A. Banks, F. Van Leuven, and C. Soto.** 2002. Reduction of amyloid load and cerebral damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by treatment with a beta-sheet breaker peptide. *Faseb J* **16**:860-2.
222. **Perret, E., A. Leung, H. Feracci, and E. Evans.** 2004. Trans-bonded pairs of E-cadherin exhibit a remarkable hierarchy of mechanical strengths. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:16472-7.
223. **Pertz, O., D. Bozic, A. W. Koch, C. Fauser, A. Brancaccio, and J. Engel.** 1999. A new crystal structure, Ca<sup>2+</sup> dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *Embo J* **18**:1738-47.



224. **Pieters, R. J.** 2007. Intervention with bacterial adhesion by multivalent carbohydrates. *Med Res Rev* **27**:796-816.
225. **Pinkner, J. S., H. Remaut, F. Buelens, E. Miller, V. Aberg, N. Pemberton, M. Hedenstrom, A. Larsson, P. Seed, G. Waksman, S. J. Hultgren, and F. Almqvist.** 2006. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:17897-902.
226. **Pizarro-Cerda, J., and P. Cossart.** 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* **124**:715-27.
227. **Plancon, L., L. Du Merle, S. Le Friec, P. Gounon, M. Jouve, J. Guignot, A. Servin, and C. Le Bouguenec.** 2003. Recognition of the cellular beta1-chain integrin by the bacterial AfaD invasin is implicated in the internalization of afa-expressing pathogenic *Escherichia coli* strains. *Cell Microbiol* **5**:681-93.
228. **Pohlner, J., R. Halter, K. Beyreuther, and T. F. Meyer.** 1987. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **325**:458-62.
229. **Pouttu, R., T. Puustinen, R. Virkola, J. Hacker, P. Klemm, and T. K. Korhonen.** 1999. Amino acid residue Ala-62 in the FimH fimbrial adhesin is critical for the adhesiveness of meningitis-associated *Escherichia coli* to collagens. *Mol Microbiol* **31**:1747-57.
230. **Power, P. M., L. F. Roddam, K. Rutter, S. Z. Fitzpatrick, Y. N. Srikhanta, and M. P. Jennings.** 2003. Genetic characterization of pilin glycosylation and phase variation in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **49**:833-47.
231. **Prakasam, A., Y. H. Chien, V. Maruthamuthu, and D. E. Leckband.** 2006. Calcium site mutations in cadherin: impact on adhesion and evidence of cooperativity. *Biochemistry* **45**:6930-9.
232. **Pratt, L. A., and R. Kolter.** 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**:285-93.
233. **Ramboarina, S., P. J. Fernandes, S. Daniell, S. Islam, P. Simpson, G. Frankel, F. Booy, M. S. Donnenberg, and S. Matthews.** 2005. Structure of the bundle-forming pilus from enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**:40252-60.
234. **Ramer, S. W., G. K. Schoolnik, C. Y. Wu, J. Hwang, S. A. Schmidt, and D. Bieber.** 2002. The type IV pilus assembly complex: biogenic interactions among the bundle-forming pilus proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**:3457-65.
235. **Ravi, M., M. Ngeleka, S. H. Kim, C. Gyles, F. Berthiaume, M. Mourez, D. Middleton, and E. Simko.** 2007. Contribution of AIDA-I to the pathogenicity of a porcine diarrheagenic *Escherichia coli* and to intestinal colonization through biofilm formation in pigs. *Vet Microbiol* **120**:308-19.
236. **Riess, T., S. G. Andersson, A. Lupas, M. Schaller, A. Schafer, P. Kyme, J. Martin, J. H. Walzlein, U. Eehalt, H. Lindroos, M. Schirle, A. Nordheim, I. B. Autenrieth, and V. A. Kempf.** 2004. *Bartonella* adhesin a mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp Med* **200**:1267-78.
237. **Robins-Browne, R. M., and E. L. Hartland.** 2002. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. *J Gastroenterol Hepatol* **17**:467-75.

238. **Robinson, L. S., E. M. Ashman, S. J. Hultgren, and M. R. Chapman.** 2006. Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein. *Mol Microbiol* **59**:870-81.
239. **Roggenkamp, A., H. R. Neuberger, A. Flugel, T. Schmoll, and J. Heesemann.** 1995. Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol Microbiol* **16**:1207-19.
240. **Roux, A., C. Beloin, and J. M. Ghigo.** 2005. Combined inactivation and expression strategy to study gene function under physiological conditions: application to identification of new *Escherichia coli* adhesins. *J Bacteriol* **187**:1001-13.
241. **Rutherford, N., M. E. Charbonneau, F. Berthiaume, J. M. Betton, and M. Mourez.** 2006. The periplasmic folding of a cysteineless autotransporter passenger domain interferes with its outer membrane translocation. *J Bacteriol* **188**:4111-6.
242. **Salminen, A., V. Loimaranta, J. A. Joosten, A. S. Khan, J. Hacker, R. J. Pieters, and J. Finne.** 2007. Inhibition of P-fimbriated *Escherichia coli* adhesion by multivalent galabiose derivatives studied by a live-bacteria application of surface plasmon resonance. *J Antimicrob Chemother* **60**:495-501.
243. **Sandt, C. H., and C. W. Hill.** 2000. Four different genes responsible for nonimmune immunoglobulin-binding activities within a single strain of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **68**:2205-14.
244. **Sauer, F. G., H. Remaut, S. J. Hultgren, and G. Waksman.** 2004. Fiber assembly by the chaperone-usher pathway. *Biochim Biophys Acta* **1694**:259-67.
245. **Scaletsky, I. C., M. Z. Pedroso, M. B. Morais, R. L. Carvalho, R. M. Silva, S. H. Fabbricotti, and U. Fagundes-Neto.** 1999. [Association of patterns of *Escherichia coli* adherence to HEp-2 cells with acute and persistent diarrhea]. *Arq Gastroenterol* **36**:54-60.
246. **Scarselli, M., D. Serruto, P. Montanari, B. Capecchi, J. Adu-Bobie, D. Veggi, R. Rappuoli, M. Pizza, and B. Arico.** 2006. *Neisseria meningitidis* NhhA is a multifunctional trimeric autotransporter adhesin. *Mol Microbiol* **61**:631-44.
247. **Schembri, M. A., G. Christiansen, and P. Klemm.** 2001. FimH-mediated autoaggregation of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **41**:1419-30.
248. **Schembri, M. A., and P. Klemm.** 2001. Biofilm formation in a hydrodynamic environment by novel fimh variants and ramifications for virulence. *Infect Immun* **69**:1322-8.
249. **Schembri, M. A., and P. Klemm.** 2001. Coordinate gene regulation by fimbriae-induced signal transduction. *Embo J* **20**:3074-81.
250. **Schembri, M. A., E. V. Sokurenko, and P. Klemm.** 2000. Functional flexibility of the FimH adhesin: insights from a random mutant library. *Infect Immun* **68**:2638-46.
251. **Schifferli, D. M.** 2005. Adhesins of Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains that infect animals-chapter 8.3.2.1.2. In *Escherichia and Salmonella : cellular and molecular biology-online*.
252. **Schweizer, F., H. Jiao, O. Hindsgaul, W. Y. Wong, and R. T. Irvin.** 1998. Interaction between the pili of *Pseudomonas aeruginosa* PAK and its carbohydrate receptor beta-D-GalNAc(1-->4)beta-D-Gal analogs. *Can J Microbiol* **44**:307-11.

253. **Serruto, D., J. Adu-Bobie, M. Scarselli, D. Veggi, M. Pizza, R. Rappuoli, and B. Arico.** 2003. *Neisseria meningitidis* App, a new adhesin with autocatalytic serine protease activity. *Mol Microbiol* **48**:323-34.
254. **Shan, W., Y. Yagitá, Z. Wang, A. Koch, A. F. Svenningsen, E. Gruzglin, L. Pedraza, and D. R. Colman.** 2004. The minimal essential unit for cadherin-mediated intercellular adhesion comprises extracellular domains 1 and 2. *J Biol Chem* **279**:55914-23.
255. **Shan, W. S., H. Tanaka, G. R. Phillips, K. Arndt, M. Yoshida, D. R. Colman, and L. Shapiro.** 2000. Functional cis-heterodimers of N- and R-cadherins. *J Cell Biol* **148**:579-90.
256. **Shapiro, J. A.** 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu Rev Microbiol* **52**:81-104.
257. **Shapiro, L., A. M. Fannon, P. D. Kwong, A. Thompson, M. S. Lehmann, G. Grubel, J. F. Legrand, J. Als-Nielsen, D. R. Colman, and W. A. Hendrickson.** 1995. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* **374**:327-37.
258. **Shapiro, L., P. D. Kwong, A. M. Fannon, D. R. Colman, and W. A. Hendrickson.** 1995. Considerations on the folding topology and evolutionary origin of cadherin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:6793-7.
259. **Sharma, A., H. T. Sojar, J. Y. Lee, and R. J. Genco.** 1993. Expression of a functional *Porphyromonas gingivalis* fimbriin polypeptide in *Escherichia coli*: purification, physicochemical and immunochemical characterization, and binding characteristics. *Infect Immun* **61**:3570-3.
260. **Shaw, R. K., S. Daniell, F. Ebel, G. Frankel, and S. Knutton.** 2001. EspA filament-mediated protein translocation into red blood cells. *Cell Microbiol* **3**:213-22.
261. **Sherlock, O., U. Dobrindt, J. B. Jensen, R. Munk Vejborg, and P. Klemm.** 2006. Glycosylation of the self-recognizing *Escherichia coli* Ag43 autotransporter protein. *J Bacteriol* **188**:1798-807.
262. **Sherlock, O., M. A. Schembri, A. Reisner, and P. Klemm.** 2004. Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. *J Bacteriol* **186**:8058-65.
263. **Sherlock, O., R. M. Vejborg, and P. Klemm.** 2005. The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infect Immun* **73**:1954-63.
264. **Shin, S., G. Lu, M. Cai, and K. S. Kim.** 2005. *Escherichia coli* outer membrane protein A adheres to human brain microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **330**:1199-204.
265. **Sijbrandi, R., M. L. Urbanus, C. M. ten Hagen-Jongman, H. D. Bernstein, B. Oudega, B. R. Otto, and J. Luirink.** 2003. Signal recognition particle (SRP)-mediated targeting and Sec-dependent translocation of an extracellular *Escherichia coli* protein. *J Biol Chem* **278**:4654-9.
266. **Simon, P. M., P. L. Goode, A. Mobasser, and D. Zopf.** 1997. Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharides. *Infect Immun* **65**:750-7.

267. **Sivasankar, S., W. Briehner, N. Lavrik, B. Gumbiner, and D. Leckband.** 1999. Direct molecular force measurements of multiple adhesive interactions between cadherin ectodomains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:11820-4.
268. **Sivasankar, S., B. Gumbiner, and D. Leckband.** 2001. Direct measurements of multiple adhesive alignments and unbinding trajectories between cadherin extracellular domains. *Biophys J* **80**:1758-68.
269. **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.
270. **Smith, J. L., P. M. Fratamico, and N. W. Gunther.** 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis* **4**:134-63.
271. **Smith, S. G., V. Mahon, M. A. Lambert, and R. P. Fagan.** 2007. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol Lett* **273**:1-11.
272. **Snyder, J. A., B. J. Haugen, C. V. Lockatell, N. Maroncle, E. C. Hagan, D. E. Johnson, R. A. Welch, and H. L. Mobley.** 2005. Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **73**:7588-96.
273. **Sokurenko, E. V., V. Chesnokova, D. E. Dykhuizen, I. Ofek, X. R. Wu, K. A. Krogfelt, C. Struve, M. A. Schembri, and D. L. Hasty.** 1998. Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:8922-6.
274. **Soto, G. E., and S. J. Hultgren.** 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol* **181**:1059-71.
275. **St Geme, J. W., 3rd, D. Cutter, and S. J. Barenkamp.** 1996. Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils. *J Bacteriol* **178**:6281-7.
276. **Stevens, M. P., and T. Wallis.** 2005. Adhesins of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*-chapter 8.3.2.3. In *Escherichia and Salmonella : cellular and molecular biology-online*.
277. **Stimson, E., M. Virji, K. Makepeace, A. Dell, H. R. Morris, G. Payne, J. R. Saunders, M. P. Jennings, S. Barker, M. Panico, and et al.** 1995. Meningococcal pilin: a glycoprotein substituted with digalactosyl 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose. *Mol Microbiol* **17**:1201-14.
278. **Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies, and J. W. Costerton.** 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**:187-209.
279. **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.
280. **Sung, M. A., K. Fleming, H. A. Chen, and S. Matthews.** 2001. The solution structure of PapGII from uropathogenic *Escherichia coli* and its recognition of glycolipid receptors. *EMBO Rep* **2**:621-7.
281. **Surana, N. K., D. Cutter, S. J. Barenkamp, and J. W. St Geme, 3rd.** 2004. The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter contains an unusually short trimeric translocator domain. *J Biol Chem* **279**:14679-85.
282. **Svensson, A., A. Larsson, H. Emtenas, M. Hedenstrom, T. Fex, S. J. Hultgren, J. S. Pinkner, F. Almqvist, and J. Kihlberg.** 2001. Design and evaluation of

