



HAL
open science

Type-V secretion system in Gram-negative bacteria

Mickaël Desvaux, Nicholas Parham, Ian R. Henderson

► **To cite this version:**

Mickaël Desvaux, Nicholas Parham, Ian R. Henderson. Type-V secretion system in Gram-negative bacteria. *Biofutur*, 2003, 237, pp.34-37. hal-02910787

HAL Id: hal-02910787

<https://hal.inrae.fr/hal-02910787v1>

Submitted on 16 Sep 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Le système de sécrétion de type V chez les bactéries Gram-négatives

Chez les bactéries Gram-négatives, les protéines synthétisées dans le cytoplasme doivent franchir deux membranes pour être sécrétées. Parmi les cinq systèmes de sécrétion identifiés chez ces bactéries, la sécrétion de type V, voie privilégiée des protéines autotransporteurs et des protéines TPS, pourrait trouver d'intéressantes applications en biotechnologie.

Mickaël Desvaux, Nicholas J. Parham et Ian R. Henderson*

*Bacterial Pathogenesis and Genomics Unit, Division of Immunity and Infection, University of Birmingham-The Medical School, Edgbaston, Birmingham B15 2TT, United Kingdom.
i.r.henderson@bham.ac.uk

(1) H. Tjalsma *et al.* (2000) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 515-547.

** Deux types de structuration de l'enveloppe existent chez les bactéries et peuvent être discriminés après une méthode de coloration mise au point par le médecin danois Christian Gram en 1883. En fonction du maintien ou non de la coloration pourpre des cellules par le cristal violet après action de l'éthanol, on parle respectivement de bactéries à Gram positif ou à Gram négatif.

Jusque dans les années 80, la sécrétion des protéines à travers les membranes biologiques, c'est-à-dire du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire, était considérée comme un phénomène relativement rare dont le mécanisme était spécifique à chaque organisme. Depuis, cette perception a radicalement changé puisqu'il s'avère que les cellules eucaryotes et procaryotes sécrètent une gamme prodigieuse de protéines, regroupées sous l'appellation de secrétome, et qu'elles partagent des voies de sécrétion communes. Chez les bactéries, la majeure partie des informations concernant les différents mécanismes de sécrétion dérivent d'études réalisées chez des bactéries pathogènes des plantes et des animaux. En effet, la capacité d'une bactérie à infecter, se multiplier et survivre au contact ou dans une cellule hôte dépend en grande partie de sa capacité à sécréter des facteurs de virulence.

La sécrétion des protéines implique d'une part l'existence de systèmes permettant le transport de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule, c'est-à-dire au travers de l'enveloppe qui délimite la cellule bactérienne, et d'autre part que les protéines destinées à être sécrétées contiennent une information définie qui gouverne leur destination, c'est ce que l'on appelle l'adressage cellulaire. L'enveloppe des bactéries Gram-positives** est composée d'une membrane cellulaire interne (formée d'une double couche phospholipidique) entourée d'une paroi constituée d'une épaisse couche multimoléculaire de muréine (un type de peptidoglycane). Les bactéries Gram-négatives possèdent elles aussi une membrane interne mais celle-ci est entourée par une fine couche de muréine, elle-même entourée par une seconde membrane cellulaire appelée membrane externe. Le périplasma est la région comprise entre ces deux membranes. Ainsi, chez les bactéries Gram-négatives

deux membranes cellulaires doivent être franchies pour qu'une protéine synthétisée dans le cytoplasme soit sécrétée.

La sécrétion vers le milieu extracellulaire (chez les bactéries Gram-positives) ou l'exportation vers le périplasma (chez les bactéries Gram-négatives) des protéines au travers de la membrane interne (aussi appelée membrane plasmique ou cytoplasmique) fait intervenir des complexes protéiques, appelés translocases. Les translocases sont constituées de structures protéiques transmembranaires, dénommées translocons, et d'enzymes et de facteurs périphériques. Deux types de translocons impliqués dans la sécrétion ont jusqu'à présent été identifiés chez les bactéries Gram-négatives : le système Sec-dépendant qui fait intervenir le translocon SecYE, et le système Tat (*Twin arginine translocation*) qui fait intervenir le translocon TatABCE. Dans le système Sec-dépendant, deux facteurs accessoires peuvent intervenir : soit la protéine chaperone SecB, soit le facteur SRP (*Signal Recognition Particle*). En l'absence de SecB, d'autres chaperones peuvent jouer le même rôle, notamment DnaK ou DnaJ. Le système SRP permet une translocation co-traductionnelle des protéines tandis que le système Tat autorise la translocation des protéines sous leur forme repliée native.

