

La machinerie de sécrétion de type II Xcp de pseudomonas aeruginosa

Badreddine Douzi

▶ **To cite this version:**

Badreddine Douzi. La machinerie de sécrétion de type II Xcp de pseudomonas aeruginosa : Relations structure-fonction et interactome. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Provence, 2011. Français. NNT : . tel-02806009

HAL Id: tel-02806009
https://hal.inrae.fr/tel-02806009

Submitted on 6 Jun 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.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

Université de Provence (Aix-Marseille I)

Ecode Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse de Doctorat

spécialité

Bioinformatique, Biochimie Structurale et Génomique

présentée par

Badreddine DOUZI

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Provence

La machinerie de sécrétion de type II Xcp de *Pseudomonas aeruginosa* : relations structure-fonction et interactome

Soutenue le 28 octobre 2011

Composition du jury :

Pr. Chantal TARDIF (Examinateur)

Dr. Isabelle SCHALK (Rapporteur)

Pr. Gabriel WAKSMAN (Rapporteur)

Pr. Alain FILLOUX (Examinateur)

Dr. Christian CAMBILLAU (Examinateur)

Dr. Mariella TEGONI (Co-directeur de thèse)

Dr. Romé VOULHOUX (Directeur de thèse)

Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques.
UMR 6098, CNRS. Case 932, 163 avenue de Luminy. 13288 Marseille Cedex 09

Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires.
UPR 9027, IMM-CNRS. 31 chemin Joseph Aiguier. 13402 Marseille Cedex 20

A mes parents, sans eux je ne serais jamais devenu ce que je suis aujourd'hui

A ma chère femme, pour tout l'amour qu'elle me témoigne chaque jour

A mes chères sœurs pour leur soutien de tous les instants

Qu'ils reçoivent en retour toute ma reconnaissance et l'expression de ma profonde affection

Remerciements

Comme le veut la tradition, je vais tenter de satisfaire au difficile exercice de la page des remerciements, peut-être la tâche la plus ardue de ces années de thèse. Non qu'exprimer ma gratitude envers les personnes en qui j'ai trouvé un soutien soit contre ma nature, bien au contraire. La difficulté tient plutôt dans le fait de n'oublier personne. C'est pourquoi, je remercie par avance ceux dont le nom n'apparaît pas dans cette page et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre. Ils se reconnaîtront. Pour les autres, ils se reconnaîtront aussi...

Je remercie vivement les membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail. Merci au Pr. ***Chantal TARDIF****, de l'Université de la Provence, d'avoir accepté d'en présider le jury, au Dr.* ***Isabelle SCHALK*** *et au Pr.* ***Gabriel WAKSMAN*** *d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit et aux Drs.* ***Alain FILLOUX*** *et* ***Christian CAMBILLAU*** *d'avoir examiné mon mémoire, de faire partie du jury de ma thèse, mais aussi pour m'avoir aidé à réaliser ce travail au travers de collaborations.*

J'exprime toute ma reconnaissance au Dr. ***Romé VOULHOUX****, mon directeur de thèse, qui m'a accueilli dans son unité de recherche, m'a accordé sa confiance et a su me faire bénéficier de sa vaste culture scientifique et sa grande capacité à gérer les sujets de recherche dont il est responsable. Je le remercie pour m'avoir guidé, encouragé, conseillé, tout en me laissant une grande liberté et en me faisant l'honneur de me déléguer plusieurs responsabilités dont j'espère avoir été à la hauteur.*

Je tiens à remercier chaleureusement Dr. ***Mariella TEGONI*** *qui a codirigé mes travaux et qui m'a appris le sens de la patience et de la rigueur scientifique. Je la remercie vivement pour tous les moyens qu'elle a su mettre à ma disposition pour assurer de bonnes conditions de travail dans une excellente ambiance.*

Je tiens à exprimer mon profond respect et gratitude à l'égard du Dr. ***Christian CAMBILLAU*** *qui m'a accueillit dans son groupe et qui m'a accordé sa confiance.*

Je ne saurais oublier tous ceux qui, de près ou de loin, par leur compétence, leur aide technique et leurs conseils ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je remercie également Dr. ***Hervé DARBON****, mon ancien « chef » pour m'avoir offert l'opportunité de vivre cette aventure marseillaise très enrichissante tant sur le plan professionnel que personnel.*

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe de transport moléculaire et signalisation, ***Stéphanie****,* ***Silvia****,* ***Catarina, Maria, Aline, Cecilia, Estelle, Miguel, Nicolas, Eric, David****, pour leur gentillesse et leur amitié qui n'a cessé de croître au fil des années.*

Je remercie l'ensemble des membres de l'unité des systèmes de sécrétion et pathogénicité chez P. aeruginosa, ***Bérengère****,* ***Geneviève, Chantal, Aurèlie, Gérard, Thibault, Frédéric, Steves*** *pour leur gentillesse et leur accueil dans l'équipe.*

Je remercie sincèrement ***Sophie de BLEVES*** *pour sa disponibilité et pour les discussions scientifiques fructueuses qu'on a eu ensemble.*

Je remercie particulièrement ***Kaouthar, Sébastien, Cyril, Stéphane et Cédric*** *mes compatriotes du bureau pendant deux années pour leur amitié et leur gentillesse.*

Au-delà des murs de l'AFMB, je remercie les membres du laboratoire EIPL pour leur amitié.

Je remercie tous mes amis, ***Aymen, Zouhair, Rached, Wagdi, Zied, Abdeljabar, Oussama, Loïc, Johny, David, Clément, Mohamed, Hana*** *qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans les moments difficiles.*

Je tiens à remercier ma famille pour sa patience et son appui sans faille tout au long de mes études, tant sur le plan moral, affectif que matériel. Ce travail leur doit beaucoup…

Je remercie enfin ma chère femme qui m'a soutenu jusqu'au bout. Que ce travail soit pour toi le témoignage de mon infinie reconnaissance pour ces années de compréhension et d'efforts communs.

Table des matières

Introduction **1**

Chapitre I : La voie de sécrétion de type II **3**

I. 1. Nomenclature 3

I. 2. Organisation génétique 3

I. 3. La sécrétion par la voie de sécrétion de type II 4

I. 3. 1. Première étape : export à travers la membrane cytoplasmique 4

I. 3. 1. 1. La machinerie Sec 5

I. 3. 1. 2. La machinerie Tat 6

I. 3. 2. Deuxième étape de sécrétion : reconnaissance et transport des exoprotéines par le sécréton 6

I. 3. 2. 1. Reconnaissance des exoprotéines par le sécréton 7

I. 3. 2. 2. Transport des exoprotéines par le sécréton 8

Chapitre II : La machinerie de sécrétion de type II : relations structure-fonction et réseaux d'interactions **9**

II. 1. Le pore de sécrétion : la sécrétine GspD 9

II. 1. 1. Le domaine « N » 10

II. 1. 2. Le domaine « C » 13

II. 1. 3. Structure de la sécrétine GspD 14

II. 1. 4. Les pilotines 15

II. 1. 5. Interaction de la sécrétine avec les exoprotéines dans le SST2 16

II. 2. La protéine trans-périplasmique GspC 18

II. 2. 1. Le domaine transmembranaire (TM) 18

II. 2. 2. Le domaine TM/HR 19

II. 2. 3. Le domaine HR 20

II. 2. 4. Les domaines PDZ et coiled-coil 21

II. 2. 5. Interaction de GspC avec le pore de sécrétion 23

II. 3. La plateforme de la membrane interne 25

II. 3. 1. La protéine GspF 25

II. 3. 2. La protéine GspM 28

II. 3. 3. La protéine GspL 29

II. 3. 4. La protéine GspE : 32

II. 3. 5. Analyse du réseau d'interactions entre les protéines de la plateforme de membrane interne 38

II. 3. 5. 1. Interaction entre les domaines cytoplasmiques : GspE-GspL-GspF 38
II. 3. 5. 2. Interaction entre les domaines périplasmiques : GspL-GspM-GspC 41
II. 4. Connexion de la plateforme de la membrane interne au pore de sécrétion 43
II. 5. Modèle intermédiaire d'assemblage du sécréton 44
II. 6. Le Pseudopilus : Le piston de la machinerie 46
II. 6. 1. Maturation des pseudopilines et des pilines 46
II. 6. 2. Les pili de type IV 47
II. 6. 3. Formation du pseudopilus et de l'hyper-pseudopilus (HPP) 50
II. 6. 4. La pseudopiline majeure GspG 51
II. 6. 4. 1. Etude structurale de GspG 51
II. 6. 4. 2. Modèle d'assemblage de GspG en pseudopilus 54
II. 6. 5. Les pseudopilines mineures GspH, GspI, GspJ, GspK 55
II. 6. 5. 1. Structure de GspH 56
II. 6. 5. 2. Structure de GspI-GspJ 58
II. 6. 5. 2. 1. Structure de EpsI 58
II. 6. 5. 2. 2. Structure de EpsJ 59
II. 6. 5. 2. 3. Structure de l'hétérodimère EspI-J 60
II. 6. 5. 3. Structure du complexe GspI-J-K 62
II. 6. 5. 4. Modèle d'assemblage des pseudopilines mineures dans le pseudopilus 64
II. 6. 6. Interaction entre le pseudopilus et les autres composants du sécréton 65
II. 7. Schémas récapitulatifs des réseaux d'interactions au sein du sécréton 66
II. 7. 1. Réseau d'interactions au sein de chaque sous-complexe 66
II. 7. 1. 1. Le pseudopilus 66
II. 7. 1. 2. Le sous-complexe GspC-GspD-substrat 66
II. 7. 1. 3. La plateforme de membrane interne 67
II. 7. 2. Interactions entre les sous-complexes du sécréton 68