- pilicides: potential novel antibacterial agents directed against uropathogenic *Escherichia coli*. *Chembiochem* **2**:915-8.
283. **Swanson, A. F., and C. C. Kuo.** 1994. Binding of the glycan of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* to HeLa cells. *Infect Immun* **62**:24-8.
284. **Szabady, R. L., J. H. Peterson, K. M. Skillman, and H. D. Bernstein.** 2005. An unusual signal peptide facilitates late steps in the biogenesis of a bacterial autotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:221-6.
285. **Szardenings, M., S. Tornroth, F. Mutulis, R. Muceniece, K. Keinanen, A. Kuusinen, and J. E. Wikberg.** 1997. Phage display selection on whole cells yields a peptide specific for melanocortin receptor 1. *J Biol Chem* **272**:27943-8.
286. **Szymanski, C. M., and B. W. Wren.** 2005. Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. *Nat Rev Microbiol* **3**:225-37.
287. **Tamm, A., A. M. Tarkkanen, T. K. Korhonen, P. Kuusela, P. Toivanen, and M. Skurnik.** 1993. Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **10**:995-1011.
288. **Tamura, K., W. S. Shan, W. A. Hendrickson, D. R. Colman, and L. Shapiro.** 1998. Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. *Neuron* **20**:1153-63.
289. **Tarr, P. I., S. S. Bilge, J. C. Vary, Jr., S. Jelacic, R. L. Habeeb, T. R. Ward, M. R. Baylor, and T. E. Besser.** 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun* **68**:1400-7.
290. **Taylor, E. M., D. A. Otero, W. A. Banks, and J. S. O'Brien.** 2000. Retro-inverso prosaptide peptides retain bioactivity, are stable *In vivo*, and are blood-brain barrier permeable. *J Pharmacol Exp Ther* **295**:190-4.
291. **Thanassi, D. G., S.-E. Nuccio, S. Shu Kin So, and A. J. Baumler.** 2007. Fimbriae : classification and biochemistry-chapter 2.4.2.1. In *Escherichia and Salmonella : cellular and molecular biology-online*.
292. **Thibault, P., S. M. Logan, J. F. Kelly, J. R. Brisson, C. P. Ewing, T. J. Trust, and P. Guerry.** 2001. Identification of the carbohydrate moieties and glycosylation motifs in *Campylobacter jejuni* flagellin. *J Biol Chem* **276**:34862-70.
293. **Timpe, J. M., M. M. Holm, S. L. Vanlerberg, V. Basrur, and E. R. Lafontaine.** 2003. Identification of a *Moraxella catarrhalis* outer membrane protein exhibiting both adhesin and lipolytic activities. *Infect Immun* **71**:4341-50.
294. **Tomoeda, M., M. Inuzuka, and T. Date.** 1975. Bacterial sex pili. *Prog Biophys Mol Biol* **30**:23-56.
295. **Tomschy, A., C. Fauser, R. Landwehr, and J. Engel.** 1996. Homophilic adhesion of E-cadherin occurs by a co-operative two-step interaction of N-terminal domains. *Embo J* **15**:3507-14.
296. **Torres, A. G.** 2006. Adhesins of Enteropathogenic *Escherichia coli*-chapter 8.3.2.4. In *Escherichia and Salmonella : cellular and molecular biology-online*.
297. **Torres, A. G., and J. B. Kaper.** 2003. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Infect Immun* **71**:4985-95.

298. **Torres, A. G., N. T. Perna, V. Burland, A. Ruknudin, F. R. Blattner, and J. B. Kaper.** 2002. Characterization of Cah, a calcium-binding and heat-extractable autotransporter protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **45**:951-66.
299. **Torres, A. G., X. Zhou, and J. B. Kaper.** 2005. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun* **73**:18-29.
300. **Trent, M. S.** 2004. Biosynthesis, transport, and modification of lipid A. *Biochem Cell Biol* **82**:71-86.
301. **Troyanovsky, R. B., J. Klingelhofer, and S. Troyanovsky.** 1999. Removal of calcium ions triggers a novel type of intercadherin interaction. *J Cell Sci* **112** ( Pt 23):4379-87.
302. **Troyanovsky, R. B., E. Sokolov, and S. M. Troyanovsky.** 2003. Adhesive and lateral E-cadherin dimers are mediated by the same interface. *Mol Cell Biol* **23**:7965-72.
303. **Turner, D. P., A. G. Marietou, L. Johnston, K. K. Ho, A. J. Rogers, K. G. Wooldridge, and D. A. Ala'Aldeen.** 2006. Characterization of MspA, an immunogenic autotransporter protein that mediates adhesion to epithelial and endothelial cells in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **74**:2957-64.
304. **Uchiyama, T.** 2003. Adherence to and invasion of Vero cells by recombinant *Escherichia coli* expressing the outer membrane protein rOmpB of *Rickettsia japonica*. *Ann N Y Acad Sci* **990**:585-90.
305. **Uhlich, G. A., J. E. Keen, and R. O. Elder.** 2002. Variations in the csgD promoter of *Escherichia coli* O157:H7 associated with increased virulence in mice and increased invasion of HEp-2 cells. *Infect Immun* **70**:395-9.
306. **Upreti, R. K., M. Kumar, and V. Shankar.** 2003. Bacterial glycoproteins: functions, biosynthesis and applications. *Proteomics* **3**:363-79.
307. **Valle, J., A. N. Mabbett, G. C. Ulett, A. Toledo-Arana, K. Wecker, M. Totsika, M. A. Schembri, J. M. Ghigo, and C. Beloin.** 2008. UpaG, a new member of the trimeric autotransporter family of adhesins in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*
308. **Van den Steen, P., P. M. Rudd, R. A. Dwek, and G. Opdenakker.** 1998. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **33**:151-208.
309. **van der Goot, F. G., J. Lakey, F. Pattus, C. M. Kay, O. Sorokine, A. Van Dorsselaer, and J. T. Buckley.** 1992. Spectroscopic study of the activation and oligomerization of the channel-forming toxin aerolysin: identification of the site of proteolytic activation. *Biochemistry* **31**:8566-70.
310. **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.
311. **Weber, S. J., D. L. Greene, V. J. Hruba, H. I. Yamamura, F. Porreca, and T. P. Davis.** 1992. Whole body and brain distribution of [3H]cyclic [D-Pen<sup>2</sup>,D-Pen<sup>5</sup>] enkephalin after intraperitoneal, intravenous, oral and subcutaneous administration. *J Pharmacol Exp Ther* **263**:1308-16.
312. **Wehrl, W., V. Brinkmann, P. R. Jungblut, T. F. Meyer, and A. J. Szczepek.** 2004. From the inside out--processing of the Chlamydial autotransporter PmpD and

- its role in bacterial adhesion and activation of human host cells. *Mol Microbiol* **51**:319-34.
313. **Wells, T. J., O. Sherlock, L. Rivas, A. Mahajan, S. A. Beatson, M. Torpdahl, R. I. Webb, L. P. Allsopp, K. S. Gobius, D. L. Gally, and M. A. Schembri.** 2008. EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. *Environ Microbiol* **10**:589-604.
  314. **West, S. A., A. S. Griffin, A. Gardner, and S. P. Diggle.** 2006. Social evolution theory for microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **4**:597-607.
  315. **Westerlund, B., P. Kuusela, J. Risteli, L. Risteli, T. Vartio, H. Rauvala, R. Virkola, and T. K. Korhonen.** 1989. The O75X adhesin of uropathogenic *Escherichia coli* is a type IV collagen-binding protein. *Mol Microbiol* **3**:329-37.
  316. **Westerlund, B., P. Kuusela, T. Vartio, I. van Die, and T. K. Korhonen.** 1989. A novel lectin-independent interaction of P fimbriae of *Escherichia coli* with immobilized fibronectin. *FEBS Lett* **243**:199-204.
  317. **Westerlund, B., I. Van Die, W. Hoekstra, R. Virkola, and T. K. Korhonen.** 1993. P fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* as multifunctional adherence organelles. *Zentralbl Bakteriol* **278**:229-37.
  318. **Wiles, T. J., R. R. Kulesus, and M. A. Mulvey.** 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* **85**:11-9.
  319. **Wilhelm, S., A. Gdynia, P. Tielen, F. Rosenau, and K. E. Jaeger.** 2007. The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *J Bacteriol* **189**:6695-703.
  320. **Wright, K. J., and S. J. Hultgren.** 2006. Sticky fibers and uropathogenesis: bacterial adhesins in the urinary tract. *Future Microbiol* **1**:75-87.
  321. **Yeo, H. J., S. E. Cotter, S. Laarmann, T. Juehne, J. W. St Geme, 3rd, and G. Waksman.** 2004. Structural basis for host recognition by the *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter. *Embo J* **23**:1245-56.
  322. **Yethon, J. A., D. E. Heinrichs, M. A. Monteiro, M. B. Perry, and C. Whitfield.** 1998. Involvement of waaY, waaQ, and waaP in the modification of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and their role in the formation of a stable outer membrane. *J Biol Chem* **273**:26310-6.
  323. **Zhang, P., B. B. Chomel, M. K. Schau, J. S. Goo, S. Droz, K. L. Kelminson, S. S. George, N. W. Lerche, and J. E. Koehler.** 2004. A family of variably expressed outer-membrane proteins (Vomp) mediates adhesion and autoaggregation in *Bartonella quintana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:13630-5.
  324. **Zhang, W., M. Zhao, L. Ruesch, A. Omot, and D. Francis.** 2007. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet Microbiol* **123**:145-52.
  325. **Zhao, L., X. Chen, X. Xu, G. Song, and X. Liu.** 2007. Analysis of the AIDA-I gene sequence and prevalence in *Escherichia coli* isolates from pigs with post-weaning diarrhoea and oedema disease. *Vet J*.
  326. **Zhu, B., S. Chappuis-Flament, E. Wong, I. E. Jensen, B. M. Gumbiner, and D. Leckband.** 2003. Functional analysis of the structural basis of homophilic cadherin adhesion. *Biophys J* **84**:4033-42.

# **ANNEXES**




# **Annexe 1**

## **Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: Structural and functional features**

Victoria Girard, Michael Mourez\*

Department of Pathology and Microbiology, School of Veterinary Medicine  
University of Montreal, 3200 Sicotte, Saint Hyacinthe, QC, J2S 7C6, Canada

\*Corresponding author: 

Publié en Juin 2006 dans Research in Microbiology  
Volume 157, issue 5, pages 407-16

**Abstract:**

The ability of bacterial proteins to promote adhesion to biological surfaces is a fundamental step in bacterial infections. Some bacterial adhesins belong to the family of autotransporters, which are secreted to the surface of Gram-negative bacteria by an elegantly simple mechanism. This review will summarize their functional and structural features.

**Keywords:**

Adhesion, autotransporters, type V secretion, aggregation, biofilm, Gram-negative bacteria, outer membrane protein

**1. Introduction**

Adhesion is a fundamental step in bacterial pathogenesis. As an early step of infection, bacteria can colonize their hosts by adhering to host cell surfaces or extracellular matrix. Bacteria can also adhere to inorganic objects that penetrate the host, such as medical devices, and thereby cause infection. Lastly, the intercellular adhesion of multiple bacterial cells together, also called autoaggregation, is of fundamental importance in the development of bacterial communities, such as microcolonies or biofilm, which display enhanced pathogenicity.

In most cases, the process of adhesion occurs via specific receptor-ligand interactions, where a receptor on the surface of a tissue is bound by a ligand on the bacterial surface. The ligand, which is a specialized bacterial protein called adhesin, can adopt several structures that can be divided into two main groups: fimbrial adhesins and afimbrial adhesins. Typically, fimbrial adhesins are long, polymeric, hair-like appendages, whereas afimbrial adhesins are short monomeric or oligomeric structures. In order to interact specifically with receptors on host tissues, adhesins must be presented on the bacterial surface. Gram-negative bacteria have developed a small number of secretion systems by which proteins can cross their outer membrane and be presented on the surface [23]. Type

V secretion systems are the simplest of these pathways. They are characterized by a mechanism where a polypeptide is secreted by a single specific translocator protein located in the outer membrane. When these two polypeptides are produced independently, they constitute a Two Partner Secretion system (TPS). But when the two polypeptides are fused into one protein, it is called an autotransporter [12].

The autotransporter family of proteins contains more than 700 members that have a variety of functions such as proteolysis, cytotoxicity, serum resistance, cell-to-cell spread, invasion and adhesion [23]. This review will focus on the autotransporters that have been shown to have adhesive properties (Table 1). We will discuss our current understanding of the biogenesis, function and structure of these autotransporters. We will most notably highlight the facts that these adhesins are often multifunctional proteins and that they share striking structural similarities such as the presence of repetitive structural features with three-fold symmetry.

## **2. Modular organization and biogenesis of autotransporters**

Autotransporters are usually large proteins. The *Haemophilus influenzae* adhesin Hsf, for instance, contains 2,414 amino acids [56]. It is therefore not surprising that autotransporters have a modular organization, typically comprising an N-terminal signal peptide, an internal passenger domain harboring the functions of the protein, and a C-terminal translocation unit (Fig. 1A). Biogenesis of autotransporters occurs through multiple steps [12]. The first step of secretion is the crossing of the inner membrane, via the *sec* inner membrane secretion system (Fig. 1B). The second step of the secretion is the insertion of the translocation unit in the outer membrane. And lastly, in a third step, the passenger domain is thought to be translocated via the translocation unit across the outer membrane.