La sécrétion chez les bactéries Gram-positives

Chez les bactéries Gram-positives, les protéines destinées à être sécrétées peuvent emprunter différents systèmes : le système SRP-dépendant, le système Tat, des transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*) où l'hydrolyse d'ATP (*Adénosine TriPhosphate*) fournit seule l'énergie nécessaire au transport, ou encore le système Com (*Competence development*) impliqué dans la formation des pili permettant le transfert de matériel génétique entre bactéries (1).

La sécrétion chez les bactéries Gram-négatives

Dans le cas des bactéries Gram-négatives, les protéines doivent franchir une seconde membrane pour être sécrétées. Jusqu'à présent cinq systèmes de sécrétion, numérotés de I à V, ont été identifiés chez ces bactéries (2, 3). Il est important de souligner que cette classification est fondée sur le mécanisme de translocation situé au niveau de la membrane externe puisque c'est le franchissement de cette membrane qui gouverne la sécrétion.

Le système de sécrétion de type I peut être illustré par l'hémolysine HlyA d'*Escherichia coli* (4). Cette protéine est sécrétée via un complexe oligomérique composé d'un transporteur ABC appelé HlyB, d'une protéine périplasmique HlyD et d'une protéine membranaire TolC. Ce complexe traverse à la fois la membrane interne et la membrane externe.

Le système de sécrétion de type II est un processus à deux étapes illustré par la pullunase Pula de *Klebsiella oxytoca*. Contrairement au modèle originellement proposé, il a été démontré que ce système n'utilise pas exclusivement le système SecB-dépendant mais peut aussi emprunter la voie Tat. Le transport ultérieur à travers la membrane externe requiert un complexe protéique formant un pore membranaire dénommé sécrétion. Le système de sécrétion de type II est à présent appelé la voie sécrétion-dépendante (5).

Le système de sécrétion de type III est constitué d'un assemblage complexe de protéines formant une structure traversant à la fois la membrane interne et la membrane externe (6). Ce système porte aussi le nom d'injectisome, puisqu'il peut permettre l'injection de protéines directement à l'intérieur d'une cellule eucaryote. Il faut cependant souligner que certaines protéines empruntant ce mode de transport peuvent être simplement sécrétées dans le milieu extracellulaire.

À l'heure actuelle, le système de sécrétion de type IV est le moins bien compris. Il est fortement apparenté à la conjugaison bactérienne et peut être exemplifié par le système de transfert des nucléoprotéines T-DNA d'*Agrobacterium tumefaciens* ou encore de la toxine pertussique PtI de *Bordetella pertussis* (7). Les protéines utilisant cette voie de sécrétion peuvent être sécrétées dans le milieu extracellulaire ou directement dans la cellule hôte.

Le système de sécrétion de type V est le plus récent décrit. Les protéines empruntant cette voie sont transloquées au travers de la membrane externe par un pore membranaire formé par un tonneau β . Deux systèmes de protéines empruntent cette voie, d'une part les autotransporteurs et d'autre part le système à deux partenaires TPS (*Two Partner System*).

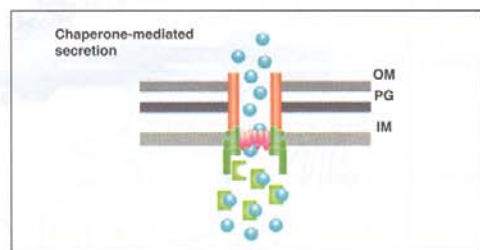
La voie de sécrétion des autotransporteurs

Cette voie de sécrétion a été pour la première fois décrite pour la protéase IgA1 de *Neisseria gonorrhoeae* par Pohlner et al. (8), qui élucidèrent les mécanismes fondamentaux impliqués entre l'expression du gène et la présence de cette protéine dans le milieu extracellulaire. Durant la sécrétion, IgA1 est modifiée à la fois à son extrémité N-terminale et C-terminale. L'exportation de cette protéine au travers de la membrane interne s'effectue via le translocon Sec et s'accompagne du clivage d'une séquence signal.