Résultats & discussion 70

Chapitre I : Etudes structurale et biochimique des pseudopilines Xcp de *Pseudomonas aeruginosa* : vers une compréhension du mode d'assemblage et du rôle du pseudopilus **70**
I. 1. Identification d'un complexe quaternaire situé au sommet du pseudopilus 70
I. 2. Caractérisation structurale et fonctionnelle de la pseudopiline mineure $XcpW_J$ 75
I. 3. Validation de l'association séquentielle des pseudopilines mineures par RMN 77
I. 4. Caractérisation biochimique et structurale du complexe quaternaire $XcpU_H$-V_I-W_J-X_K 79
I. 5. Caractérisation structurale de la pseudopiline majeure $XcpT_G$ 84

Chapitre II : Etude du réseau d'interaction entre les domaines périplasmiques des composants du sécréton Xcp et ses substrats : vers une meilleure compréhension du mode de fonctionnement du sécréton **87**

Conclusions et perspectives **89**

Références bibliographiques **94**

Avant-propos

Afin d'obtenir le diplôme d'ingénieur en génie biologique, j'ai effectué mon projet de fin d'études dans le laboratoire de génétique enzymatique et de microbiologie (LGEM) à l'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax (ENIS). Grâce à ce stage de 6 mois, j'ai découvert ma passion pour la recherche. J'ai ensuite poursuivi ma carrière de recherche à l'ENIS par un master en biotechnologie. Après 6 mois de formation théorique, j'ai quitté la Tunisie en 2006 pour effectuer mon stage de master dans le laboratoire Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques (AFMB) à Marseille, ce stage portait sur l'expression et la purification de toxines animales recombinantes chez *Escherichia coli*. Après l'obtention du diplôme de master « tunisien », je me suis inscrit en master 2 Sciences, mention Bioinformatique, Biochimie Structurale et Génomique (BBSG) à l'Université Aix-Marseille.

L'intégration du master BBSG a représenté pour moi l'opportunité d'initier ma formation en biologie structurale et enzymologie, formation que j'ai pu complémenter par un stage à l'AFMB sur la détermination de la structure de peptides par RMN homonucléaire. A la suite de l'obtention de mon diplôme, j'ai eu l'opportunité de poursuivre ma carrière scientifique grâce à un financement de thèse BDI (Bourse pour Doctorant Ingénieur). J'ai ainsi effectué ma thèse sur l'étude structurale et biochimique du système de sécrétion de type II. Cette thèse a été effectuée en collaboration entre le laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaire (LISM) et l'AFMB sous la direction du Dr. Romé VOULHOUX (LISM) et en codirection avec le Dr. Mariella TEGONI (AFMB).

Au cours de ma thèse, nous avons publié la majorité des résultats que nous avons obtenus, pour cette raison le manuscrit que je vous présente est une thèse sur articles articulée en une introduction bibliographique qui décrit l'état des lieux des connaissances actuelles du sujet, et une seconde partie dans laquelle je présente et discute les principaux résultats obtenus.

Liste des publications

- The XcpV/GspI pseudopilin has a central role in the assembly of a quaternary complex within the T2SS pseudopilus. (Chapitre I)

Douzi Badreddine, Durand Eric, Bernard Cédric, Alphonse Sébastien, Cambillau Christian, Filloux Alain, Tegoni Mariella, Voulhoux Romé*. *J Biol Chem*. 2009. 284(50):34580-9

- Structure of the minor pseudopilin XcpW from the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion system. (Chapitre I)

Franz Laura P., Douzi Badreddine Durand Eric, Dyer David H., Voulhoux Romé *, and Forest Katrina T. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2011. 67(Pt 2):124-30

- **Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* XcpT pseudopilin, a major component of the type II secretion system**. (Chapitre I)

Alphonse Sébastien, Durand Eric, Douzi Badreddine, Waegele Brigitte, Darbon Hervé, Filloux Alain, Voulhoux Romé, Bernard Cédric***.** *J Struct Biol.* 2010. 169(1):75.

- Deciphering the Xcp *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion machinery through multiple interactions with substrates. (Chapitre II)

Douzi Badreddine, Ball Genevieve, Cambillau Christian, Tegoni Mariella *, and Voulhoux Romé *. Soumis à *J Biol Chem*.

- The assembly mode of the pseudopilus: a hallmark to distinguish a novel secretion system subtype. (Annexes)

Durand Eric, Alphonse Sébastien, Brochier-Armanet Cécile, Ball Geneviève, Douzi Badreddine, Filloux Alain, Bernard Cédric, Voulhoux Romé. *J Biol Chem*. 2011. 286(27):24407-16.

- **D-maurocalcine, a pharmacologically-inert efficient cell penetrating peptide analogue.** (Annexes).

Poillot Cathy, Dridi Kaouthar, Bichraoui Hicham, Pecher Julien, Alphonse Sébastien, Douzi Badreddine, Ronjat Michel, Darbon Hervé, De Waard Michel. *J Biol Chem*, 2010. 285(44):34168-80

- A new system for expressing recombinant animal toxins in *E. coli*. (Annexes)

Douzi Badreddine, Geerlof Arie, Darbon Hervé, Gilles Nicolas, Marchot Pascale, Vincentelli Renaud. E-book paper: Advances and new technologies in Toxinology -Société Française pour l'étude des Toxines (SFET). 18th Meeting on toxinology (2011).

Introduction

Introduction

Les bactéries à Gram-négatif sont entourées par une enveloppe cellulaire qui, contrairement aux bactéries à Gram-positif, possède une organisation membranaire complexe. En effet, elle est composée d'une membrane interne appelée généralement membrane cytoplasmique, un espace périplasmique contenant une matrice de peptidoglycane et une membrane externe asymétrique constituée d'une monocouche de phospholipides surmontée d'une assise de lipopolysaccharides (LPS).

Afin de franchir cette barrière, les bactéries à Gram-négatif ont développé différents mécanismes de sécrétion sophistiqués dédiés à l'export des exoprotéines (enzymes, toxines) du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire voire jusqu'à l'intérieur de la cellule cible. Jusqu'à présent, six systèmes de sécrétion ont été identifiés chez ces bactéries. Ces systèmes de sécrétion sont divisés en deux groupes selon les étapes de cheminement des exoprotéines à travers l'enveloppe cellulaire : les systèmes de sécrétion en une étape représentés par les types I, II, III IV et VI et les systèmes de sécrétion en deux étapes représentés par les types II et V. Le premier groupe permet le transport des exoprotéines directement du cytoplasme vers le milieu extracellulaire en une seule étape et sans transit dans l'espace périplasmique. Par contre, dans le deuxième groupe, les exoprotéines sont d'abord exportées à travers la membrane interne du cytoplasme vers le périplasme. Une fois dans le périplasme, elles sont prises en charge par les systèmes de sécrétion spécifiques afin d'êtres transloquées du périplasme vers le milieu extracellulaire.

Le système de sécrétion de type II (SST2) constitue un des systèmes les plus complexes. Il joue un rôle essentiel dans la pathogénicité des bactéries à Gram-négatif puisqu'il permet la sécrétion, dans l'environnement extracellulaire, d'un arsenal important de toxines et d'enzymes dégradatives. Dans la voie de sécrétion de type II, les exoprotéines franchissent la membrane cytoplasmique grâce aux systèmes Sec et Tat. Une fois dans le périplasme, ces exoprotéines sont spécifiquement prises en charge par un large complexe protéique membranaire appelé le sécréton qui assure leur passage dans le milieu extracellulaire.

Le sécréton est composé de 12 à 15 protéines selon les espèces bactériennes. Il est organisé en 3 sous-complexes protéiques : 1) le pore de sécrétion localisé dans la membrane externe qui permet le passage des exoprotéines vers le milieu extracellulaire, 2) la plateforme de membrane interne qui contient en plus des protéines ancrées dans la membrane cytoplasmique, une ATPase, localisée dans le cytoplasme, qui permet de fournir l'énergie nécessaire au sécréton

et enfin 3) le pseudopilus, une fibre protéique, formée par l'assemblage de pseudopilines en une structure hélicoïdale. Le pseudopilus est supposé agir comme un piston afin de pousser les exoprotéines à travers le pore de sécrétion vers le milieu extracellulaire.