There are actually two variations on this theme: In some cases, the translocation unit consists of approximately 300 amino acids predicted to form a 12-stranded  $\beta$  barrel, preceded by an  $\alpha$  helix and the passenger domain (Fig 1A). These autotransporters are called the “conventional” autotransporters. Recent work suggests that the translocation unit of some conventional autotransporters can oligomerize in the outer membrane, resulting in

the formation of rings with large central cavities [62]. This does not appear to be a general feature, however, since the translocation units of some other conventional autotransporters have been shown to remain monomeric [38, 55].

In other cases, the translocation unit is much shorter and is predicted to encompass only four  $\beta$  strands, immediately preceded by the passenger domain. These autotransporters have been shown to form homotrimers. Thus, the functional translocator is a 12-stranded  $\beta$  barrel, each monomer contributing four  $\beta$  strands to the common  $\beta$  barrel [9]. The passenger domains also fold as trimers and therefore this distinct subfamily of autotransporters have been called “trimeric” autotransporters [9]. Strikingly, all of the trimeric autotransporters functionally characterized to date have been shown to be adhesins [9].

The last observable feature of autotransporters is a region situated in conventional autotransporters at the C-terminal end of the passenger domain. This region is necessary for the efficient translocation and/or folding of the passenger domain [41]. It has been suggested that it could act as an intramolecular chaperone mediating folding of the passenger, during or following translocation. This region has therefore been called “autochaperone”. Trimeric autotransporters lack this autochaperone region. It is thought that the region would not be needed in the latter case, because trimerization of passenger domains could efficiently trigger folding [9].

The exact mechanism of translocation of the passenger domain is still poorly understood. Various models have been proposed: one suggests that passenger domains are threaded as unfolded polypeptides through the  $\beta$ -barrel of the translocation unit [27]; another hypothesizes that polypeptides could be translocated at least partially folded through the central cavity formed by oligomers of translocation units [61, 62]. The crystal structure of the translocation unit of the *Neisseria meningitidis* autotransporter NalP has been recently solved [42] (Fig. 2). The structure reveals a monomer with 12 antiparallel  $\beta$  strands forming a barrel, and an  $\alpha$  helix spanning its lumen. Although this confirmed the structural predictions, it was not completely consistent with any of the previous observations pertaining to the translocation mechanism. The authors therefore proposed a third model, in which translocation of the passenger domain would require a separate machinery at the outer membrane [42].

### 3. Additional events in the biogenesis of autotransporters

#### 3.a. Proteolytic processing

Once on the bacterial surface, many conventional autotransporters with adhesive activities undergo a cleavage event that separates the passenger domain from the translocation unit. This is the case, for instance, with the *H. influenzae* adhesion and penetration protein (Hap) [18] or the *Escherichia coli* adhesin involved in diffuse adherence (AIDA) [57]. This cleavage is often autoproteolytic and the passenger domain remains either non-covalently associated with the cell surface, which is the case for AIDA, or it can be released into the extracellular milieu, which is the case for Hap. The proteolytic processing can include more than one cleavage event: Hap for instance has two main cleavage sites, and if cleavage at those sites is prevented, four alternative sites can be cleaved [18].

Secondary proteins in the outer membrane may participate in the proteolytic processing of autotransporters. The processing of the *N. meningitidis* adhesin App, for instance, has been shown to be influenced by the expression of NalP, an autotransporter with serine protease activity [60]. The outer membrane protease OmpT might also contribute to alternative or secondary proteolytic processing events [57]. Additionally, as described below, the proteolytic processing might be influenced by the extracellular milieu. In stark contrast, all trimeric autotransporters characterized to this day have been shown to remain uncleaved at the bacterial surface [9].

Given their function as adhesins, the cleavage of some conventional autotransporters from the bacterial surface and their release in the milieu seem at first counterintuitive. It could, however, have several regulatory functions.

- Proteolysis could serve to tightly regulate adhesive activity. For instance, at low level of expression, the adhesin Hap is not processing itself, probably because of low concentration in the membrane under physiological conditions [18, 19]. At higher concentrations of Hap, cleavage starts to occur, thus maintaining the concentration of uncleaved Hap below a

precise threshold. Keeping a low level of adhesion might be necessary to prevent non-specific adhesion to irrelevant surfaces or tissues.

- The control of the proteolysis by the external milieu might also help achieve optimal adhesion at the right moment and the right place and switch between different kinds of adhesion. Illustrating this concept, the proteolytic processing of the adhesin Hap is inhibited by physiological concentrations of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), a component of respiratory secretions that is up-regulated during inflammation [24]. During early stages of infection, where inflammation occurs, autoproteolysis can be inhibited by SLPI, thereby promoting increased bacterial adherence and colonization at the site of infection. Then, when colonization has occurred, decrease in local SLPI concentrations may favor autoproteolysis, allowing the bacteria to separate from epithelial cells and spread to other sites of infection.

- As discussed below, many autotransporter adhesins are multifunctional proteins and their release might increase their alternative functions. Release of Hap for instance, which has a proteolytic activity, may allow cleavage of target host proteins, facilitating subsequent steps of the disease [24]. Since the functional characterizations of many autotransporters is still partial, it is possible that in some cases the putative adhesive properties assigned to an autotransporter are only of secondary importance compared to others activities, the latter being more consistent with secretion from the cell surface.

- Proteolysis and release might prevent immune recognition, with the free adhesin binding circulating antibodies before its surface-associated counterpart can be engaged.

It should be noted that in the case where the cleaved passenger domain remains associated with the membrane, the cleavage does not seem to have any functional purpose and could for instance represent a maturation process required for proper folding.

### *3.b. Modification of the passenger domain*

Some autotransporter adhesins have their passenger domains glycosylated. To date, the *E. coli* adhesins AIDA and TibA are the only known examples [5, 33]. Glycosylation is mediated in both cases by closely related specific cytosolic heptosyltransferases that are encoded immediately upstream of the autotransporter genes [37]. AIDA, for instance, is

modified by the autotransporter adhesin heptosyltransferase with, on average, 19 heptose residues. The modification by heptose residues is highly unusual and little is known about the mechanism of glycosylation, except that the sugar substrates are recruited from a pool of precursors involved in the lipopolysaccharide biosynthetic pathway. However, the positions at which glycosylation occurs remains to be confirmed.

The exact role of the glycosylation of these autotransporters is still unclear. Glycosylation of bacterial proteins has been increasingly recognized in recent years [51]. In *Campylobacter* and *Neisseria*, for instance, 'glycosylation islands' consisting of multiple genes have been identified and are involved in the glycosylation of flagellar constituents. Adhesins of *Haemophilus* and adhesive pili of *Neisseria* have also been found to be glycosylated. Several functions have been assigned to glycosylation, including maintenance of protein conformation, filament assembly, cell adhesion, and avoidance of the immune response by recruiting blocking antibodies or modulating glycosylation through polymorphisms or phase variation. Glycosylation was for instance shown to be required for the stability and the tethering to the bacterial surface of the *H. influenzae* adhesin HMW1, an adhesin secreted by the autotransporter-related TPS pathway [21]. Thus glycosylation could modulate the adhesion conferred by HMW1. Similarly, the glycosylation of AIDA was shown to be essential for adhesion, since deletion of the gene coding for the heptosyltransferase abolishes the adhesion to epithelial cells [5]. Glycosylation, however, was shown to be dispensable for autoaggregation and biofilm formation, also mediated by these proteins, as discussed below [53].

Lipid modification is a modification sometimes found in some autotransporters like *Bordetella pertussis* SphB1 or NalP [11, 60]. Even though these autotransporters are not adhesins *per se*, they are both involved in the processing of autotransporter or TPS adhesins. Furthermore, one autotransporter adhesin of *Helicobacter pylori*, AlpA, was also shown to be modified by lipids [40]. The lipid modification is not found in the mature protein, however, and it is therefore believed to be necessary for an intermediate step in the biogenesis of the protein. The same conclusion was reached concerning the lipid modification of NalP [60].

## 4. Functional features of autotransporter adhesins

### 4.a. Many autotransporter adhesins are multifunctional proteins

As can be seen in Table 1, many autotransporter adhesins are multifunctional proteins. Some harbor proteolytic activities. In most cases, this activity has been shown to be involved in autocatalytic processing, as discussed above. In the case of the *E. coli* temperature sensitive hemagglutinin, however, the autotransporter was shown to function as a hemoglobin protease and renamed heme binding protein (Hbp) [43]. Many autotransporter adhesins also mediate bacterial autoaggregation and biofilm formation. In other instances, the adhesins also confer an invasive phenotype, or can bind host serum proteins, which mediate resistance to serum bactericidal activity and/or resistance to phagocytosis. Lastly, the McaP adhesin of *Moraxella catarrhalis* was shown to mediate adherence to epithelial cells and to possess both esterase and phospholipase activities [58].

In most instances, these diverse functions have been pinpointed to different or overlapping regions of the protein: In the *Yersinia enterocolitica* trimeric autotransporter adhesin YadA, for instance, the deletion of aminoacids 29 to 81 prevented adhesion to neutrophils but did not affect collagen binding, the latter was impaired by point mutations at positions 156 and 159 and abrogated by deletion of aminoacids 83 to 104 [46, 47]. As other examples, the autoaggregation and biofilm formation domains seem to be separate in Ag43 [28], and the adhesive and proteolytic regions of Hap are clearly separable [17].

### 4.b. Adhesion

There are very few cellular receptors that have been identified for autotransporter adhesins (Table 1). The only characterized examples are the *H. pylori* adhesins BabA and SabA that bind to human Lewis blood group antigens expressed on gastric epithelial cells [25, 34]. As shown in Table 1, for the majority of adhesive autotransporters where this is known, receptors of the adhesins have been found to correspond to one or more extracellular matrix proteins such as collagen, fibronectin, or vitronectin.



The binding domains responsible for adhesion have not been precisely defined in most cases. Some passenger domains bear motifs that are known to be involved in adhesion. This is the case, for instance, of passenger domains with the Arg-Gly-Asp (RGD) sequence, which is associated with adhesion to mammalian cells via binding of  $\beta$  integrins. This sequence was indeed shown to play a role in adhesion of the *B. pertussis* autotransporter adhesin pertactin (Prn) to cultured epithelial cells [32], and it is harbored by other autotransporter adhesins like *E. coli* Ag43 or *B. pertussis* BrkA [23]. It should be noted, however, that the role of the RGD sequence is somewhat controversial. Indeed, this motif is common to many autotransporters that have not been shown to be involved in adhesion [23].

Several adhesive autotransporters contain repeated amino acid sequences which could represent binding sites. Proline rich regions (PRR), for instance, often occur in proteins with adhesive properties, and they have been suggested to restrict backbone flexibility and promote fast-acting weak binding [64]. PRR are found in some autotransporter adhesins: The *N. meningitidis* adhesin App bears 6 repeats of the sequence Pro-Gln [52], Prn has 5 repeats of the sequence Pro-Gln-Pro [14], and TibA has 8 repeats of a short motif Pro-Asp-Ala-Gly-Asn [33]. There are other kinds of repeated sequences. In the adhesins Ag43, AIDA and TibA, for instance, related sequences of 19 residues containing 4 to 5 glycines are found imperfectly directly repeated twenty to thirty times [4, 28, 33]. Repeats of longer sequences are also found. The *Rickettsia* protein rOMPA, for instance, has 12 imperfect repeats of 70 to 75 aminoacids [2] and the *Salmonella enterica* adhesin ShdA has 9 copies of a 63 aminoacids imperfect repeat and 3 copies of an imperfect 102 aminoacid repeat [26]. In the trimeric autotransporters, repeats are also found in the binding domains and in regions linking them to the membrane-embedded  $\beta$  strands [39]. For instance, YadA has 8 repeats of the sequence Ser-Val-Ala-Ile-Gly-X-X-Ser [39]. The repetition of identical binding sites could give the ability to engage simultaneously several copies of receptors, or several identical binding sites on a receptor molecule, resulting in an increased affinity. This is especially true for the binding pockets of trimeric autotransporters that, for reasons of symmetry, are believed to have three identical binding sites [9]. This assumption has recently been confirmed by solved structures, as detailed below.

Many trimeric autotransporter adhesins additionally seem to have multiple binding pockets. For example, the trimeric autotransporter adhesins Hia and Hsf possess two and three binding domains, respectively [10, 30]. These domains recognize the same receptor but with different affinities. In Hia, a binding domain located near the C-terminal has a higher affinity whereas a lower-affinity region is located near the N terminus of the passenger domain. A similar situation exists for Hsf. This raises the possibility that Hia and Hsf mediate adherence via a two step process that exploit the differences in binding affinities [10]: The lower-affinity domain may be responsible for the initial contact with the host cell. It might then be displaced by the higher-affinity domain, resulting in a movement that pulls bacteria closer to the surface of the target cell. Alternatively, it is possible that the two domains are involved in a bivalent interaction, thus reinforcing the multivalent interaction already thought to occur in trimeric autotransporters.