Dans le milieu extracellulaire, la protéine mature est dépourvue de son domaine C-terminal. Il fut alors proposé que le domaine C-terminal se repliait en tonneau β

dans la membrane externe et que la partie N-terminale de la protéine était transloquée au travers de ce pore avant d'être libérée dans le milieu extracellulaire par un processus autocatalytique. Puisqu'aucune énergie de couplage ou d'autres facteurs accessoires ne semblaient requis pour la translocation, les protéines sécrétées selon ce mode ont reçu le nom d'autotransporteurs.

Depuis ce travail séminal, un grand nombre de protéines ont été identifiées comme utilisant ce modèle de voie de sécrétion. La structure primaire de ces protéines est modulaire (9) (figure p.36). À l'extrémité N-terminale se trouve la séquence signal, ou peptide signal, qui permet l'adressage de la protéine



Voie de sécrétion de type III médiée par des protéines chaperons. Les protéines chaperons (en vert clair) se lient aux substrats de sécrétion (en bleu). Dans ce modèle, c'est la protéine chaperon qui communique avec l'appareil de sécrétion, et délivre le substrat pour qu'il soit sécrété. Un substrat non lié n'est pas reconnu, et ne peut donc être sécrété.

En orange : le canal traversant les deux membranes. En vert et en rouge : les éléments de l'appareil de sécrétion, directement ou indirectement liés à la membrane interne. IM : membrane interne, OM : membrane externe, PG : couche rigide du peptidoglycane.

vers la membrane interne. Le domaine passager, aussi appelé domaine α , est sécrété vers le milieu extracellulaire ; c'est lui qui confère les diverses fonctions attribuées aux autotransporteurs. À l'extrémité C-terminale se trouve l'unité de translocation, constituée d'un domaine β qui adopte une conformation en tonneau β dans la membrane externe, et d'une région en hélice α appelée région reliante puisqu'elle relie le domaine passager au domaine β (10).

En fonction de la protéine autotransporteur considérée, le domaine passager peut être libéré dans le milieu extracellulaire ou bien rester attaché au domaine β et être ainsi exposé en surface de la membrane externe. Les autotransporteurs représentent le plus important groupe de protéines sécrétées par les bactéries Gram-négatives (11). D'un point de vue phylogénétique, cependant, ce groupe de protéines est restreint au phylum *Proteobacteria* (γ -, β -, et ϵ -*Proteobacteria*) et au phylum *Chlamydiae* (genre *Chlamydia*) (12).

L'exportation vers le périplasma

L'analyse bioinformatique de l'extrémité N-terminale des autotransporteurs a permis de prédire que les séquences signal identifiées étaient caractéristiques de protéines exportées par le système SecB-dépendant (9). En partant de leur extrémité N-terminale, ces séquences signal possèdent dans l'ordre un domaine n globalement chargé positivement, suivi d'un domaine h contenant majoritairement des acides aminés hydrophobes

(2) I.R. Henderson et al. (2000) *Trends Microbiol.* 8, 352.

(3) G.P.C. Salmond and P.J. Reeves (1993) *Trends Biotech.* 18, 7-12

(4) M.J. Fath and R. Koller (1993) *Microbiol. Rev.* 57, 995-1017.

(5) R. Voulhoux et al. (2001) *EMBO J.* 20, 6735-41.

(6) D. Buttner and U. Bonas (2002) *Trends Microbiol.* 10, 186-192.

(7) P.J. Christie and J.P. Vogel (2000) *Trends Microbiol.* 8, 54-60.

(8) J. Pohlner et al. (1987) *Nature* 325, 458-462.

(9) I.R. Henderson et al. (1998) *Trends Microbiol.* 6, 370-378.

(10) D.C. Oliver et al. (2003) *J. Bacteriol.* 185, 489-495.

(11) M.R. Yen et al. (2002) *Biochim. Biophys. Acta.* 1562, 6-31.