Malgré une connaissance approfondie des constituants de la machinerie de sécrétion de type II, le mécanisme de sélection des exoprotéines périplasmiques par le sécréton ainsi que son mode de fonctionnement restent certainement encore très mal connus.

L'objectif de mes travaux de thèse était en premier lieu d'étudier le pseudopilus et les pseudopilines du sécréton Xcp de *Pseudomonas aeruginosa* sur le plan structural et biochimique. La mise en évidence du réseau d'interactions entre les pseudopilines ainsi que les différentes études structurales que nous avons réalisées ont permis de mieux comprendre le mode d'insertion des pseudopilines mineures dans le pseudopilus durant l'étape d'assemblage. Nous avons ainsi proposé un modèle d'assemblage séquentiel des pseudopilines durant l'étape de biogenèse du pseudopilus.

Dans une deuxième partie de ma thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude du réseau d'interaction des composants périplasmiques du sécréton avec les exoprotéines sécrétées afin de comprendre le mode de fonctionnement de la machinerie. Les résultats obtenus ont révélé pour la première fois l'existence de plusieurs partenaires capables d'interagir spécifiquement avec les exoprotéines. L'ensemble des interactions obtenues nous a permis de proposer un modèle des différentes étapes du cheminement des exoprotéines dans le sécréton au cours du processus de sécréton.

Chapitre I

Bibliographie

Chapitre I : La voie de sécrétion de type II

La voie de sécrétion de type II (VST2) est un processus divisé en deux étapes successives durant lesquelles les exoprotéines sont exportées, à travers la membrane cytoplasmique, via les machineries Sec ou Tat. Une fois dans l'espace périplasmique, les exoprotéines sont expulsées vers le milieu extracellulaire par le système de sécrétion de type II (SST2) ou sécréton.

I. 1. Nomenclature

Le SST2 a été découvert chez *Klebsiella pneumoniae* (d'Enfert *et al.*, 1987). Dans cette bactérie, le SST2 est indispensable à la sécrétion de la pullulanase PulA, une lipoprotéine hydrolysant l'amidon, d'ou son appellation : SST2 « Pul ». Depuis, plusieurs SST2 ont été identifiés chez plusieurs autres bactéries. Dès lors, chaque système de sécrétion porte un nom spécifique qui dépend de la bactérie dans laquelle il a été identifié : Pul pour *K. oxytoca* (Pugsley *et al.*, 1997), Eps pour *Vibrio cholerae* (Sandkvist *et al.*, 1997) Xcp pour *P. aeruginosa* (Wretlind and Pavlovskis, 1984), Out pour *Erwinia chrysanthemi* appelée dorénavant *Dikeya dadantii* (Lindeberg and Collmer, 1992), Xps pour *Xanthomonas campestris* (de Groot *et al.*, 1991) ou Exe pour *Aeromonas hydrophila* (Howard *et al.*, 1993).

La nomenclature des gènes et de leurs produits suit alors la règle suivante : le nom du système suivi d'une lettre correspondant à la protéine d'intérêt (exemple : la protéine Q du SST2 Xcp de *P. aeruginosa* est notée XcpQ). Cependant, afin de simplifier la comparaison de ces systèmes, l'appellation GSP « *General Secretion Pathway* » est également utilisée pour nommer tous les SST2. De plus, selon les bactéries étudiées, des protéines homologues ont été désignées par des lettres différentes, par exemple dans le cas de la protéine XcpQ, son homologue chez *K. oxytoca* est nommé PulD.

Par conséquent, et par souci de clarté, pour chaque gène ou protéine portant la nomenclature de type « *Pseudomonas* », nous avons choisi de rajouter en indice la lettre correspondant à la nomenclature utilisée pour tous les autres systèmes. Par exemple la protéine GspD est nommée $XcpQ_D$ pour *P. aeruginosa* et PulD pour *K. oxytoca*.

I. 2. Organisation génétique

Les SST2 sont codés par 12 à 15 gènes *gsp*. Ces gènes sont organisés en un ou plusieurs opérons. Les gènes *gsp* ont été identifiés dans de nombreuses bactéries et se sont avérés largement conservés chez les bactéries à Gram-négatif (Filloux *et al.*, 1990; Cianciotto, 2005).

Parmi ces bactéries, on peut citer *K. oxytoca, P. aeruginosa*, *V. cholerae, E. chrysanthemi, Escherichia coli* et *X. campestris* (figure 1) qui ont fait l'objet de la majorité des études structurales et biochimiques de la machinerie.

Malgré cette conservation, les clusters *gsp* présentent quelques différences selon les organismes puisque certains composants ne sont pas retrouvés dans tous les systèmes. Par exemple, les gènes *pulN*, *pulB* et *pulS* de *K. oxytoca* n'existent pas dans le système Xcp de *P. aeruginosa* (D'Enfert and Pugsley, 1989; Pugsley *et al.*, 1990). La fonction de certains de ces gènes reste à démontrer puisque les protéines correspondantes PulB et PulN ne sont pas essentielles à la sécrétion (Possot *et al.*, 2000).

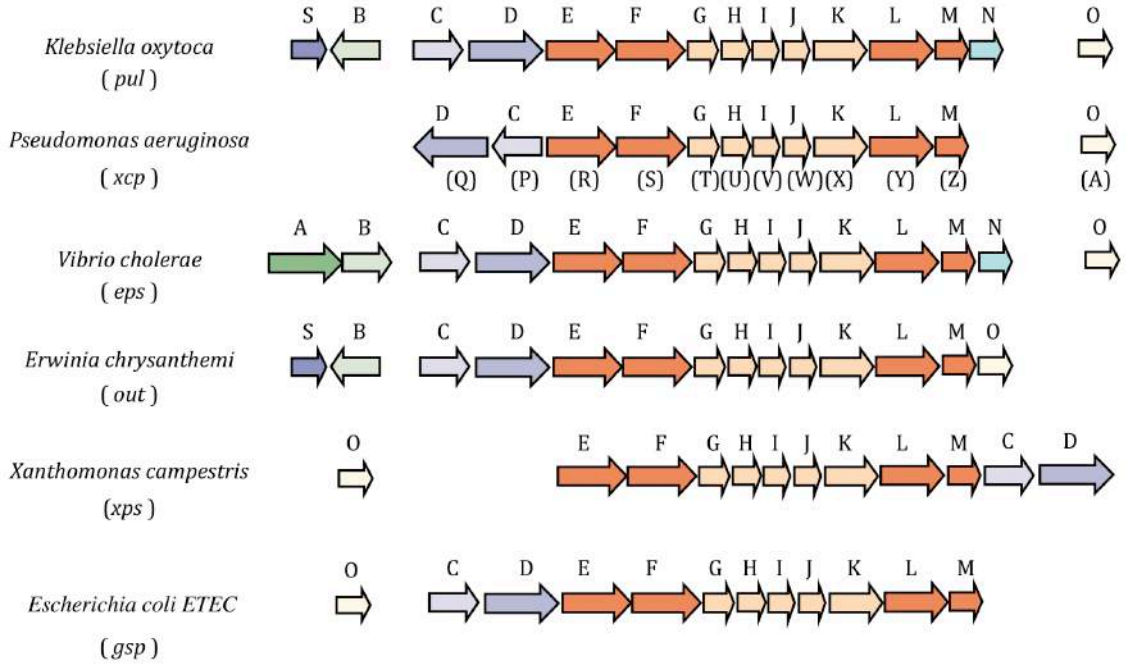


Figure 1 : Organisation génétique des *SST2* des bactéries à Gram-négatif ayant fait l'objet des principales études sur le sécréton SST2. Les gènes *gsp* sont représentés avec un code couleur indiquant le sous-complexe auquel appartient la protéine correspondante.

I. 3. La sécrétion par la voie de sécrétion de type II

I. 3. 1. Première étape : export à travers la membrane cytoplasmique

Chez les bactéries à Gram-négatif, il existe deux voies principales pour l'export des protéines à travers la membrane cytoplasmique : la voie Sec et la voie Tat. Ces deux voies se différencient essentiellement par l'état dans lequel le polypeptide est transporté. En effet, la

machinerie Sec prend en charge uniquement les protéines non repliées. Dans ce cas, le repliement de ces protéines aura lieu dans l'espace périplasmique avant l'étape finale de sécrétion (Osborne *et al.*, 2005). La voie Tat, au contraire de la voie Sec, prend en charge les polypeptides repliés (Berks *et al.*, 2005; Palmer *et al.*, 2005). Ces deux systèmes permettent l'export d'un grand nombre de protéines dans le périplasme dont seulement une faible proportion sera finalement sécrétée par les machineries de sécrétion de type II ou V.

I. 3. 1. 1. La machinerie Sec

La machinerie Sec appelée aussi la translocase Sec, représente la voie principale pour le transport des protéines à travers la membrane cytoplasmique (Bassford *et al.*, 1991). Elle est également appelée la voie générale d'export (VGE). La translocase Sec est constituée du complexe SecYEG qui forme le canal à travers lequel cheminent les protéines et d'un constituant annexe, SecA, qui permet de fournir l'énergie nécessaire au processus de translocation. En plus de ces composants, d'autres protéines telles que SecB et SRP « *signal recognition particle* » peuvent intervenir afin d'assurer l'adressage des protéines vers la translocase (Wickner *et al.*, 1991).