Lastly, it was noted that in some instances the adhesion mediated by autotransporter adhesins is incompatible with the presence of a capsule [49]. In those cases, the capsule is presumed to physically shield the adhesin. It should be noted, however, that some autotransporter adhesins like App, a conventional autotransporter adhesin of *N. meningitidis*, or Hsf, a trimeric autotransporter adhesin of *H. influenzae*, are functional in the presence of a capsule [52, 56]. Of note, Hsf is homologous to the adhesin Hia which is found in non-capsulated strains of *H. influenzae* and would presumably be shielded by a capsule. But Hsf is much longer than its homolog, with 2,414 versus 1,098 aminoacids. Most of the difference lies in the region spacing the binding pockets, presumably allowing Hsf to extend beyond the capsule [10].

#### *4.c. Autoaggregation and biofilm formation*

As indicated above, many autotransporter adhesins play a role in autoaggregation and biofilm formation. Hap, Ag43, AIDA and TibA are some of the best characterized examples [24, 28, 53, 54]. In those cases, the observed bacterial aggregation is due to intercellular interaction between two passenger domains on neighboring bacterial cells and not between a passenger domain and another surface component. Strikingly, AIDA and

Ag43 expressing cells were found to interact and aggregate with one another, suggesting a mechanism by which Ag43 and AIDA could engage each other [53]. This is a surprising phenomenon implying either a close structural resemblance between the proteins or that the association required for autoaggregation is based on rather loose structural constraints.

As noted above with adhesion, the autoaggregation interaction is blocked by fimbriae or capsule expression, probably because of physical shielding [22, 49, 53, 54]. It is interesting to note in this regard that in *E. coli* the expressions of Ag43 is controlled by phase variation, which also controls the expression of type 1 fimbriae and capsule. This and other complex cross-talk regulation mechanisms provide a mean for the coordinated mutual exclusion of incompatible structures [50].

## 5. Structural features of the passenger domains

The structural features of the passenger domains of some autotransporters have recently been revealed and provide explanations to some of the functional observations described previously. The structures of the whole passenger domains of two conventional autotransporters, Hbp [43] and Prn [14], have been solved. And for trimeric autotransporters, the structures of binding domains of the Hia [65] and YadA [39] adhesins have also been determined.

The most striking feature of the structures of conventional autotransporter passenger domains is the existence of a right handed  $\beta$  helix that acts as a backbone for the molecule (Fig. 2). This structure is assembled by repeats of three  $\beta$  strands, representing one helix turn, the repeats of which form 3 parallel  $\beta$  sheets. Thus the  $\beta$  helix has a triangular cross section. Hbp has 24 turns whereas Prn has 16 turns. The  $\beta$  helix structure is probably very significant. Indeed, as detailed below, parts of the solved structure of binding domains of trimeric autotransporters also show a  $\beta$  helix-like structure. Additionally, the structure of a domain from the filamentous hemagglutinin of *B. pertussis*, a protein secreted by the autotransporter-related TPS pathway, is mainly a  $\beta$  helix [6]. Lastly, sequence analysis and circular dichroism measurements of purified passenger domains of autotransporters often report a high  $\beta$  strands content [28]. Because of the similarity in the secretion mechanism of all these proteins, it is tempting to speculate that the  $\beta$  helix structure is particularly well

suiting for the structural constraints of this type of secretion. Alternatively, the  $\beta$  helix structure might provide an ideally long and rigid backbone necessary to extend and present functional domains away from the bacterial surface.

The structures of Hbp and Prn show part of the autochaperone region. In both cases the structure appears highly flexible and more disordered, with several breaks in the electron density map. This flexibility is consistent with a role in secretion but does not provide an explanation as to how this domain might assist in the folding of the passenger domain.

Despite the repetitive nature of the structure of the  $\beta$  helix, it does not always match the repetitive sequences found in some autotransporters. In Prn, the 5 repeats of the Gly-Gly-X-X-Pro sequence are not found in the turns but rather in a loop departing from the  $\beta$  helix immediately after the RGD sequence. The presence of the PRR repeat in an extended loop, however, is consistent with a putative role in adhesion, as discussed above. Hbp does not have obvious repetitive sequences and there are no “stacks” of identical residues packed in the layers of the  $\beta$  helix, except for a notable row of asparagine residues on the surface of the helix.

As stated above, many autotransporter adhesins are multifunctional proteins. Hbp is a heme protease as well as an adhesin. The domain responsible for the proteolytic activity is clearly separable, emphasizing the modular organization of the protein. It bears high similarity with bovine trypsin, an archetypal serine protease. Another separable short domain extends from the  $\beta$  helix and is a good candidate for the location of the extracellular matrix proteins binding site. Similarly, as described above, the cell binding sequence of Prn is found in a loop departing from the central  $\beta$  helix. Thus, the  $\beta$  helix backbone does not seem to contribute directly to adhesion or other functions.

Contrary to what has been observed for conventional autotransporters, the crystal structures of the binding domains of Hia and YadA reveal extensively intertwined trimers with no protruding domains or loops (Fig.3). As stated above, it is interesting to note that a triangular cross-section is present in some parts of these structures. In Hia, a four stranded antiparallel  $\beta$  sheet in each monomer interact with the corresponding sheets of the neighboring subunits to make a triangle. In YadA, each monomer has 8 repeats of a structural motif consisting of a turn, a 3 residues inner  $\beta$  strand, a turn, and a 3 residues

outer  $\beta$  strand. The resulting coil interacts with the coils of the neighboring subunits, again forming a triangle. In this case, the structural repeats correspond to sequence repeats.

Based on mutational analyses, the binding surfaces of the trimeric autotransporters binding domains have been identified. In YadA, the coil consisting of the repeats is forming one surface onto which one molecule of collagen can dock. In Hia, the binding site was found to be formed by an acidic surface outside of the triangular  $\beta$  sheets. In the case of trimeric autotransporters and contrary to what is seen for the conventional autotransporters, the functional regions are not found in protruding domains but rather on the backbone of the molecule itself, the symmetry of which results in the presence of three identical receptor-binding pockets and a potential multivalent interaction with the host-cell surface, as discussed above.

## 6. Concluding remarks

Autotransporters are a remarkable group of Gram-negative bacterial proteins. They are characterized not only by their outer membrane insertion mechanism, but also by their involvement in the virulence of pathogenic species. Some of these proteins play a role in adhesion, a key step in many infectious processes. Autotransporter adhesins are characteristically large proteins, modular by nature and often exerting multiple functions. This is especially true for conventional autotransporter adhesins. This size and versatility might explain why these proteins often play key roles in pathogenesis. Furthermore, autotransporters adhesins often harbor repetitive sequence and/or adopt repetitive structures. This is especially true for trimeric autotransporters. These repeats might constitute several near-identical binding sites, which could result in an increased avidity towards surfaces displaying multiple copies of a receptor.

More and more autotransporter adhesins are being identified and we now appreciate more fully their mechanism of action and their importance. They represent good therapeutic targets and vaccine candidates, emphasizing the need to study them in greater details. Indeed, many questions remain, and several striking features of these proteins are still mysterious. The biogenesis of autotransporters is still poorly understood for instance. More specifically, the translocation mechanism across the outer membrane is the subject of hot

debate. The significance of the  $\beta$  helix structure observed in the two only known structures of the passenger domains of conventional autotransporters is unclear. But its apparent conservation in parts of trimeric autotransporters and TPS-secreted proteins is striking and suggests an important role for this structure. It is also noteworthy that many autotransporters are involved in autoaggregation and biofilm formation; especially since this appears to be enigmatically mediated by a loosely specific interaction. Lastly, it is surprising that some autotransporter adhesins are proteolytically processed. A putative regulatory role of this cleavage was elegantly detailed for the *H. influenzae* Hap adhesin, but the situation is less clear for other autotransporter adhesins.

**Acknowledgments:**

Work in our laboratory is supported by the Canadian research chair program, the Canadian Foundation for Innovation (project 201414), and the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (discovery grant 262746).

**References:**

- [1] C. Aebi, E. R. Lafontaine, L. D. Cope, J. L. Latimer, S. L. Lumbley, G. H. McCracken, Jr., E. J. Hansen, Phenotypic effect of isogenic *uspA1* and *uspA2* mutations on *Moraxella catarrhalis* 035E, *Infect Immun* 66 (1998) 3113-3119
- [2] B. E. Anderson, G. A. McDonald, D. C. Jones, R. L. Regnery, A protective protein antigen of *Rickettsia rickettsii* has tandemly repeated, near-identical sequences, *Infect Immun* 58 (1990) 2760-2769
- [3] R. Asakawa, H. Komatsuzawa, T. Kawai, S. Yamada, R. B. Goncalves, S. Izumi, T. Fujiwara, Y. Nakano, N. Suzuki, Y. Uchida, K. Ouhara, H. Shiba, M. A. Taubman, H. Kurihara, M. Sugai, Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Mol Microbiol* 50 (2003) 1125-1139
- [4] I. Benz, M. A. Schmidt, AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule, *Mol Microbiol* 6 (1992) 1539-1546
- [5] I. Benz, M. A. Schmidt, Glycosylation with heptose residues mediated by the *aah* gene product is essential for adherence of the AIDA-I adhesin, *Mol Microbiol* 40 (2001) 1403-1413
- [6] B. Clantin, H. Hodak, E. Willery, C. Loch, F. Jacob-Dubuisson, V. Villeret, 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 (2004) 6194-6199
- [7] L. E. Cole, T. H. Kawula, K. L. Toffer, C. Elkins, The *Haemophilus ducreyi* serum resistance antigen DsrA confers attachment to human keratinocytes, *Infect Immun* 70 (2002) 6158-6165
- [8] M. Comanducci, S. Bambini, B. Brunelli, J. Adu-Bobie, B. Arico, B. Capecchi, M. M. Giuliani, V. Massignani, L. Santini, S. Savino, D. M. Granoff, D. A. Caugant, M. Pizza, R. Rappuoli, M. Mora, NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*, *J Exp Med* 195 (2002) 1445-1454
- [9] S. E. Cotter, N. K. Surana, J. W. St Geme, 3rd, Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins, *Trends Microbiol* 13 (2005) 199-205

- [10] S. E. Cotter, H. J. Yeo, T. Juehne, J. W. St Geme, 3rd, Architecture and adhesive activity of the *Haemophilus influenzae* Hsf adhesin, *J Bacteriol* 187 (2005) 4656-4664
- [11] L. Coutte, E. Willery, R. Antoine, H. Drobecq, C. Locht, F. Jacob-Dubuisson, Surface anchoring of bacterial subtilisin important for maturation function, *Mol Microbiol* 49 (2003) 529-539
- [12] M. Desvaux, N. J. Parham, I. R. Henderson, The autotransporter secretion system, *Res Microbiol* 155 (2004) 53-60
- [13] C. W. Dorsey, M. C. Laarakker, A. D. Humphries, E. H. Weening, A. J. Baumler, *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin, *Mol Microbiol* 57 (2005) 196-211
- [14] P. Emsley, I. G. Charles, N. F. Fairweather, N. W. Isaacs, Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin, *Nature* 381 (1996) 90-92
- [15] R. C. Fernandez, A. A. Weiss, Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus, *Infect Immun* 62 (1994) 4727-4738
- [16] D. H. Fine, K. Velliyagounder, D. Furgang, J. B. Kaplan, The *Actinobacillus actinomycetemcomitans* autotransporter adhesin Aae exhibits specificity for buccal epithelial cells from humans and old world primates, *Infect Immun* 73 (2005) 1947-1953
- [17] D. L. Fink, A. Z. Buscher, B. Green, P. Fernsten, J. W. St Geme, 3rd, The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter mediates microcolony formation and adherence to epithelial cells and extracellular matrix via binding regions in the C-terminal end of the passenger domain, *Cell Microbiol* 5 (2003) 175-186
- [18] D. L. Fink, L. D. Cope, E. J. Hansen, J. W. Geme, 3rd, The *Hemophilus influenzae* Hap autotransporter is a chymotrypsin clan serine protease and undergoes autoproteolysis via an intermolecular mechanism, *J Biol Chem* 276 (2001) 39492-39500
- [19] D. L. Fink, J. W. St Geme, 3rd, Chromosomal expression of the *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter allows fine-tuned regulation of adhesive potential via inhibition of intermolecular autoproteolysis, *J Bacteriol* 185 (2003) 1608-1615