(12) I.R. Henderson and A.C. Lam (2001) *Trends Microbiol.* 9, 573-578.

et un domaine c présentant un site de clivage consensus pour les peptidases. Cependant, certains auto-transporteurs possèdent des séquences signal particulièrement longues constituées d'une cinquantaine d'acides aminés. Par rapport aux peptides signal décrits précédemment, ces séquences présentent systématiquement une extension bien conservée de leur domaine n. Il a été suggéré que ces séquences signal particulièrement longues pouvaient interagir avec SRP (9). Récemment, il a été montré que pour Hbp, un auto-transporteur d'*Escherichia coli*, l'exportation à

intramoléculaire permettant, après translocation, le repliement complet du domaine passager en surface de la membrane externe (15). Pour IcsA, un auto-transporteur de *Shigella flexneri*, l'intermédiaire périplasmique qui est transitoire et futile, semble être protégé de la dégradation par les protéases périplasmiques et maintenu sous une forme dépliée par la chaperone DegP.

La translocation au travers de la membrane externe

Bien que très variables au niveau de leurs séquences, les domaines β des auto-transporteurs sont tous homologues (11). Tandis que la structure exacte de ce domaine reste spéculative, l'analyse bio-informatique de ces séquences prédit que ces tonneaux sont formés d'environ 14 feuillets β antiparallèles constitués de 9 à 12 résidus. Par analogie au mécanisme de biogenèse des porines, le modèle actuel propose que l'intermédiaire périplasmique s'insère de manière spontanée dans la membrane externe en se repliant en tonneau β lors de son interaction avec l'environnement hydrophobe de la membrane (9). De récents travaux effectués avec PhoE et OmpA, des protéines de la membrane externe ayant une structure en tonneau β , ont montré que les lipopolysaccharides (LPS) et que la chaperone périplasmique Skp assistent le repliement de ces protéines lors de leur insertion dans la membrane externe (16). Ce mécanisme est probablement impliqué dans le repliement d'un grand nombre de protéines membranaires du même type.

Le modèle original de translocation du domaine passager propose que la protéine dépliée transite au travers du pore hydrophile monomérique formé par le tonneau β (8). À partir de l'étude du domaine β de IgA1, il a été proposé que le domaine passager était en fait sécrété au travers d'un pore membranaire formé par une structure oligomérique constituée d'au moins six tonneaux β (17). La taille de ce pore semble compatible avec la sécrétion de protéines sous leur forme repliée. Chez un certain nombre d'auto-transporteurs, notamment BrkA, IgA1 ou encore IcsA, un domaine chaperon a été identifié dans la région C-terminale du domaine passager (15). Ce domaine est essentiel pour le repliement correct de la protéine sous sa forme active.

Le modèle de translocation proposé à l'issue de cette étude est que le domaine passager reste déplié, ou très partiellement replié, lors de son transit au travers du pore transmembranaire. Le repliement s'effectue en surface de la membrane externe et vectoriellement dans la direction C-terminale du polypeptide à mesure que celui-ci émerge du pore. En plus du domaine β l'autre caractéristique essentielle à la translocation du domaine passager est la présence de la région en hélice α reliant le domaine passager au tonneau β (10). Cette région reliante serait impliquée dans la formation d'une structure en épingle à cheveux guidant la sécrétion du domaine passager au travers du tonneau β (9).

Les connaissances concernant l'énergie nécessaire à la translocation des protéines au travers des membranes biologiques résultent essentiellement des études effectuées au niveau de la membrane cytoplasmique.