La machinerie Sec est un système qui permet de reconnaître spécifiquement les protéines nouvellement synthétisées pour qu'elles puissent emprunter cette voie. Ces protéines comportent un peptide signal à leur extrémité N-terminale. Ce peptide signal, composé de 20 à 30 résidus, est une courte séquence divisée en 3 régions: une région N chargée positivement, un domaine central hydrophobe appelé région H et une région C-terminale riche en résidus polaires. Le domaine C contient le site de clivage de la peptidase signal de type I qui reconnaît le motif « AXA » et qui le clive après la deuxième alanine A_{-1} (Tuteja, 2005). Dans le cas particulier des lipoprotéines, le domaine C contient le motif «LXXC» qui constitue le site de clivage de la peptidase de type II qui coupe avant la cystéine.

Malgré l'organisation générale du peptide signal en 3 régions, sa séquence primaire n'est cependant pas très conservée. Toutefois, chaque domaine semble s'organiser selon un motif structural conservé. Ainsi, la région N-terminale adopte une repliement en hélice α et le domaine C-terminal peut s'architecturer en feuillet β (Driessen and Nouwen, 2008). La reconnaissance du peptide signal par la machinerie Sec repose non pas sur une spécificité de séquence mais sur la reconnaissance du motif structural.

I. 3. 1. 2. La machinerie Tat

Les bactéries possèdent une seconde machinerie d'export distincte de la machinerie Sec nommée Tat pour « *Twin Arginine Translocation* » (Sargent *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2000). Cette voie permet la translocation des protéines déjà repliées dans le cytoplasme. Contrairement au système Sec, qui est universel, le système Tat n'est pas présent chez toutes les bactéries.

Le système Tat d'*E. coli* est composé de 3 protéines intégrales de la membrane interne : TatA, TatB et TatC. Cependant, la présence de ces 3 protéines n'est pas conservée chez toutes les bactéries possédant un système Tat et plusieurs d'entre elles ne contiennent pas le gène codant pour TatB. Les protéines TatA et TatC suffisent alors pour l'export. Il est également possible de trouver plusieurs copies du même gène. Ainsi *Bacillus subtilis* contient deux gènes *tatC* et trois gènes *tatA*, chacun d'eux étant impliqué dans un système Tat substrat-dépendant (Jongbloed *et al.*, 2000).

TatA et TatB sont très similaires en termes de séquence primaire et de structure. Par conséquent, il est très délicat de les différencier dans certains organismes. TatC est la protéine la plus conservée du système Tat, en particulier au niveau de ses domaines transmembranaires (Buchanan *et al.*, 2002). Malgré la conservation de TatC, il semblerait que TatA soit la protéine responsable de la formation du pore de translocation. En effet, il a été montré qu'en absence de TatB et TatC, TatA est capable de former des complexes protéiques de tailles variables (de 100 à 600kDa) visibles en microscope électronique (Gohlke *et al.*, 2005).

Les protéines qui utilisent la voie Tat possèdent un peptide signal qui a la même organisation tripartite que les séquences signal de la voie Sec. Néanmoins, le peptide signal de la voie Tat possède des caractéristiques différentes : i) il est plus long que le peptide signal de la voie Sec, ii) il possède des séquences consensus conservées « S/TRRXFLK » situées à l'extrémité N-terminale de la région N, iii) le domaine H est légèrement moins hydrophobe et plus court que le domaine H de la voie Sec (Lee *et al.*, 2006). Comme dans la voie Sec, le peptide signal dans la voie Tat est clivé après la région C par la peptidase signal de type I (Tjalsma *et al.*, 2000).

I. 3. 2. Deuxième étape de sécrétion : reconnaissance et transport des exoprotéines par le sécréton

La machinerie de sécrétion de type II, appelée le sécréton, est un large complexe protéique qui traverse la totalité de l'enveloppe cellulaire (Filloux, 2004). La plupart des protéines du

sécréton sont ancrées ou associées à la membrane interne à l'exception de la sécrétine qui, comme nous le verrons plus tard, forme un pore dans la membrane externe.

I. 3. 2. 1. Reconnaissance des exoprotéines par le sécréton

Le nombre de protéines secrétées par un organisme donné *via* la machinerie de sécrétion de type II est extrêmement variable et peut aller d'une seule protéine comme dans le cas de *K. oxytoca* (Francetic and Pugsley, 2005) à une vingtaine dans le cas de *Legionella pneumophila* (DebRoy *et al.*, 2006; Cianciotto, 2009). Les exoprotéines sécrétées par cette machinerie possèdent des activités très diverses, puisque on trouve des acyltansférases, des amylases, des chitinases, des cellulases, des pectines lyases, des protéases, des lipases, des phospholipases (A et C) et des phosphatases (Michel and Voulhoux, 2009). Malgré cette diversité, les exoprotéines, une fois dans l'espace périplasmique, deviennent les substrats de SST2 qui permet de les expulser vers le milieu extracellulaire. Le mécanisme d'adressage est essentiel pour sélectionner de façon appropriée les protéines qui doivent êtres transportées vers le milieu extracellulaire via le sécréton des autres protéines périplasmiques. Afin qu'elles soient reconnues par le sécréton, les exoprotéines acquièrent certainement un motif de sécrétion qui permet leur reconnaissance par un ou plusieurs partenaires du sécréton. Ce processus de reconnaissance est néanmoins très énigmatique et certainement complexe puisque l'alignement des séquences primaires de plusieurs exoprotéines n'a révélé l'existence d'aucun motif linéaire commun pouvant constituer le signal de sécrétion. De plus, la comparaison des structures tridimensionnelles de nombreux substrats n'a pas non plus mis en évidence de motif structural commun. Cependant, Sandkvist M., a remarqué que la plupart de ces exoprotéines possèdent des régions riches en feuillet β (Sandkvist, 2001).

Par conséquent, il a été suggéré que le motif de sécrétion soit porté par la structure de l'exoprotéine sur des régions différentes. Plusieurs études confirment cette hypothèse. Chez *E. chrysanthemi*, la cellulase Cel5 est formée par 3 domaines structuralement distincts : le domaine catalytique (CD), une région linker (LR) et un domaine C-terminal de fixation à la cellulose (CBD). Il a été montré que la présence de ces 3 domaines est nécessaire à la sécrétion (Py *et al.*, 1993). L'analyse des différentes constructions obtenues à partir de PulA a permis de distinguer deux régions distinctes A et B qui permettent à elles seules la sécrétion d'une autre exo-protéine : la β-lactamase (Sauvonnet *et al.*, 1995; Sauvonnet and Pugsley, 1996). Ces deux régions sont assez éloignées sur la séquence primaire, ce qui conforte l'hypothèse de la nature du signal conformationnel.

Il est important de mentionner l'existence d'une spécificité inter-systèmes puisque, à l'exception de quelques SST2 très proches, les exoprotéines d'un système donné ne peuvent pas êtres sécrétées par un autre système. De plus, il s'agit bien d'une spécificité liée aux systèmes de sécrétion et non à la bactérie puisque au sein de la même bactérie, les exoprotéines de deux SST2 différents ne sont pas interchangeables. C'est le cas des deux SST2 de *P. aeruginosa* Xcp et Hxc (Viarre *et al.*, 2009).

I. 3. 2. 2. Transport des exoprotéines par le sécréton

Une fois dans l'espace périplasmique, les exoprotéines repliées sont reconnues par un large complexe protéique : le sécréton. Sur la base des données expérimentales, issues de localisation cellulaire et d'interactions protéine-protéine entre les composants du sécréton, il a été proposé que les protéines de cette machinerie soient organisées en 3 sous-complexes :

- **Un pore de sécrétion** : c'est un complexe homomultimérique d'une protéine appelée la sécrétine GspD. La sécrétine est formée par deux domaines structuralement distincts : i) le domaine N-terminal localisé dans le périplasme et impliqué dans des interactions avec d'autres partenaires de la machinerie ainsi que dans la reconnaissance des exoprotéines ii) le domaine C-terminal ancré dans la membrane externe formant ainsi un canal qui permet la libération des exoprotéines vers le milieu extracellulaire.
- **La plateforme de membrane interne** : il s'agit d'un large complexe protéique hétéromultimèrique constitué des quatre protéines GspF, GspM, GspL, GspE. GspE est une ATPase de trafic qui permet l'énergisation du système.
- **GspC** : c'est une protéine ancrée à la membrane cytoplasmique et majoritairement localisée dans l'espace périplasmique. Elle permet de relier la sécrétine à la plateforme de membrane interne.
- **Le pseudopilus** : il est constitué de 5 protéines appelées GspG, GspI, GspH, GspJ et GspK. Ces protéines s'assemblent afin de former une fibre protéique appelée le « pseudopilus ». Il a été proposé que le pseudopilus traverse l'espace périplasmique pour pousser tel un piston les exoprotéines à travers le pore de sécrétion vers le milieu extracellulaire.