- [20] T. M. Finn, L. A. Stevens, Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant, *Mol Microbiol* 16 (1995) 625-634
- [21] S. Grass, A. Z. Buscher, W. E. Swords, M. A. Apicella, S. J. Barenkamp, N. Ozchlewski, J. W. St Geme, 3rd, The *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin is glycosylated in a process that requires HMW1C and phosphoglucomutase, an enzyme involved in lipooligosaccharide biosynthesis, *Mol Microbiol* 48 (2003) 737-751
- [22] H. Hasman, T. Chakraborty, P. Klemm, Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation, *J Bacteriol* 181 (1999) 4834-4841
- [23] I. R. Henderson, F. Navarro-Garcia, M. Desvaux, R. C. Fernandez, D. Ala'Aldeen, Type V protein secretion pathway: the autotransporter story, *Microbiol Mol Biol Rev* 68 (2004) 692-744
- [24] D. R. Hendrixson, J. W. St Geme, 3rd, The *Haemophilus influenzae* Hap serine protease promotes adherence and microcolony formation, potentiated by a soluble host protein, *Mol Cell* 2 (1998) 841-850
- [25] D. Ilver, A. Arnqvist, J. Ogren, I. M. Frick, D. Kersulyte, E. T. Incecik, D. E. Berg, A. Covacci, L. Engstrand, T. Boren, *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging, *Science* 279 (1998) 373-377
- [26] R. A. Kingsley, D. Abi Ghanem, N. Puebla-Osorio, A. M. Keestra, L. Berghman, A. J. Baumber, Fibronectin binding to the *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA autotransporter protein is inhibited by a monoclonal antibody recognizing the A3 repeat, *J Bacteriol* 186 (2004) 4931-4939
- [27] T. Klauser, J. Pohlner, T. F. Meyer, Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of *Neisseria* Iga beta-mediated outer membrane transport, *Embo J* 11 (1992) 2327-2335
- [28] P. Klemm, L. Hjerrild, M. Gjermansen, M. A. Schembri, Structure-function analysis of the self-recognizing Antigen 43 autotransporter protein from *Escherichia coli*, *Mol Microbiol* 51 (2004) 283-296
- [29] M. Kostakioti, C. Stathopoulos, Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain, *Infect Immun* 72 (2004) 5548-5554

- [30] S. Laarmann, D. Cutter, T. Juehne, S. J. Barenkamp, J. W. St Geme, The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter harbours two adhesive pockets that reside in the passenger domain and recognize the same host cell receptor, *Mol Microbiol* 46 (2002) 731-743
- [31] E. R. Lafontaine, L. D. Cope, C. Aebi, J. L. Latimer, G. H. McCracken, Jr., E. J. Hansen, The UspA1 protein and a second type of UspA2 protein mediate adherence of *Moraxella catarrhalis* to human epithelial cells *in vitro*, *J Bacteriol* 182 (2000) 1364-1373
- [32] E. Leininger, M. Roberts, J. G. Kenimer, I. G. Charles, N. Fairweather, P. Novotny, M. J. Brennan, Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 345-349
- [33] C. Lindenthal, E. A. Elsinghorst, Identification of a glycoprotein produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Infect Immun* 67 (1999) 4084-4091
- [34] J. Mahdavi, B. Sonden, M. Hurtig, F. O. Olfat, L. Forsberg, N. Roche, J. Angstrom, T. Larsson, S. Teneberg, K. A. Karlsson, S. Altraja, T. Wadstrom, D. Kersulyte, D. E. Berg, A. Dubois, C. Petersson, K. E. Magnusson, T. Norberg, F. Lindh, B. B. Lundskog, A. Arnqvist, L. Hammarstrom, T. Boren, *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation, *Science* 297 (2002) 573-578
- [35] J. C. McMichael, M. J. Fiske, R. A. Fredenburg, D. N. Chakravarti, K. R. VanDerMeid, V. Barniak, J. Caplan, E. Bortell, S. Baker, R. Arumugham, D. Chen, Isolation and characterization of two proteins from *Moraxella catarrhalis* that bear a common epitope, *Infect Immun* 66 (1998) 4374-4381
- [36] K. P. Mintz, Identification of an extracellular matrix protein adhesin, EmaA, which mediates the adhesion of *Actinobacillus actinomycescomitans* to collagen, *Microbiology* 150 (2004) 2677-2688
- [37] C. Moormann, I. Benz, M. A. Schmidt, Functional substitution of the TibC protein of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains for the autotransporter adhesin heptosyltransferase of the AIDA system, *Infect Immun* 70 (2002) 2264-2270

- [38] D. Muller, I. Benz, D. Tapadar, C. Buddenborg, L. Greune, M. A. Schmidt, Arrangement of the translocator of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence on the bacterial surface, *Infect Immun* 73 (2005) 3851-3859
- [39] H. Nummelin, M. C. Merckel, J. C. Leo, H. Lankinen, M. Skurnik, A. Goldman, The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll, *Embo J* 23 (2004) 701-711
- [40] S. Odenbreit, M. Till, D. Hofreuter, G. Faller, R. Haas, Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue, *Mol Microbiol* 31 (1999) 1537-1548
- [41] D. C. Oliver, G. Huang, E. Nodel, S. Pleasance, R. C. Fernandez, A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain, *Mol Microbiol* 47 (2003) 1367-1383
- [42] C. J. Oomen, P. Van Ulsen, P. Van Gelder, M. Feijen, J. Tommassen, P. Gros, Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter, *Embo J* 23 (2004) 1257-1266
- [43] B. R. Otto, R. Sijbrandi, J. Luirink, B. Oudega, J. G. Heddle, K. Mizutani, S. Y. Park, J. R. Tame, Crystal Structure of Hemoglobin Protease, a Heme Binding Autotransporter Protein from Pathogenic *Escherichia coli*, *J Biol Chem* 280 (2005) 17339-17345
- [44] M. M. Pearson, E. R. Lafontaine, N. J. Wagner, J. W. St Geme, 3rd, E. J. Hansen, A hag mutant of *Moraxella catarrhalis* strain O35E is deficient in hemagglutination, autoagglutination, and immunoglobulin D-binding activities, *Infect Immun* 70 (2002) 4523-4533
- [45] T. Riess, S. G. Andersson, A. Lupas, M. Schaller, A. Schafer, P. Kyme, J. Martin, J. H. Walzlein, U. Ehehalt, H. Lindroos, M. Schirle, A. Nordheim, I. B. Autenrieth, V. A. Kempf, *Bartonella* adhesin a mediates a proangiogenic host cell response, *J Exp Med* 200 (2004) 1267-1278
- [46] A. Roggenkamp, N. Ackermann, C. A. Jacobi, K. Truelzsch, H. Hoffmann, J. Heesemann, Molecular Analysis of Transport and Oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* Adhesin YadA, *J Bacteriol* 185 (2003) 3735-3744

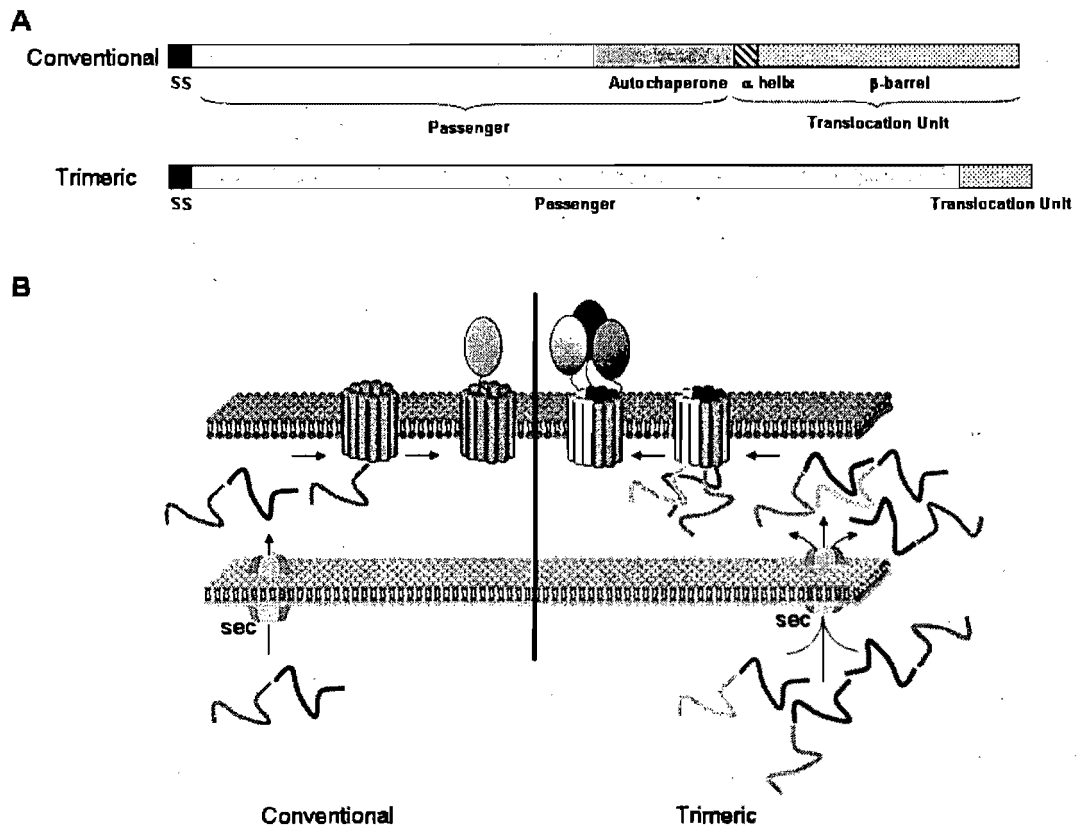
- [47] A. Roggenkamp, H. R. Neuberger, A. Flugel, T. Schmoll, J. Heesemann, Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence, *Mol Microbiol* 16 (1995) 1207-1219
- [48] A. Roux, C. Beloin, J. M. Ghigo, Combined Inactivation and Expression Strategy To Study Gene Function under Physiological Conditions: Application to Identification of New *Escherichia coli* Adhesins, *J Bacteriol* 187 (2005) 1001-1013
- [49] M. A. Schembri, D. Dalsgaard, P. Klemm, Capsule shields the function of short bacterial adhesins, *J Bacteriol* 186 (2004) 1249-1257
- [50] M. A. Schembri, P. Klemm, Coordinate gene regulation by fimbriae-induced signal transduction, *Embo J* 20 (2001) 3074-3081
- [51] M. A. Schmidt, L. W. Riley, I. Benz, Sweet new world: glycoproteins in bacterial pathogens, *Trends Microbiol* 11 (2003) 554-561
- [52] D. Serruto, J. Adu-Bobie, M. Scarselli, D. Veggi, M. Pizza, R. Rappuoli, B. Arico, *Neisseria meningitidis* App, a new adhesin with autocatalytic serine protease activity, *Mol Microbiol* 48 (2003) 323-334
- [53] O. Sherlock, M. A. Schembri, A. Reisner, P. Klemm, Novel Roles for the AIDA Adhesin from Diarrheagenic *Escherichia coli*: Cell Aggregation and Biofilm Formation, *J Bacteriol* 186 (2004) 8058-8065
- [54] O. Sherlock, R. M. Vejborg, P. Klemm, The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation, *Infect Immun* 73 (2005) 1954-1963
- [55] K. M. Skillman, T. J. Barnard, J. H. Peterson, R. Ghirlando, H. D. Bernstein, Efficient secretion of a folded protein domain by a monomeric bacterial autotransporter, *Mol Microbiol* 58 (2005) 945-958.
- [56] J. W. St Geme, 3rd, D. Cutter, S. J. Barenkamp, Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils, *J Bacteriol* 178 (1996) 6281-6287
- [57] M. Suhr, I. Benz, M. A. Schmidt, Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDA<sub>c</sub> and evidence for the outer membrane anchoring as a beta-barrel structure, *Mol Microbiol* 22 (1996) 31-42

- [58] J. M. Timpe, M. M. Holm, S. L. Vanlerberg, V. Basrur, E. R. Lafontaine, Identification of a *Moraxella catarrhalis* outer membrane protein exhibiting both adhesin and lipolytic activities, *Infect Immun* 71 (2003) 4341-4350
- [59] T. Uchiyama, Adherence to and invasion of Vero cells by recombinant *Escherichia coli* expressing the outer membrane protein rOmpB of *Rickettsia japonica*, *Ann N Y Acad Sci* 990 (2003) 585-590
- [60] P. van Ulsen, L. van Alphen, J. ten Hove, F. Fransen, P. van der Ley, J. Tommassen, A Neisserial autotransporter NalP modulating the processing of other autotransporters, *Mol Microbiol* 50 (2003) 1017-1030
- [61] E. Veiga, V. de Lorenzo, L. A. Fernandez, Structural tolerance of bacterial autotransporters for folded passenger protein domains, *Mol Microbiol* 52 (2004) 1069-1080
- [62] E. Veiga, E. Sugawara, H. Nikaido, V. de Lorenzo, L. A. Fernandez, Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains, *Embo J* 21 (2002) 2122-2131
- [63] W. Wehrl, V. Brinkmann, P. R. Jungblut, T. F. Meyer, A. J. Szczeppek, From the inside out - processing of the Chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells, *Mol Microbiol* 51 (2004) 319-334
- [64] M. P. Williamson, The structure and function of proline-rich regions in proteins, *Biochem J* 297 ( Pt 2) (1994) 249-260
- [65] H. J. Yeo, S. E. Cotter, S. Laarmann, T. Juehne, J. W. St Geme, G. Waksman, Structural basis for host recognition by the *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter, *Embo J* 23 (2004) 1245-1256
- [66] P. Zhang, B. B. Chomel, M. K. Schau, J. S. Goo, S. Droz, K. L. Kelminson, S. S. George, N. W. Lerche, J. E. Koehler, A family of variably expressed outer-membrane proteins (Vomp) mediates adhesion and autoaggregation in *Bartonella quintana*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 13630-13635