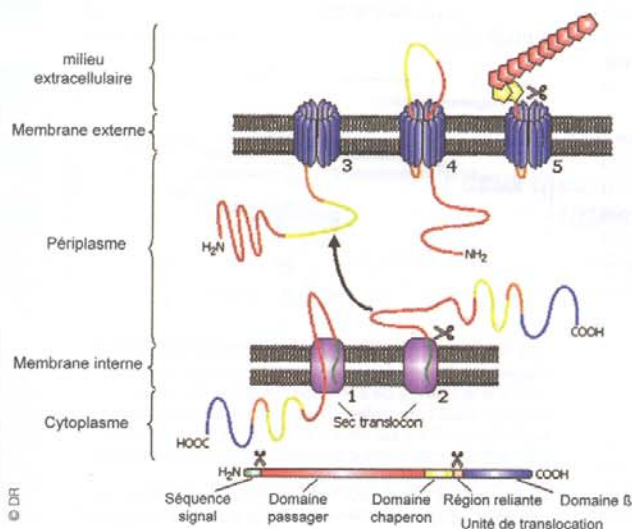


Schéma de sécrétion d'un auto-transporteur

1) Le polypeptide est synthétisé et exporté à travers la membrane interne par le système Sec. 2) Une fois dans le périplasm, l'intermédiaire périplasmique débarrassé de sa séquence signal se dirige vers la membrane externe. 3) Le domaine β s'insère alors dans la membrane externe sous la conformation d'un tonneau β . 4) La formation de ce pore membranaire permet la translocation, guidée par la région reliante, du domaine passager. 5) En surface de la membrane externe, le domaine chaperon déclenche le repliement du domaine passager à mesure que celui-ci émerge du pore. Une fois sécrété, le domaine passager peut alors rester exposé en surface de la bactérie ou être clivé soit par un processus autocatalytique soit par des protéases. Une fois clivé le domaine passager peut être relargué dans le milieu extracellulaire ou bien rester en contact avec la surface cellulaire par des interactions non covalentes avec le domaine β . Les polygones symbolisent la protéine repliée. Les ciseaux symbolisent les sites de clivage.

travers la membrane interne implique le facteur SRP mais que SecB peut compenser, dans certaines limites, l'absence de SRP (13). En permettant une translocation co-traductionnelle, l'exportation selon la voie SRP-dépendante pourrait limiter la dégradation ou le repliement prématuré de la protéine dans le cytoplasme. Le statut de l'intermédiaire périplasmique reste à l'heure actuelle un sujet de controverse. En utilisant un système rapporteur dans lequel le domaine passager de l'auto-transporteur IgA1 était remplacé par la chaîne légère d'un anticorps, il a été montré que le repliement du domaine passager prenait place dans le périplasm, ou du moins en même temps que sa translocation à travers la membrane externe (14). Cependant, une étude sur BrkA, un auto-transporteur de *Bordetella pertussis*, a révélé la présence d'un domaine chaperon

Cependant, contrairement au cytoplasme, dans le périplasma ni l'hydrolyse d'ATP ni la force proton motrice ne semblent intervenir pour fournir l'énergie nécessaire à la translocation au travers de la membrane externe. À partir de ce constat, il a été supposé, mais non vérifié, que l'énergie libre de repliement du domaine passager était la force motrice permettant la translocation au travers de la membrane externe. L'étude de Veiga *et al.* (14) s'est opposée à cette hypothèse. Cependant, cette série d'expériences est basée sur l'étude d'un domaine passager hétérologue qui ne possède pas le domaine chaperon intramoléculeire de IgA1. Aussi un mécanisme de translocation assisté par ce domaine et accompagnant le repliement de la protéine ne peut pas être complètement exclu (15).

La maturation au niveau de la membrane externe

Une fois à la surface de la bactérie, le clivage entre le domaine passager et l'unité de translocation peut se produire en amont ou dans la région reliante (10). Une fois clivé, le domaine passager peut soit être relargué dans le milieu extracellulaire, où il peut subir d'autres modifications comme IgA1, soit rester en contact avec la membrane externe comme BrkA. Le clivage du domaine passager est le résultat soit d'une activité autocatalytique soit d'une protéase membranaire. Cependant ces deux systèmes ne sont pas exclusifs l'un de l'autre puisque que pour SepA, un autotransporteur de *Shigella flexneri*, des protéases permettent le clivage du domaine passager en l'absence de l'activité de clivage autocatalytique. Chez Hap, un autre autotransporteur de *Haemophilus influenzae*, plusieurs sites de clivage alternatifs sont présents ce qui suggère l'intervention de plusieurs protéases de spécificités différentes. Enfin, comme c'est le cas pour Hia, un autotransporteur de *Haemophilus influenzae*, le domaine passager n'est pas nécessairement clivé mais peut rester associé à l'unité de translocation, la partie N-terminale de la protéine étant alors exposée dans le milieu extracellulaire.

La voie de sécrétion à deux partenaires

Contrairement aux autotransporteurs où la protéine est synthétisée sous la forme d'un seul polypeptide, le domaine passager et le domaine β des protéines de la voie de sécrétion à deux partenaires, appelée voie TPS, sont traduits à partir de deux phases ouvertes de lecture généralement organisées en opéron (18). La protéine correspondant au domaine passager est appelée l'exoprotéine ou génériquement TpsA, tandis que la protéine formant le pore en tonneau β est appelée domaine transporteur ou TpsB. En dépit de certaines différences, la voie de sécrétion à deux partenaires partage des caractéristiques fondamentales avec la voie de sécrétion des autotransporteurs. Ainsi, en plus du mode de transport impliquant le translocon Sec au niveau de la membrane interne et un pore en tonneau β lors de la translocation au travers de la membrane externe, les protéines TpsA possèdent un domaine chaperon intramoléculeire et une séquence signal très conservée, semblable aux séquences signal particulièrement longues des autotransporteurs (19).