Chapitre II

Bibliographie

Chapitre II : La machinerie de sécrétion de type II : relations structure-fonction et réseaux d'interactions

La machinerie de sécrétion de type II est un large complexe multi-protéique qui prend en charge ses substrats dans l'espace périplasmique pour les sécréter dans le milieu extracellulaire. Ce processus de sécrétion est basé sur de fines interactions entre les composants de la machinerie ce qui lui permet d'adopter une architecture capable de réaliser sa fonction biologique. Le modèle actuel de la machinerie propose une organisation en plusieurs sous-complexes structuraux : le pore de sécrétion, la plateforme de membrane interne et le pseudopilus.

II. 1. Le pore de sécrétion : la sécrétine GspD

Les sécrétines sont des complexes protéiques qui forment des pores au niveau de la membrane externe des bactéries à Gram négatif et qui permettent le passage des exoprotéines de l'espace périplasmique vers le milieu extracellulaire. Les sécrétines ont la propriété de former de larges complexes homomultimériques extrêmement stables constitués de 12 à 15 sous-unités (Kazmierczak *et al.*, 1994; Bitter *et al.*, 1998). Le poids moléculaire de chaque sous-unité varie entre 50 et 70kDa (Korotkov *et al.*, 2009b). Les sécrétines forment une superfamille que l'on retrouve dans plusieurs systèmes biologiques tel que la machinerie d'extrusion des phages filamenteux f1 (protéine pIV) (Linderoth *et al.*, 1996), le SST3 (YscC) (Koster *et al.*, 1997), la biogenèse des pili de type IV (PilQ) (Bitter *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 2001; Collins *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2005), et le SST2 (GspD) (Bitter *et al.*, 1998).

L'analyse des séquences des différentes sécrétines a conduit à l'identification de deux domaines majeurs de tailles quasi équivalentes (Guilvout *et al.*, 1999), le domaine « N » périplasmique et le domaine « C » ancré dans la membrane externe. Ces deux domaines sont structuralement distincts. En effet, le domaine « C » très conservé est indispensable à l'insertion dans la membrane externe et à la multimérisation tandis que le domaine « N », le plus variable, est responsable des interactions avec les exoprotéines et/ou les autres constituants de la machinerie (Reichow *et al.*, 2010) (figure 2). Dans certaines sécrétines, on retrouve un domaine périplasmique supplémentaire appelé domaine « S » situé en aval du domaine « C » et qui interagit avec un constituant non générique de la machinerie correspondante appelée « la pilotine » (Daefler *et al.*, 1997).

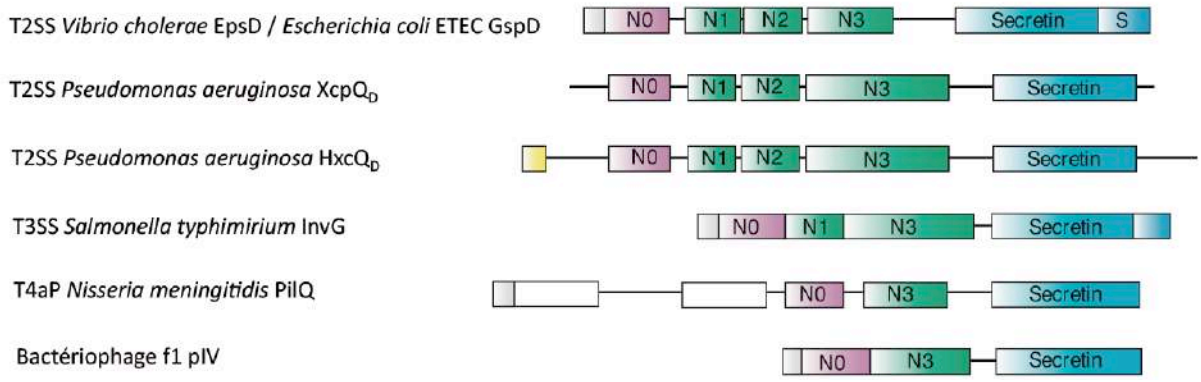


Figure 2 : Représentation schématique des différents domaines des sécrétines : Les sécrétines sont synthétisées sous forme de précurseurs avec des séquences signal N-terminales clivées par des peptidases de type I (Paetzel *et al.*, 2002) (gris) ou des peptidases de type II (Paetzel *et al.*, 2002) (jaune). Le domaine C-terminal des sécrétines est présenté en bleu. Il contient des feuillets β amphipatiques (Brok *et al.*, 1999). Le domaine N-terminal des sécrétines est composé de 4 sous-domaines N0 (violet), N1, N2 et N3 (vert). Certaines sécrétines contiennent des domaines de topologie non connue (blanc). Les domaines de liaison à la pilotine S sont indiqués en bleu. Adaptée de la revue de Korotkov *et al* (Korotkov *et al.*, 2011).

II. 1. 1. Le domaine « N »

Dans les SST2, le domaine « N » est composé de 4 sous domaines, le domaine N0 à l'extrémité N-terminale et 3 domaines « N1-like » : N1, N2 et N3 (figure 2). Les domaines N0 et N3 sont les domaines structuralement les plus conservés dans la super famille des sécrétines.

Récemment, la structure tridimensionnelle de l'extrémité N-terminale de la sécrétine GspD d'*E. coli* entérotoxigénique (ETEC) (résidus 3 à 235) a été résolue par cristallographie aux rayons X à 2,8 Å (code pdb 3EZJ) (Korotkov *et al.*, 2009b). La structure des domaines N0, N1 et N2 a révélé que l'extrémité N-terminale de la sécrétine GspD est organisée en deux lobes globulaires, composés de 11 brins β et 7 hélices α. Le lobe N-terminal est constitué des domaines N0 et N1, alors que le lobe C-terminal est composé par le domaine N2 (figure 3A). Le domaine N0 est formé par deux hélices α (α1, α2) entourées par un feuillet β à deux brins antiparallèles (β1, β3) sur une face, et un deuxième feuillet β à 3 brins antiparallèles (β2, β4, β5) sur la face opposée. Il a été suggéré que le site d'interaction avec les exoprotéines ou les composants de la machinerie de sécrétion de type 2 pourrait se localiser au niveau du domaine N0 et plus précisément au niveau du brin β2 (Korotkov *et al.*, 2009b).

La recherche d'homologues structuraux au domaine N0, montre que ce domaine ressemble aux domaines des récepteurs de la membrane externe TonB-dépendants de la

membrane externe, comme le récepteur FpvA de *P. aeruginosa* (Brillet *et al.*, 2007). En effet, la superposition du brin β de la boîte TonB « *TonB Box* » du domaine périplasmique de FpvA (code pdb 2O5P) avec le domaine N0 de la sécrétine GspD suggère un mécanisme similaire d'interaction entre le domaine N0 via son brin β2 et une autre protéine de l'espace périplasmique (exoprotéine ou protéine de la machinerie de type II) (Korotkov *et al.*, 2009b).

L'alignement des séquences des domaines N1 et N2 montre qu'ils présentent 25% d'identité de séquences. De plus, ces domaines partagent le même repliement structural constitué d'un feuillet β à 3 brins antiparallèles (β6, β7, β8 pour N1 et β9, β10, β11 pour N2) surmontés de deux hélices α (figure 3A).

La recherche d'homologues structuraux des domaines N1 et N2 a révélé qu'ils ont un repliement similaire à celui de la protéine du système de sécrétion de type III d'*E. coli* entéropathogénique (EPEC) EscJ (code pdb 1YJ7) (figure 3B) (Yip *et al.*, 2005). De façon intéressante, la protéine EscJ est localisée au niveau du périplasme où elle est responsable de la formation de l'un des anneaux constituant la plateforme de la membrane interne du SST3 (Yip *et al.*, 2005; Korotkov *et al.*, 2011).

L'étude de la structure de la sécrétine EscC du système de sécrétion de type III d'*E. coli* EPEC (code pdb 3RG5) montre que les domaines N0 et N1 présentent le même repliement que ceux de la sécrétine GspD de la machinerie de sécrétion de type II (figure 3C) (Spreter *et al.*, 2009). La différence réside au niveau de l'orientation du domaine N0 par rapport au domaine N1. Lorsqu'on superpose les deux domaines N1 de EscC et de GspD, on trouve que les domaines N0 présentent au moins 143° de rotation (Korotkov *et al.*, 2011). Cette différence structurale peut témoigner de la flexibilité des ces deux domaines durant la sécrétion d'exoprotéines ou l'assemblage de l'aiguille (Korotkov *et al.*, 2011).

Sur la base des études de microscopie électronique des sécrétines (Nouwen *et al.*, 1999; Nouwen *et al.*, 2000; Chami *et al.*, 2005) et de la structure du domaine N-terminal de la sécrétine GspD d'*E. coli* entérotoxigénique (ETEC), un modèle de complexe dodécamérique a été proposé par Korotkov *et al.* (Korotkov *et al.*, 2009b) (Figure 3D). Le modèle proposé de symétrie C12 est généré grâce au serveur SymmDock (Schneidman-Duhovny *et al.*, 2005).