Organism	Autotransporter <sup>a</sup>	Type <sup>b</sup>	Other known functions	Substrates <sup>c</sup>	Ref. <sup>d</sup>
<i>Actinobacillus actinomycetecomitans</i>	EmaA	T		Col	[36]
	Omp100	T	Serum resistance, Invasion		[3]
	Aae	C			[16]
<i>Bartonella henselae</i>	BadA	T	Phagocytosis resistance	Col, FN, L	[45]
<i>Bartonella quintana</i>	Vomps	T	Autoaggregation	Col	[66]
<i>Bordetella pertussis</i>	Perctactin	C			[32]
	TcfA	C			[20]
	BrkA	C	Serum resistance, Invasion		[15]
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Pmp21/PmpD	C			[63]
<i>Escherichia coli</i>	AIDA	C	Autoprotease, Autoaggregation, Biofilm		[4]
	Ag43	C	Autoprotease, Autoaggregation, Biofilm		[28]
	TibA	C	Autoaggregation, Invasion, Biofilm		[33]
	Tsh/Hbp	C	Hemoglobin protease	Col, FN	[29]
	yfaL	C	Biofilm		[48]
	ypjA	C	Biofilm		[48]
	ycgV	C	Biofilm		[48]
<i>Haemophilus ducreyi</i>	DrsA	T			[7]
<i>Haemophilus influenzae</i>	Hap	C	Autoprotease, Autoaggregation, Invasion	FN, L, Col	[17]
	Hia	T			[30]
	Hsf	T			[56]
<i>Helicobacter pylori</i>	BabA	C		LewisB Ag	[25]
	SabA	C		Sialyl-LewisX Ag	[34]
	AlpA	C			[40]
<i>Moraxella catarrhalis</i>	UspA1	T	Serum resistance	FN	[1]
	UspA2	T	Serum resistance	VN	[35]
	UspA2h	T			[31]
	Hag	T	Autoaggregation		[44]
	McaP	C	Esterase, Phospholipase		[58]
<i>Neisseria meningitidis</i>	NadA	T	Invasion		[8]
	App	C	Autoprotease		[52]
<i>Rickettsia</i>	rOmpA	C			[2]
	rOmpB	C	Invasion		[59]
<i>Salmonella enterica</i>	ShdA	C		Col, FN	[26]
	MisL	C	Invasion	Col, FN	[13]
<i>Yersinia enterocolitica</i>	YadA	T	Serum/phagocytosis resistance, Autoaggregation, Invasion	Col, L	[47]

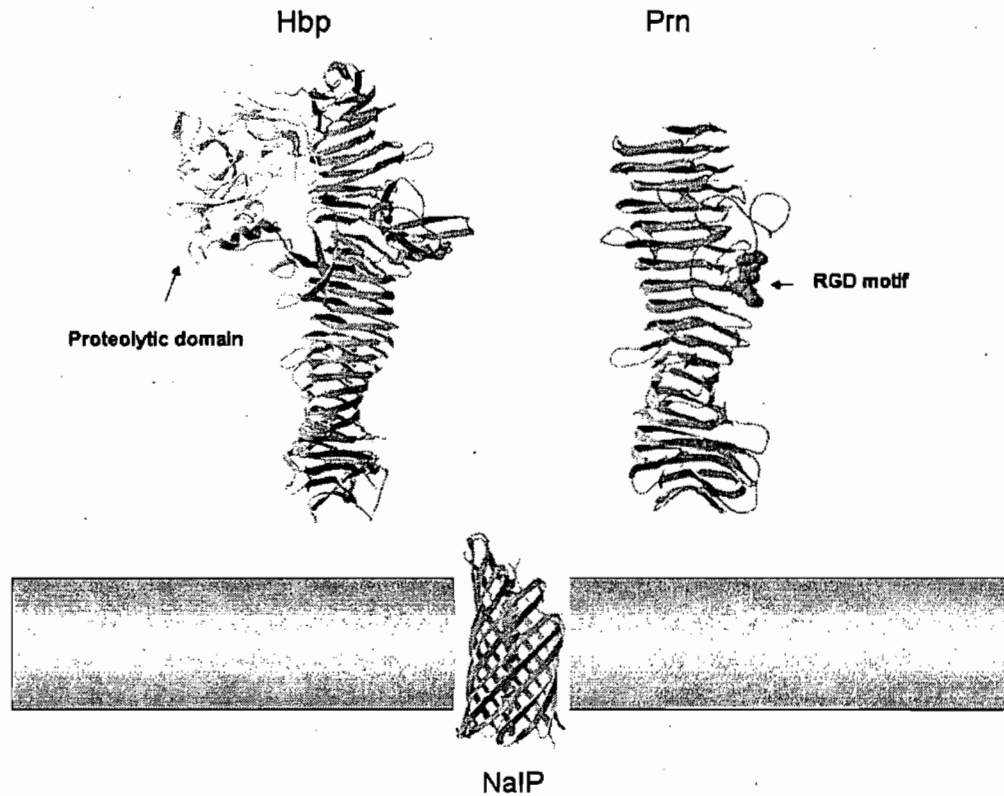
**Table 1: Autotransporter adhesins**

<sup>a</sup> Only confirmed adhesins are indicated, some autotransporters are homologous to known adhesins but since their role in adhesion had not been confirmed at the time of this review, they were not indicated. <sup>b</sup> C: Conventional autotransporter, T: Trimeric autotransporter. <sup>c</sup> Ag: Antigen, Col: Collagen, FN: Fibronectin, L: Laminin, VN: Vitronectin. <sup>d</sup> References: The references are to reports describing the adhesive properties of the autotransporter and they often do not coincide with reports of its discovery.



**Fig.1: Organization and biogenesis of autotransporters**

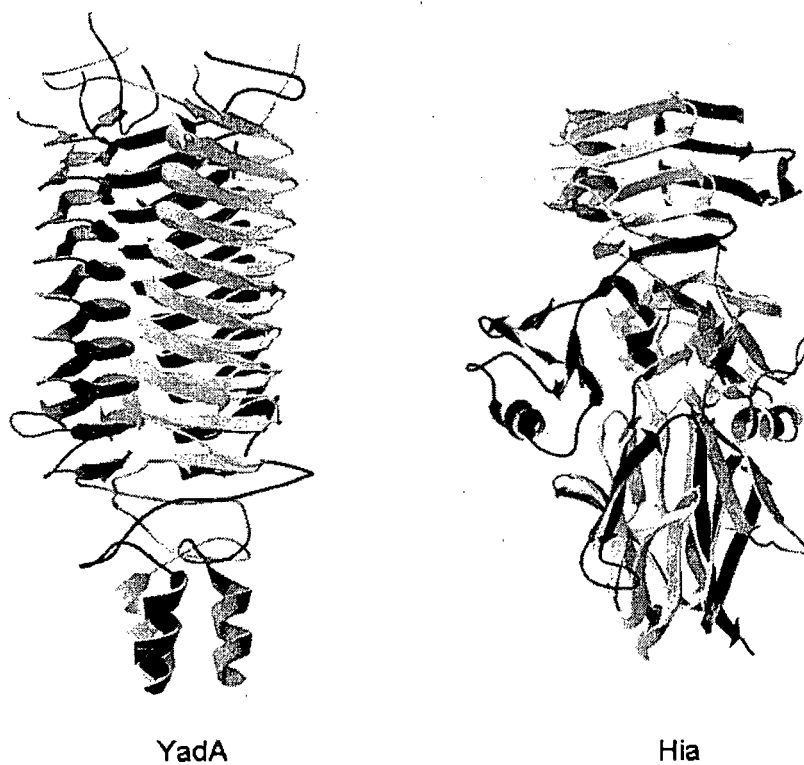
A. Schematic organization of conventional and trimeric autotransporters. The polypeptides comprise several domains: Signal Sequence (SS), Passenger domain and Translocation unit. Conventional autotransporters have an autochaperone domain at the C-terminal end of the passenger domain and distinct  $\alpha$  helix ( $\alpha$ ) and  $\beta$ -barrel in the translocation unit. B. Three steps biogenesis of conventional and trimeric autotransporters, refer to text for details.



**Fig.2: Structural features of conventional autotransporters**

Ribbon representations of the structures of the translocation unit of the *N. meningitidis* NalP [42], and the passenger domains of the *E. coli* Heme binding protein (Hbp) [43] and the *B. pertussis* Pertactin (Prn) [14]. The clearly separated proteolytic domain of Hbp is highlighted in light gray and the side chains of the aminoacids of the RGD motif of Prn are



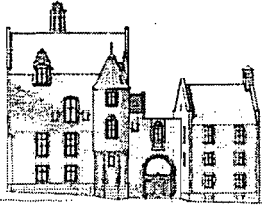


**Fig.3: Structural features of trimeric autotransporters**

Ribbon representations of the structures of binding domains of *Y. enterocolitica* YadA [39] and *H. influenzae* Hia [65]. These domains are trimeric and each monomer is represented by different shades of gray.

## Annexe 2

**Recherche du récepteur d'AIDA-I par la technique de résonance plasmonique de surface couplée à la spectrométrie de masse (SPR-MS).**



**SHELDON BIOTECHNOLOGY CENTRE**  
 Surface Plasmon Resonance - McGill University  
 A6 - 3773 University Street, Montréal, Québec, H3A 2B4



### 1. DEMANDE DE SUBVENTION

#### Section 1 – IDENTIFICATION DU DEMANDEUR PRINCIPAL OU DES CO-DEMANDEURS PRINCIPAUX

##### - Demandeur principal (ou co-demandeur 1)

Nom, Prénom:

MOUREZ, Michael

Institution de rattachement :

Université de Montréal

##### - Co-demandeur 2

Nom, Prénom:

COULTON, James

Institution de rattachement :

McGill University

#### Section 2 – PRÉSENTATION DU PROJET

Identification du type de projet auquel se rapporte votre demande :

- Projet de type « volet 1 »
- Projet de type « volet 2 »

**Partie I : Évaluation de la qualité du projet (cote sur 60).**

## 1. Descriptif du projet (une page)

- Décrire brièvement le contexte (courte revue bibliographique) dans lequel se situent cette « nouvelle initiative », la problématique impliquée, l'hypothèse et les objectifs spécifiques visés, tout en faisant ressortir explicitement l'**aspect novateur** du projet.
- Identifier **les retombées** escomptées des résultats de la recherche : soit percée scientifique au niveau fondamental (projets de type 1 – recherche fondamentale) soit retombées économiques (projets de type 2 – recherche appliquée).

L'adhésine impliquée dans l'adhérence diffuse (AIDA-I) est un facteur de virulence originellement identifié dans une souche pathogène d'*Escherichia coli* isolée d'un cas de diarrhée infantile<sup>1</sup>. Cette protéine permet l'adhésion à diverses lignées de cellules épithéliales en culture et permet également l'autoaggrégation bactérienne et la formation de biofilms<sup>3</sup>. Le rôle de AIDA-I a récemment pu être mis en évidence dans des infections chez le porc<sup>7,8</sup>. En effet, il a été observé par diverses équipes que *aidA*, le gène codant pour l'adhésine, est fréquemment retrouvé porté par des souches d'*E. coli* isolées de cas cliniques de diarrhées dans des élevages porcins<sup>8</sup>. L'isolement de souches *aidA*<sup>+</sup> est aussi en augmentation récente et régulière<sup>7</sup>. Une infection expérimentale de porcelets a pu montrer qu'une souche pathogène d'*E. coli* ne contenant que AIDA-I et STb (une toxine thermostable) causait une maladie, alors qu'une souche isogénique dépourvue de AIDA-I ne causait pas de pathologie<sup>10</sup>. AIDA-I est donc un **nouveau facteur de virulence** important pour les infections porcines à *E. coli*.

Malheureusement, peu de détails sont connus sur le fonctionnement de AIDA-I. En particulier, aucun récepteur n'a été trouvé pour AIDA-I alors que des preuves de son existence existent<sup>6</sup>. Au cours des dernières années au laboratoire du Dr M. Mourez, nous avons étudié la biogenèse de AIDA-I<sup>3,11</sup> et le rôle de AIDA-I dans la pathogénèse chez le porc<sup>10</sup>, mais nous n'avons pas entrepris d'étude sur le mécanisme moléculaire de cette protéine en tant qu'adhésine. **L'objectif spécifique de cette initiative est donc d'initier un nouveau projet qui aura pour but de rechercher le récepteur de AIDA-I.** Une fois le récepteur identifié, son interaction avec AIDA-I sera sommairement caractérisée afin d'ouvrir la porte à des projets de recherche ultérieurs.