Par ailleurs, l'analyse bioinformatique des séquences d'autotransporteurs, de TpsA et de TpsB a montré que des événements de recombinaison se sont produits au cours de l'évolution entre ces différents domaines. Il reste cependant difficile de trancher entre une

évolution convergente ou divergente de ces voies de sécrétion. Ces deux voies sont à présent regroupées sous le nom de voie de sécrétion de type V, les autotransporteurs appartenant au sous-groupe de type V₁ et les protéines de la voie de sécrétion à deux partenaires au sous-groupe de type V₂.

La fonction des protéines sécrétées par la voie de type V

Toutes les protéines sécrétées par la voie de type V ont une fonction associée avec la virulence de la bactérie. Le domaine passager, qui est le domaine impliqué dans la fonction de virulence des autotransporteurs, peut (20) :

- permettre l'adhésion de la bactérie à une cellule hôte, souvent la première étape de l'infection ;
- présenter une activité catalytique (protéase, lipase, peptidase, estérase) ;
- agir comme un médiateur de mobilité ;
- avoir un rôle de toxine ou de cytotoxine ;
- avoir un rôle immunomodulateur ;
- permettre la maturation d'un autre facteur de virulence.

Les protéines TpsA jouent quant à elles un rôle tout aussi important dans la virulence, puisque ces protéines peuvent être des adhésines, des protéines impliquées dans la séquestration du fer (hémopexines), des facteurs antigéniques ou encore des hémolysines/cytolysines (18).

Les applications en biotechnologie

Comme tout système de sécrétion, le système de type V ouvre la possibilité d'exprimer des protéines directement dans le milieu extracellulaire. Puisque la variété de protéines sécrétées dans le surnageant de culture est bien plus faible que dans le cytoplasme, la purification de ces protéines sous leur forme native est d'autant plus aisée. La caractéristique supplémentaire offerte par la voie de sécrétion des autotransporteurs est que ces protéines peuvent aussi être exposées en surface de la cellule bactérienne. Ceci ouvre la voie à un grand nombre d'applications :

- l'exposition d'antigènes pour le développement de vaccin ;
- l'expression de banques de peptides pour la cartographie d'épitopes ou pour tester la spécificité d'anticorps ;
- l'exposition de récepteurs ou de ligands pour la purification de protéines ou la bioadsorption de molécules ;
- la bioconversion suite à l'expression d'une activité enzymatique en surface de la bactérie.

Les exemples précédents donnent une idée du potentiel offert par cette voie de sécrétion mais ne sauraient être exhaustifs. À l'heure actuelle, l'une des limitations de ce système réside dans la prédiction de la capacité d'un domaine passager hétérologue à être sécrété vers le milieu extracellulaire (9). Ces considérations moléculaires seront éclaircies par l'étude plus poussée de la translocation tant au niveau de la membrane interne que de la membrane externe. La résolution de la structure tridimensionnelle du domaine β des autotransporteurs, dont les caractéristiques structurales sont pour le moment toujours au stade de l'hypothèse, sera sans aucun doute la prochaine avancée significative de la compréhension du mécanisme de sécrétion de protéines par la voie de type V. ●

(13) R. Sijbrandi *et al.* (2003). *J. Biol. Chem.* 278, 4654-4659.

(14) E. Veiga *et al.* (1999). *Mol. Microbiol.* 33, 1232-1243.

(15) D.C. Oliver *et al.* (2003). *Mol. Microbiol.* 47, 1367-1383.

(16) P.V. Bulleris *et al.* (2003). *J. Biol. Chem.* 278, 9092-9099.

(17) E. Veiga *et al.* (2002). *EMBO J.* 21, 2122-2131.

(18) F. Jacob-Dubuisson *et al.* (2001). *Mol. Microbiol.* 40, 306-313.

(19) I.R. Henderson *et al.* (2000). *Trends Microbiol.* 8, 529-532.

(20) I.R. Henderson and J.P. Nataro (2001). *Infect. Immun.* 69, 1231-1243.