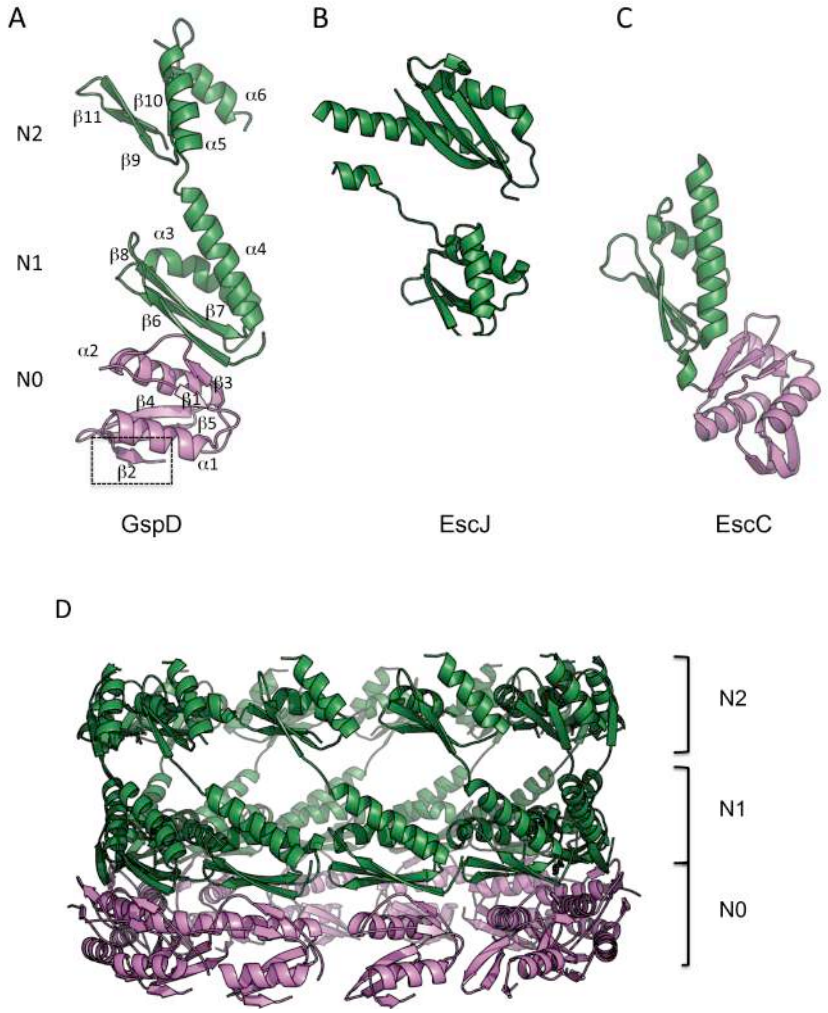


Figure 3: Structure du domaine périplasmique de GspD d'*E. coli* entérotoxigénique ETEC (code pdb 3EZJ). (A) En violet le domaine N0, en vert les domaines N1 et N2. Le brin β2 supposé interagir avec une exo-protéine et/ou une protéine de la machinerie de type II est entouré par un cadre pointillé. (B) Structure de EscJ d'*E. coli* EPEC (code pdb 1YJ7) (Yip *et al.*, 2005). (C) Structure de EscC d'*E. coli* EPEC (code pdb 3RG5) (Spreter *et al.*, 2009). (D) Modèle de l'organisation dodécamérique de GspD proposé par Korotkov *et al* (Korotkov *et al.*, 2009b) généré par SymmDock (Schneidman-Duhovny *et al.*, 2005).

Ce complexe possède un diamètre de 117Å, en accord avec les estimations de microscopie électronique (Chami *et al.*, 2005). Le diamètre interne de l'anneau formé par le domaine N0 fait approximativement 70Å, ce qui est suffisant pour accommoder et laisser passer le substrat à travers le pore de sécrétion. Un léger rétrécissement est observé au niveau de l'anneau formé par le domaine N1 de diamètre 46Å. La dimension de cet anneau semble cependant trop étroite pour faire passer les substrats. Pour cela, il a été suggéré par l'auteur que, soit le substrat se déplie de façon transitoire pour pouvoir passer à travers cet anneau, ou bien la sécrétine subit des changements conformationnels durant le processus de sécrétion afin de pouvoir accommoder les substrats (Korotkov *et al.*, 2009b).

II. 1. 2. Le domaine « C »

Le domaine C-terminal très conservé dans la famille des sécrétines (Genin and Boucher, 1994) est prédit pour être majoritairement composé de feuillets β amphipathiques (Pugsley, 1993). Il renferme un motif conservé qui constitue la signature de cette famille protéique : (V,I)PXL(S,G)XIPXXGXLF (Genin and Boucher, 1994). Le domaine « C » assure, sous forme multimérique, la fonction du pore de sécrétion. Des expériences de protéolyse par la protéinase K sur des complexes des sécrétines PulD de *K. oxytoca* et $XcpQ_D$ de *P. aeruginosa*, ont montré que le domaine C-terminal n'est pas affecté par ce traitement (Nouwen *et al.*, 2000; Chami *et al.*, 2005) . Ce domaine résistant à la protéinase K reste multimérique et garde son aptitude à former des structures en forme d'anneaux avec des dimensions similaires à celles des complexes natifs (Nouwen *et al.*, 2000). En plus des données biochimiques, des données éléctrophysiologiques montrent que les sécrétines présentent une conductance significative d'une activité de type pore (Brok *et al.*, 1999; Nouwen *et al.*, 1999).

Les seules informations structurales sur le domaine « C » sont issues de la cryo-microscopie électronique. Ces informations révèlent que les sécrétines partagent toutes des formes en anneaux avec cependant des diamètres externes ainsi qu'un nombre de sous-unités différents. Par exemple, le diamètre de la sécrétine $XcpQ_D$ est de l'ordre de 20nm (Chami *et al.*, 2005), alors qu' il est de 11nm pour PilQ, la sécrétine du système de piliation de type IV (SPT4) (Collins *et al.*, 2004).

La symétrie au niveau de l'assemblage des sécrétines semble être système dépendant (Korotkov *et al.*, 2009b). Par exemple, l'étude par microscopie électronique menée sur la sécrétine pIV responsable de l'extrusion des phages, a montré que ce pore est formé par la multimérisation de 14 sous-unités (Opalka *et al.*, 2003), alors que le pore formé par la sécrétine PilQ chez *Neisseria meningitidis*, s'organise en une structure dodécamérique (12 sous-unités) (Collins *et al.*, 2004). Chez *K. oxytoca*, la sécrétine PulD du SST2 partage aussi une symétrie de 12. La taille de la cavité centrale des sécrétines observée en microscopie électronique qui varie de 60 à 80Å de diamètre, est compatible avec le passage des phages filamenteux (65Å de diamètre), les pili de type IV (54Å de diamètre) et les protéines sécrétées par le SST2 sous une forme repliée (60Å pour l'élastase LasB de *P. aeruginosa*) (Bitter *et al.*, 1998).

II. 1. 3. Structure de la sécrétine GspD

Récemment, Reichow *et al* (Reichow *et al.*, 2010), ont déterminé par cryo-microscopie électronique, la structure de la sécrétine GspD entière du SST2 de *V. cholerae* à 19Å (figure 4). Cette reconstitution, révèle un assemblage sous forme cylindrique de 15,5nm de diamètre et 20nm de hauteur. Il a été proposé que GspD soit formée de 2 compartiments : le vestibule périplasmique composé des sous domaines N0-N1-N2-N3 et la chambre extracellulaire localisée dans la membrane externe (figure 4).

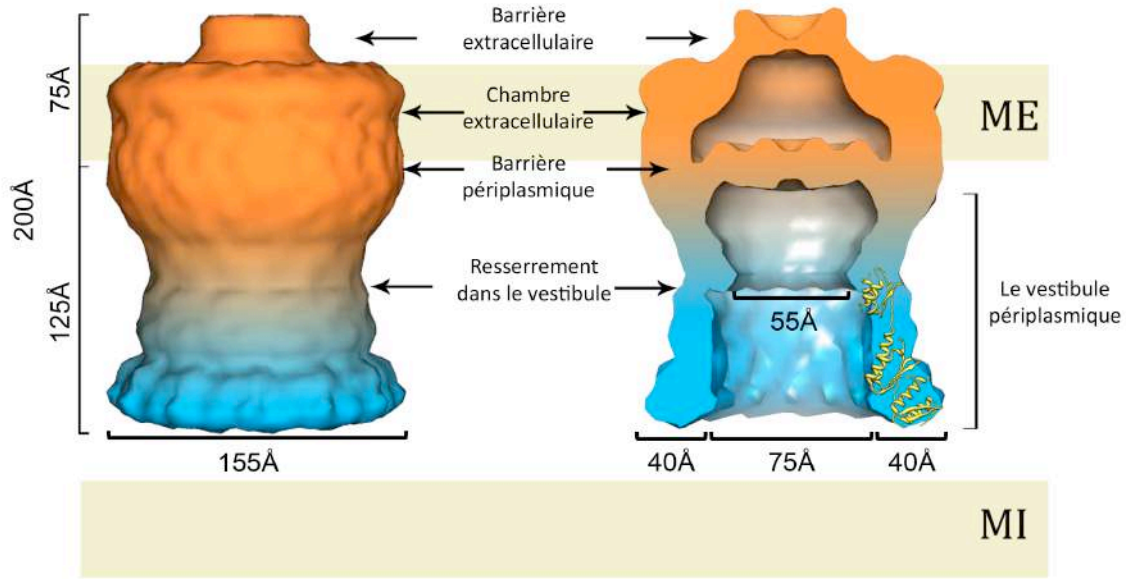


Figure 4 : Structure de la sécrétine GspD de *V. cholerae* déterminée par microscopie électronique à 19Å. La sécrétine est formée par deux compartiments : le vestibule périplasmique de 125Å de hauteur et la chambre extracellulaire de 75Å de hauteur. Les deux compartiments sont séparés l'un de l'autre par une barrière périplasmique. Adaptée de Reichow *et al* (Reichow *et al.*, 2010).