Plusieurs approches ont déjà été mise en œuvre pour rechercher le récepteur de AIDA-I, comme la co-immunoprécipitation ou la chromatographie d'affinité<sup>6</sup>. Ces approches n'ont malheureusement donné que des résultats incomplets ou controversés. Au laboratoire du Dr J. Coulton, nous avons récemment acquis une grande expérience dans l'utilisation de la Résonance Plasmonique de Surface (RPS) pour l'étude des interactions protéine-protéine, incluant les interactions avec des protéines membranaires<sup>2,5,9</sup>. Nous nous proposons maintenant de rassembler nos expertises afin de développer, en ciblant AIDA-I, une **nouvelle approche** pour la recherche de récepteur d'adhésines bactériennes : La capture sur un appareil à RPS couplée à l'identification par Spectrométrie de Masse (SM). Il s'agit donc d'un projet avec de multiples aspects novateurs : nouvelles informations sur un facteur

de virulence émergent dans les infections porcines; mise en œuvre d'une nouvelle approche et de nouvelles technologies de pointe; mise sur pied d'une **nouvelle collaboration** entre deux laboratoires et deux universités. La nouveauté de l'approche apporte un risque élevé mais le succès de l'entreprise sera facile à évaluer en une année. Ce projet correspond donc idéalement aux objectifs des nouvelles initiatives du CRIP. Les **retombées scientifiques** attendues de ce projet sont multiples : L'identification d'un récepteur permettra de rationaliser l'élaboration d'une thérapie (par exemple en cherchant à utiliser des analogues du récepteur comme inhibiteurs compétitifs de l'adhésion). De plus la technologie sera applicable à d'autres adhésines et facteurs de colonisation bactériens. Enfin, ce projet consolidera une expertise technique naissante au Québec et au Canada, celle de la RPS couplée à la SM.

## 2. Méthodologie (une demi-page)

Décrire succinctement la méthodologie utilisée, en faisant ressortir sa **faisabilité**, notamment en démontrant l'adéquation des membres de l'équipe de recherche pour mener à bien sa réalisation, mais aussi au niveau de la réalisation technique (disponibilité d'équipements par exemple).

- Identifier les participants au projet (stagiaires postdoctoraux, étudiants des cycles supérieurs (avec leurs directeurs et codirecteurs), professionnels et techniciens de recherche (avec le laboratoire de rattachement).
- Préciser l'implication de chacun dans la réalisation du projet (les expériences à effectuer).
- Identifier les laboratoires où auront lieu les activités de recherche;

Nous utiliserons la protéine AIDA-I purifiée. Le protocole de purification a déjà été mis au point dans notre laboratoire (Dr M. Mourez) et utilise une combinaison de chromatographie d'affinité et de tamisage moléculaire<sup>3</sup>. La protéine sera ensuite couplée par amidification sur une puce compatible avec l'appareil Biacore 3000 et basée sur des dextrans modifiés. Des extraits cellulaires seront préparés à partir de lignées de cellules épithéliales en culture (Hep-2, HeLa et, éventuellement, T84). Du sérum porcine sera aussi utilisé car d'autres adhésines semblables à AIDA-I fixent des protéines sériques pour médier l'adhésion à des cellules eukaryotes<sup>4</sup>. Les extraits seront fractionnés par chromatographie (échangeuse d'ions) et passés sur la puce portant AIDA-I. La fixation d'un partenaire sera suivie par RPS et les partenaires capturés seront libérés et récoltés pour être identifiés par SM. Ces techniques sont déjà mises en œuvre au centre Sheldon de l'Université McGill auquel nous sommes étroitement associés<sup>2,5,9</sup> (Dr J. Coulton). Les interactions entre AIDA-I et un récepteur putatif seront confirmées par d'autres techniques (Pull-down ou immunoprécipitation) et caractérisées grâce au Biacore (mesure d'affinité dans différents tampons, par exemple). Une étudiante au doctorat, Mlle Victoria Girard, actuellement sous la direction

du Dr M. Mourez et possédant une expertise avec AIDA-I et le Biacore sera la principale personne réalisant les expériences. Elle y consacrera 50% de son temps, poursuivant ainsi ses autres projets concernant AIDA-I. Elle sera assistée par M. Frédéric Berthiaume, assistant de recherche, ainsi que par le Dr Mark Hancock, responsable de la plateforme RPS à l'Université McGill, et le Dr Bernard Gibbs, contractuel en spectrométrie de masse à l'Université McGill, tous deux associés au Dr J. Coulton. Les expériences auront donc lieu à parts égales dans les deux Universités.

### 3. Budget (un quart de page)

- |                                   |           |
|-----------------------------------|-----------|
| - Coût total du projet :          | 24,980 \$ |
| - Aide financière demandée (CRIP) | 24,980 \$ |
- Autre source éventuelle de financement complémentaire :
- |           |  |
|-----------|--|
| Nature :  |  |
| Montant : |  |
- Ventilation du budget.

#### **PERSONNELS: 13,500\$**

*Purification de protéine:* Mlle Victoria Girard (Étudiante Graduée) dédiera 50% de son temps à ce projet au cours de l'année 2007. Sa bourse annuelle est de 17,000\$ donc **8,500\$** sont demandés au CRIP. *Spectrométrie de Masse (SM):* Le Dr Bernard Gibbs (Centre de Biotechnologie Sheldon) planifie et dirige les expériences de SM inhabituelles sur une base contractuelle pour l'Université McGill. Nous demandons **5,000\$** pour le contrat correspondant à ce projet comme honoraires pour le Dr Gibbs. *Résonance Plasmonique de Surface (RPS):* Les appareils Biacore du centre Sheldon représente une infrastructure majeure accessible dans le cadre du CRIP via une collaboration avec le Dr J. Coulton (Professeur, Microbiologie) et Dr M. Hancock (Responsable, RPS) à McGill.

#### **CONSOMMABLES, SERVICES ET MATÉRIELS: 6,980\$**

*Purification de protéine et manipulations de routine:* **4,000\$** (estimation basée sur une moyenne annuelle par projet et par personne). *RPS :* Puces Biacore CM4 (310\$/puce, 8 puces): **2,480\$** + Consommable spécifique au Biacore et SM (microtip avec filtres, tubes, etc...): **500\$** + Accès au service RPS (le coût académique en vigueur, sur une base de co-signature des publications résultantes

du service, est de 125\$/jour mais il est décliné dans notre cas grâce à un accord particulier): **0\$**.

**VOYAGE: 4,500\$**

Afin d'accéder à l'infrastructure RPS nous devons effectuer des déplacements entre McGill (Montreal) et l'UdeM (Saint-Hyacinthe). Pour un étudiant gradué : 60\$/voyage; 2 voyages/semaine lors des expériences de Biacore (30 semaines), parfois (en hiver notamment), un hébergement à la résidence étudiante McGill sera nécessaire pour la nuit (90\$/nuit, 10 nuits): **3,600\$ + 900\$ = 4,500\$**.

**TOTAL : 24,980\$**

**4. Références bibliographiques (un quart de page)**

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. Carter, D. M., I. R. Miousse, J. N. Gagnon, E. Martinez, A. Clements, J. Lee, M. A. Hancock, H. Gagnon, P. D. Pawelek, and J. W. Coulton. 2006. Interactions between TonB from *Escherichia coli* and the periplasmic protein FhuD. *J Biol Chem*. In press
3. Charbonneau, M. E., F. Berthiaume, and M. Mourez. Proteolytic processing is not essential for multiple functions of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I). *J Bacteriol* **Submitted**.
4. Girard, V., and M. Mourez. 2006. Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: Structural and functional features. *Res Microbiol* **157**:407-16.
5. Khursigara, C. M., G. De Crescenzo, P. D. Pawelek, and J. W. Coulton. 2005. Kinetic analyses reveal multiple steps in forming TonB-FhuA complexes from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **44**:3441-53.
6. Laarmann, S., and M. A. Schmidt. 2003. The *Escherichia coli* AIDA autotransporter adhesin recognizes an integral membrane glycoprotein as receptor. *Microbiology* **149**:1871-82.
7. Ngeleka, M. 2002. Isolation of a new *Escherichia coli* pathotype associated with diarrhea in piglets. *Can Vet J* **43**:623-4.
8. Ngeleka, M., J. Pritchard, G. Appleyard, D. M. Middleton, and J. M. Fairbrother. 2003. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J Vet Diagn Invest* **15**:242-52.
9. Pawelek, P. D., N. Croteau, C. Ng-Thow-Hing, C. M. Khursigara, N. Moiseeva, M. Allaire, and J. W. Coulton. 2006. Structure of TonB in complex with FhuA, *E. coli* outer membrane receptor. *Science* **312**:1399-402.
10. Ravi, M., M. Ngeleka, S.-H. Kim, C. L. Gyles, F. Berthiaume, M. Mourez, D. M. Middleton, and E. Simko. Contribution of AIDA-I to the pathogenicity of a porcine diarrheagenic *Escherichia coli* and to intestinal colonization through biofilm formation in pigs. *Vet Microbiol* **Submitted**.
11. Rutherford, N, M.-E. Charbonneau, F. Berthiaume, J.-M. Betton and M. Mourez. 2006. The periplasmic folding of a cysteineless autotransporter passenger domain interferes with its outer membrane translocation. *J Bacteriol*. **188**:4111-6.

**Partie 2 : Rencontre des objectifs du Centre (une page) Cote sur 40.**

Démontrer la pertinence du projet par rapport aux objectifs du Centre, en particulier :

- Identifier les **disciplines** impliquées au niveau du projet et les personnes ressources du projet aptes à les fournir;
- Identifier les **axes de recherche** du programme du Centre, auxquels est rattaché le projet;
- Identifier les expertises requises pour mener à bien le projet et faire ressortir la complémentarité d'expertises des participants au projet.

Le plan de recherche que nous proposons est un projet de recherche fondamentale qui repose sur plusieurs disciplines. Il s'agit de **biochimie** et **biologie moléculaire**, dans les aspects de purification de AIDA-I et de sa caractérisation préalable aux études ultérieures. Il s'agit également de **biophysique**, dans les aspects de l'utilisation de la RPS et de l'interprétation des résultats obtenus avec cette technique. Il s'agit aussi de **protéomique**, dans l'approche d'identification de partenaires protéiques et dans l'utilisation de SM. Enfin il s'agit de **biologie cellulaire** et de **pathogenèse bactérienne** dans ce qui a trait à la caractérisation du récepteur putatif.

Ce programme s'inscrit dans l'**axe 1 de recherche du CRIP**, c'est-à-dire l'étude des agents infectieux. En effet, l'identification et la caractérisation du récepteur de l'adhésine AIDA-I nous permettra de mieux comprendre la pathogenèse de virotypes d'*Escherichia coli* qui sont de plus en plus identifiés comme responsables d'infections coûteuses dans les élevages porcins : la diarrhée post-sevrage et la maladie de l'œdème. Ces études nous serviront aussi de base pour d'autres études : Des études de l'interaction entre AIDA-I et son récepteur afin de mieux comprendre le mécanisme moléculaire de l'adhésion que permet AIDA-I (qui s'inscrivent dans l'axe 1 également) et des études afin d'utiliser des analogues du récepteur afin de combattre l'adhésion causée par AIDA-I (qui s'inscrivent dans l'axe 3). Nous rechercherons d'autres sources de financement auprès des organismes fédéraux et provinciaux pour conduire ces projets.

Il s'agit d'un projet **innovant** et risqué, s'inscrivant dans une durée clairement limitée et adaptée au calendrier proposé sur une année. Le succès de ce projet ouvrira de nouvelles avenues de recherche et permettra alors de postuler à d'autres sources de financements avec des données préliminaires solides. Ces caractéristiques en font un projet bien adapté aux nouvelles initiatives du CRIP.

Nous allons réunir les expertises du Dr **Michaël Mourez** qui portent sur la biochimie et biologie moléculaire de AIDA-I avec celles du **Dr James Coulton** qui portent sur l'étude des interactions ligands-récepteurs entre protéines membranaires, notamment en utilisant la RPS et la SM. Il s'agit de l'établissement d'une **nouvelle collaboration** entre ces deux laboratoires qui n'ont jamais travaillé ensemble auparavant. Les environnements de l'UdeM et de McGill permettront de plus de trouver des personnes ressources concernant la biologie de AIDA-I (Dr John Fairbrother), les interactions entre adhésines de pathogènes bactériens et molécules de l'hôte (Dr Marcelo Gottschalk, Dr Mario Jacques) et la RPS-SM (Dr Mark Hancock et Dr Bernard Gibbs). C'est donc avec confiance et enthousiasme que nous proposons ce projet.

## 2. RESULTATS OBTENUS

### Materials & Methods

Biomolecular interactions involving AIDA (150 kDa) were examined in real-time using BIACORE 3000 instrumentation (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Experiments were performed on research-grade CM5 or CM4 sensor chips at 25°C using filtered (0.2 µm) and degassed running buffer HBL-P (10 mM Hepes pH 7.4, 150 mM LiCl, 0.005% (v/v) Tween-20). The amine coupling reagents EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide), NHS (N-hydroxysuccinimide), and ethanolamine were from GE Healthcare. Protein-grade detergents (10% (v/v) Tween-20, 10% (v/v) DDM, 10% (v/v) Triton X-100, 30% (v/v) Empigen) were from Calbiochem; all other chemicals were reagent grade quality. Prior to all experiments, protein concentrations were determined using the BCA assay and purity (>95%) was assessed by SDS-PAGE (10% polyacrylamide) under reducing (5% (v/v) 2-mercaptoethanol) conditions, followed by silver staining (data not shown).