- **Le vestibule périplasmique**

Le vestibule périplasmique s'étend dans l'espace périplasmique sur une longueur de 125Å avec un diamètre interne de 75Å. Ce vestibule présente un resserrement réduisant son diamètre interne à 55Å, il est séparé de l'espace extracellulaire par une barrière périplasmique (figure 4). Le diamètre observé pour le vestibule est en accord avec le diamètre obtenu par modélisation du complexe dodécamérique généré par Korotkov *et al* (figure 3D) (Korotkov *et al.*, 2009b).

- **La chambre extracellulaire**

Cette chambre constitue la séparation entre l'espace périplasmique et le milieu extracellulaire. Le diamètre de cette chambre est de 100Å. La chambre est séparée du milieu extracellulaire par une porte de 10Å de diamètre (figure 4).

II. 1. 4. Les pilotines

Malgré leur diversité, la plupart des sécrétines identifiées dépendent d'une petite protéine pilote (120 à 150 résidus) pour leur insertion dans la membrane externe. Ces chaperonnes appelées pilotines sont des lipoprotéines insérées dans la membrane externe. Les pilotines se fixent sur un domaine supplémentaire appelé domaine « S » localisé au niveau du domaine C-terminal des sécrétines (figure 2). Le domaine S est très peu conservé dans la superfamille des sécrétines. A ce jour, plusieurs pilotines associées aux sécrétines des différents systèmes ont été identifiées. Pour les SST2, on trouve PulS chez *K. oxytoca* (Hardie *et al.*, 1996a; Hardie *et al.*, 1996b) et OutS chez *E. chrysanthemi* (Shevchik and Condemine, 1998). Dans le cas du système de sécrétion de type III, on trouve InvH chez *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (Daefler *et al.*, 1997; Crago and Koronakis, 1998), YscW chez *Yersinia enterocolitica* (Burghout *et al.*, 2004), MxiM chez *Shigella flexneri* (Schuch and Maurelli, 2001) et La pilotine Tgl du SPT4 de *Myxococcus xanthus* (Nudleman *et al.*, 2006).

D'autres sécrétines de type lipoprotéines possèdent des pilotines intramoléculaires. La fonction « pilotine » est portée par l'ancre lipidique N-terminale de ces lipoprotéines qui ont donc été appelées liposécrétines (figure 2). L'archétype de cette famille de liposécrétines est la sécrétine $HxcQ_D$ du second système de sécrétion de type II chez *P. aeruginosa* Hxc (Viarre *et al.*, 2009).

Enfin, on retrouve des sécrétines dépourvues du domaine « S » pour lesquelles aucune pilotine n'a encore été identifiée. C'est le cas de la sécrétine $XcpQ_D$ de *P. aeruginosa*.

Nouwen *et al*, ont montré que PulS de *K. oxytoca* s'assemblait sous forme de rayons périphériques autour du pore formé par la sécrétine PulD dans la membrane externe (figure 5) (Nouwen *et al.*, 1999). Selon cette reconstitution, la stœchiométrie du complexe protéique serait de 1:1 (Nouwen *et al.*, 1999) (figure 5 A&B). Par conséquent, les pilotines peuvent agir comme des chaperonnes ou bien en tant que stabilisateurs des sécrétines dans la membrane externe (Lario *et al.*, 2005).

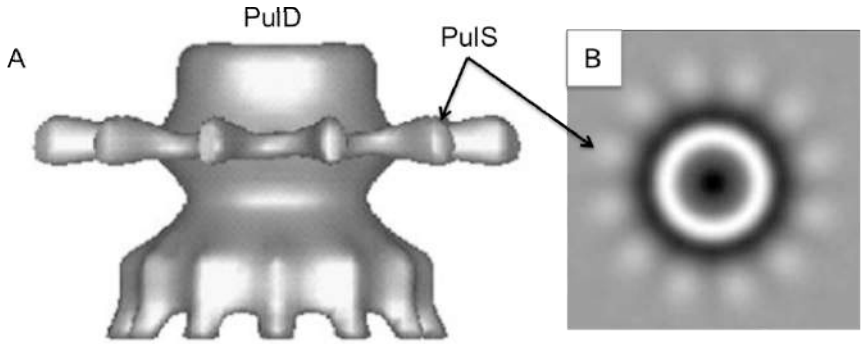


Figure 5 : Modèle du complexe PulD/PulS de *K. oxytoca*. (A) Association en anneau des monomères de PulD. Chaque monomère de PulD est associé à un monomère de PulS. (B) Image en microscopie électronique (STEM : « *scanning transmission EM* ») de la sécrétine PulD entourée par PulS en forme de rayons périphériques. Adaptée de Nouwen *et al* (Nouwen *et al.*, 1999).

Le rôle des pilotines a beaucoup été discuté, puisque en absence de la pilotine, la sécrétine reste localisée au niveau de la membrane interne (Guilvout *et al.*, 2006). Certains proposent que les pilotines soient des éléments d'ancrage des sécrétines dans la membrane externe (Lario *et al.*, 2005). D'autres proposent que les pilotines, une fois insérées par leur ancre lipidique dans le feuillet interne de la membrane externe, permettraient de stabiliser les homomultimères des sécrétines dans la membrane externe (Schuch and Maurelli, 1999). Les pilotines pourraient aussi assister les sécrétines lors de leur transport vers la membrane externe en empêchant leur multimérisation prématurée dans la membrane interne (Guilvout *et al.*, 2006). Dans tous les cas, il n'est pas surprenant que la mise en place d'une telle structure de l'ordre des mega daltons dans la membrane externe nécessite une assistance particulière.

II. 1. 5. Interaction de la sécrétine avec les exoprotéines dans le SST2

Parmi l'ensemble des protéines exportées dans le périplasme, seules une faible proportion est reconnue et prise en charge par la machinerie de sécrétion de type II. Les déterminants responsables de cette reconnaissance spécifique n'ont cependant pas encore été identifiés. En effet, l'analyse des séquences des différents exoprotéines n'a révélé aucun motif conservé qui pourrait faire office de signal de sécrétion qui permet l'adressage des exoprotéines vers la machinerie de sécrétion. Cependant, la machinerie de sécrétion de type II ne secrète que des protéines repliées, il a donc été proposé que le motif de sécrétion soit de nature conformationnelle (Sauvonnet *et al.*, 1995; Sauvonnet and Pugsley, 1996; Voulhoux *et al.*, 2000).

Le modèle architectural du SST2 propose que les exoprotéines franchissent la barrière de la membrane externe à travers le pore de sécrétion. Ceci suggère une reconnaissance entre le

substrat et la sécrétine. Vu la localisation du domaine N-terminal de la sécrétine dans l'espace périplasmique, celui-ci pourrait être impliqué dans la reconnaissance du substrat (Reichow *et al.*, 2010). La première interaction sécrétine/substrat a été élucidée chez le système Out d'*E. chrysanthemi* (Shevchik *et al.*, 1997). L'interaction de OutD avec son substrat la pectate lyase PelB a été révélée par des expériences de co-sédiemntation en gradient de sucrose, de copurification et d'overlay (*far western blot*) (Shevchik *et al.*, 1997). Cette interaction est localisée au niveau du domaine N-terminal de OutD, alors que le domaine C-terminal intervient uniquement dans l'insertion de la sécrétine dans la membrane externe et la formation du pore de sécrétion (Shevchik *et al.*, 1997).

Récemment, une interaction entre le domaine N-terminal de la sécrétine GspD de *V. cholerae* composé des domaines N0-N1-N2 et son substrat l'entérotoxine LT-B5 a été mise en évidence par la technique SPR « *Surface Plasmon Resonance* » (Reichow *et al.*, 2010). Cette interaction présente une affinité relativement faible (K_D = 15,5µM) (figure 6).