Amine-coupled reference and AIDA surfaces (250 – 12,000 RU) were prepared according to the manufacturers' recommendations using HBL-P running buffer. Briefly, 70 µL of freshly mixed solution I (200 mM EDC and 50 mM NHS in water) was injected (10 µL/min) to activate surface-exposed carboxymethyl groups to reactive esters. Next, AIDA (10 µg/mL in 10 mM sodium acetate pH 4.0) was manually injected to the desired surface density. Finally, 70 µL of solution II (1 M ethanolamine pH 8.5) was injected to deactivate excess reactive groups and remove any non-specifically bound ligand. Coupling efficiencies were typically greater than 90% and corresponding reference surfaces were prepared in the similar manner without any ligand addition. An anti-AIDA polyclonal antibody (positive binding control) and BSA (negative binding control) were injected to confirm that amine-coupled AIDA surfaces were active and exhibited little or no non-specific binding, respectively.

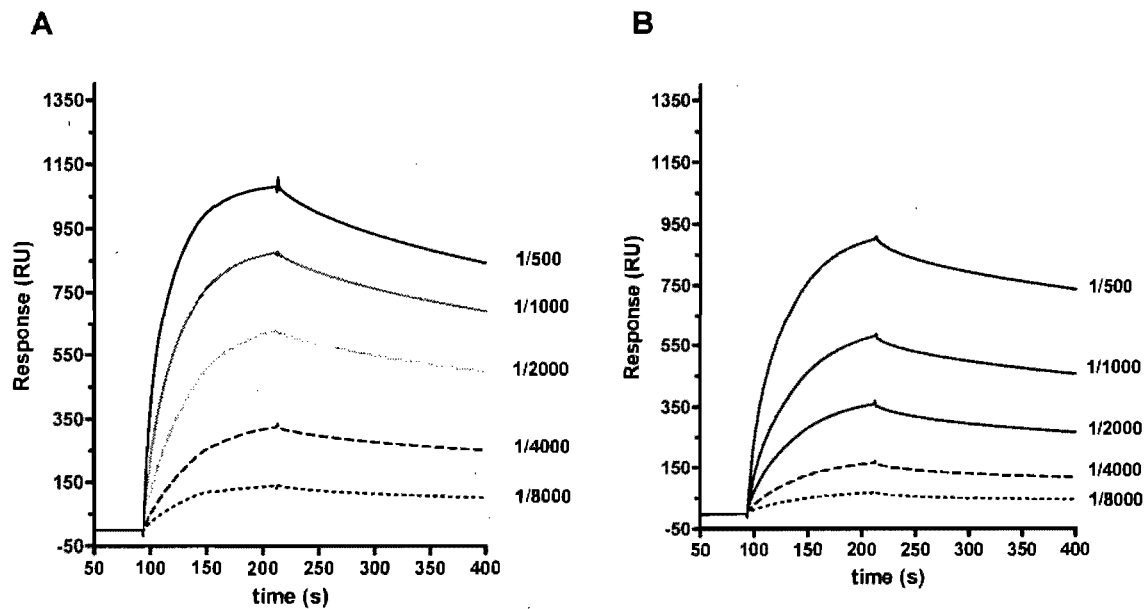
To test for novel binding partners, porcine or human serum at different dilutions were injected over high-density AIDA surfaces (optimized CM4 sensor chips and HBL-P running buffer) using a low flow rate (10 µL/min) and 'QUICKINJECT' mode (3 – 5 min association). Serum pre-treatments included boiling (10 min at 100°C) and separation



according to molecular weight (Millipore microcons YM10, YM30, YM100). Serum-loaded AIDA surfaces were washed with 50 mM ammonium acetate pH 6.9 prior to 60 sec microrecovery incubations with 1M ammonium bicarbonate pH 10.2. Using the automated recovery wizard (BIAcontrol v4.1 software), 20 repeated cycles of unknown analyte collection were performed per series.

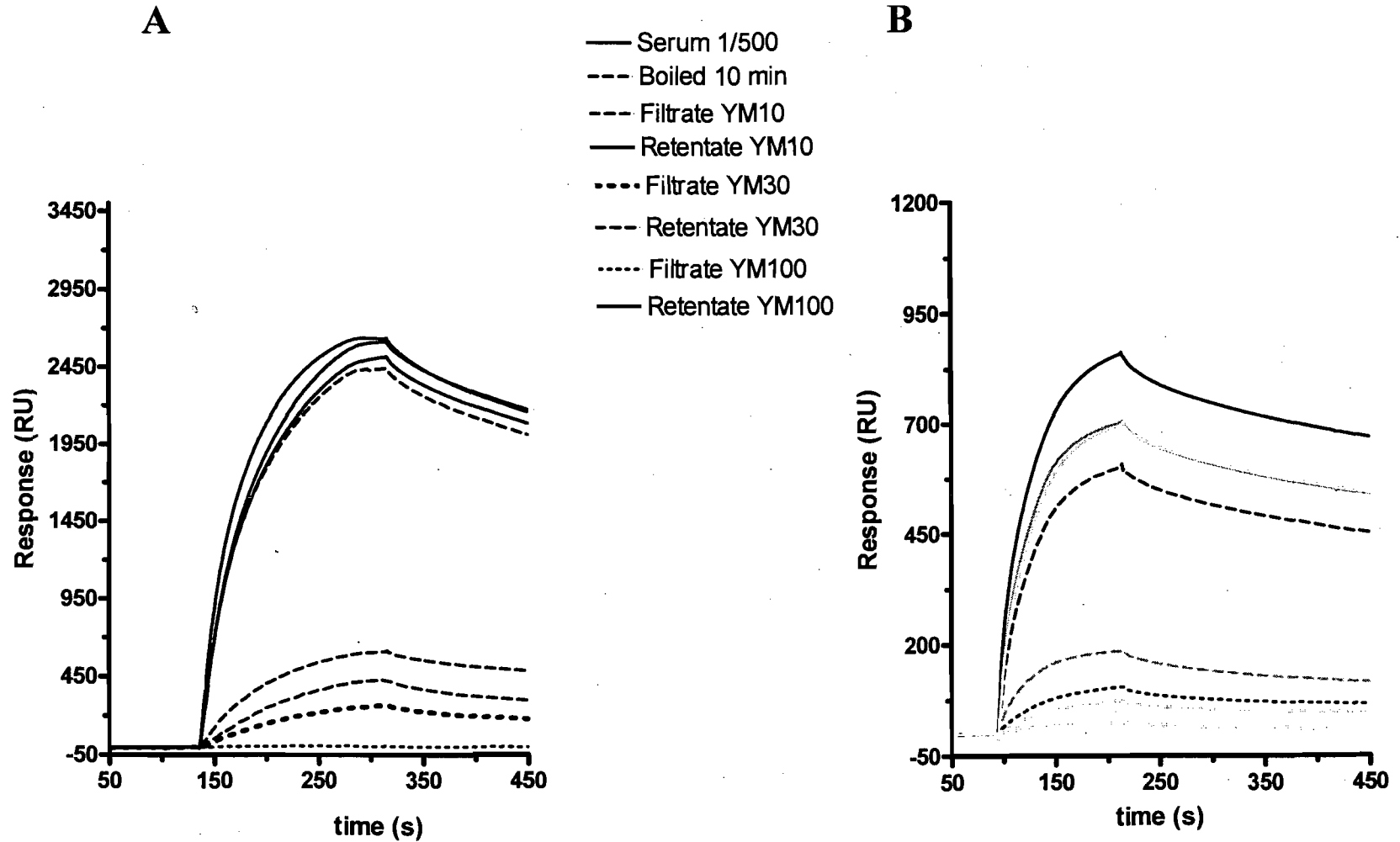
### **Results & Discussion**

To test for novel AIDA binding partners, CM4 sensor chips were amine-coupled using a more mass spectrometry-friendly running buffer (HBL-P; 10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM LiCl, 0.005% Tween20). Both porcine and human serum exhibited saturable, dose-dependent binding to AIDA-immobilized surfaces (Figure 13). When both sera were boiled for 10 minutes, the recovered supernatants still exhibited AIDA binding responses, albeit at much lower levels compared to native serum injections (Figure 14). When both sera were separated according to molecular weight, recovered filtrates that passed through the YM10 and YM30 microcon cut-off filters still exhibited modest AIDA binding responses; interestingly, there was little or no binding response with the YM100 filtrates (Figure 14). In all cases, recovered YM10, YM30, and YM100 retentates that were retained above the microcon cut-off filters maintained similar AIDA binding responses compared to native serum injections. Small-scale microrecovery conditions were eventually optimized such that 1/500 dilutions of porcine or human serum were loaded over AIDA surfaces, washed with mass spectrometry-friendly 50 mM ammonium acetate pH 6.9, and finally eluted using mass spectrometry-friendly 1M ammonium bicarbonate pH 10.2. However, large-scale microrecovery with the automated 20-cycle wizard showed that 60 sec ammonium bicarbonate elutions were not effective over the long-term (figure 15). Thus, future studies will have to address additional optimizations (eg. altered elution contact time).



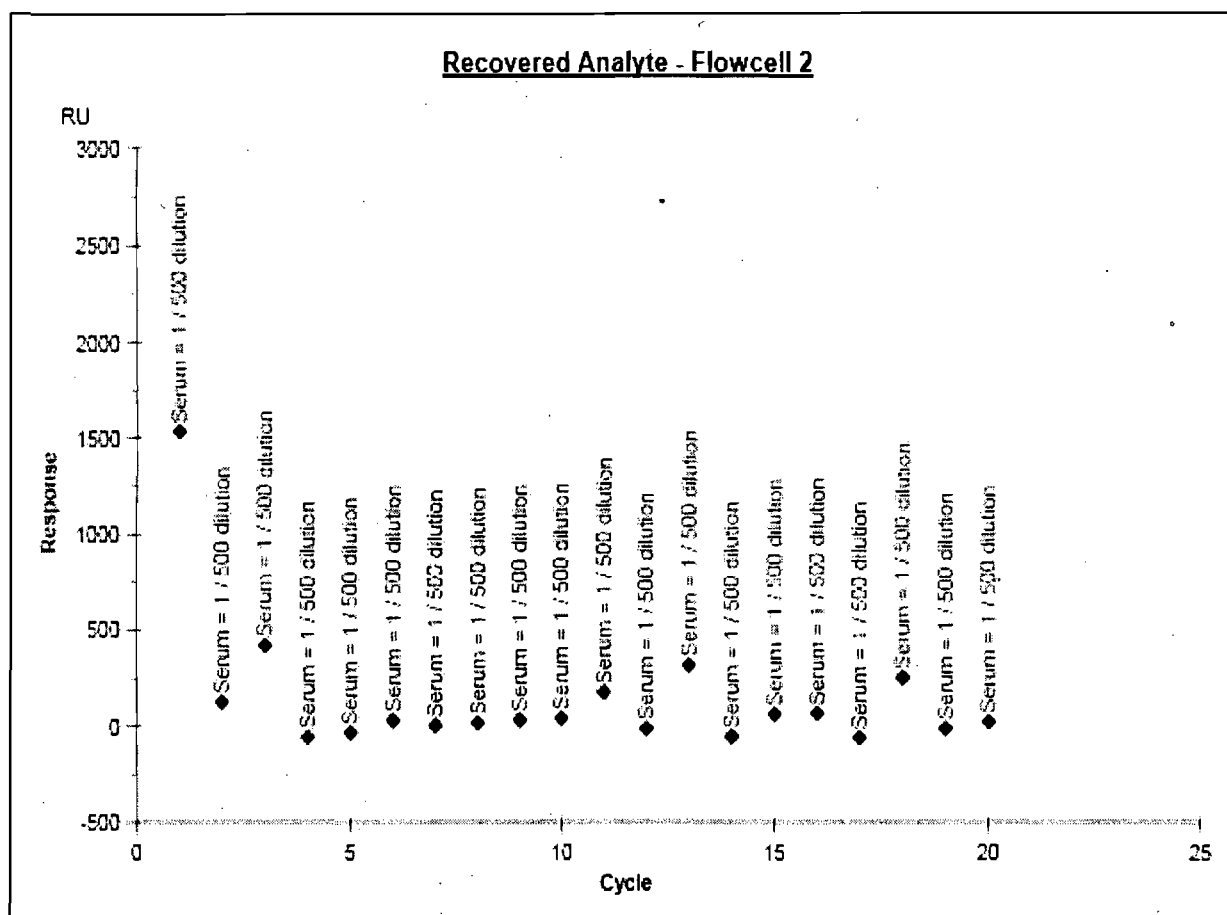
**Fig. 13. SPR analysis of AIDA-I/serum interaction**

Representative binding curves obtained by injection of various dilutions (1/500 to 1/8000) of porcine (A) or human (B) serums on the surface of a chip coupled with AIDA-I.



**Fig.14. Effect of heat-treatment and filtration on AIDA-I/serum interaction.**

Representative binding curves obtained by injection of porcine (A) or human (B) serum (dilution 1/500) after heat-treatment 10 min at 100 °C or separation according to molecular weight (Millipore microcons YM10, YM30, YM100).



**Fig. 15. SPR-MS microrecovery.**

Large-scale microrecovery showing the response obtained for each cycle using the automated 20-cycle wizard. One cycle consists in loading of 1/500 dilutions of porcine serum, washing with 50 mM ammonium acetate pH 6.9 and elution using 1M ammonium bicarbonate pH 10.2