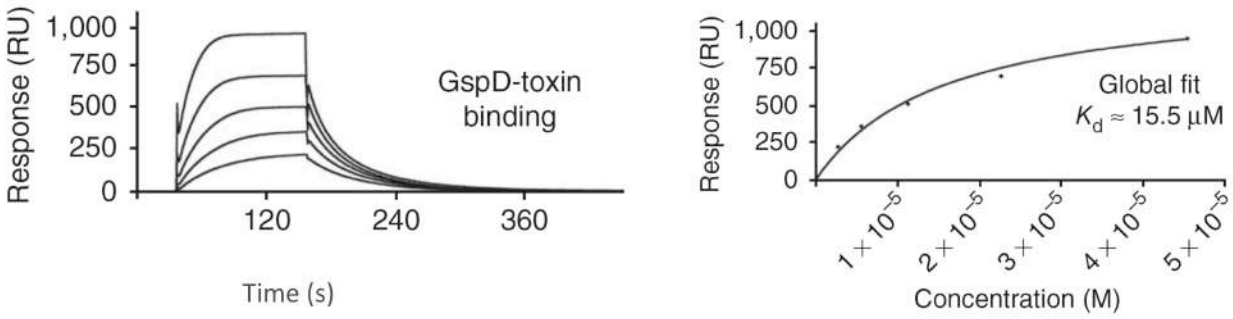


Figure 6 : Mise en évidence de l'interaction de la sécrétine GspD de *V. cholerae* avec la toxine LT-B5. Sensogramme montrant la fixation de la toxine sur le domaine N-terminal de la sécrétine immobilisée sur un chip CM5. Le K_{diss} est de l'ordre de 15,5µM. Adaptée de Reichow *et al* (Reichow *et al.*, 2010)

Il a été suggéré que le substrat se logerait au niveau du vestibule périplasmique de la sécrétine (Reichow *et al.*, 2010). Cette proposition a été confirmée par les études en microscopie électronique réalisées sur la sécrétine GspD de *V. cholerae* en présence de la toxine LT-B5 (Reichow *et al.*, 2011). Les images de reconstitution de la sécrétine $GspD_Q$ en absence et en présence de la toxine LT-B5 montrent, dans la partie inférieure du vestibule périplasmique, une densité équivalente à la taille de la toxine (figure 7).

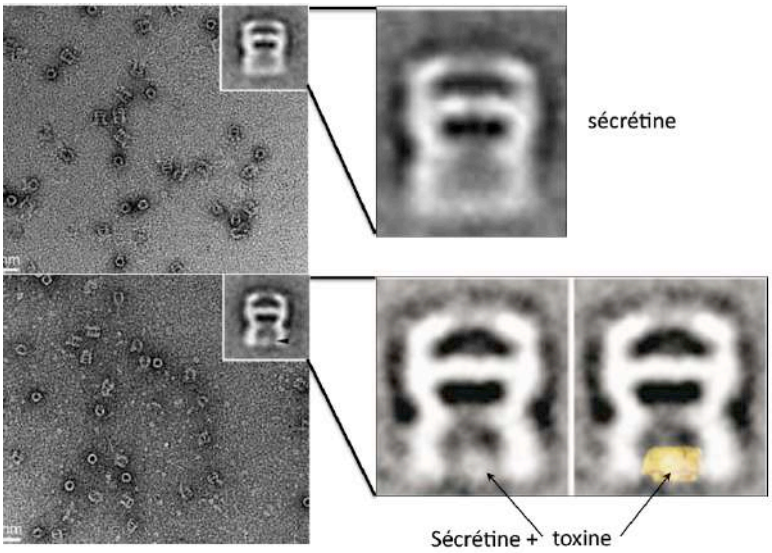


Figure 7 : Images de microscopie électronique montrant la sécrétine en absence et en présence de la toxine. La toxine est localisée dans la partie inférieure du vestibule périplasmique. Adaptée de Reichow *et al* (Reichow *et al.*, 2011).

II. 2. La protéine trans-périplasmique GspC

Les protéines GspC sont les éléments les moins conservés au sein de la machinerie de sécrétion de type II. Ce sont des protéines bitopiques de la membrane interne (Bleves *et al.*, 1996). Les protéines GspC sont constituées d'une courte extension N-terminale cytoplasmique, d'un domaine transmembranaire (TM) et d'un large domaine C-terminal périplasmique (Bleves *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1997; Bleves *et al.*, 1999). Le domaine C-terminal est composé de deux sous-domaines : le domaine HR « *Homology Region* » suivi par un domaine PDZ (Korotkov *et al.*, 2006). La région reliant le domaine HR au domaine transmembranaire est appelée le domaine TM/HR (Gerard-Vincent *et al.*, 2002) (figure 8).

II. 2. 1. Le domaine transmembranaire (TM)

Les protéines GspC possèdent toutes au niveau de leurs extrémités N-terminales un domaine transmembranaire (TM) conférant à ces protéines leur nature bitopique. En plus de son rôle d'ancrage dans la membrane interne, le segment transmembranaire de GspC est nécessaire à son homodimérisation. Cette dimérisation s'est avérée essentielle à la sécrétion (Login and Shevchik, 2006).

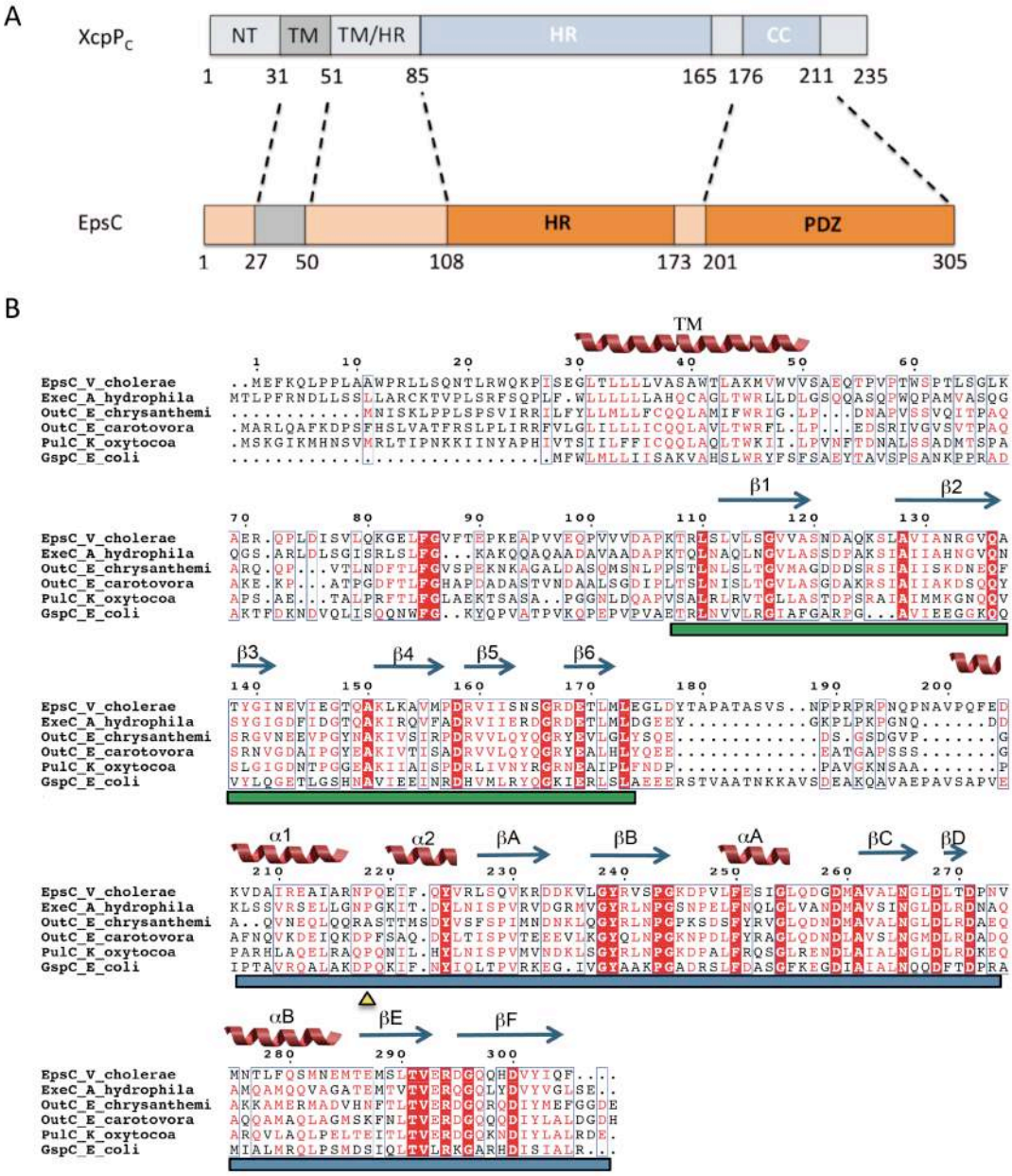


Figure 8 : Organisation structurale des GspC. (A) Représentation schématique de EpsC de *V. cholerae* et de XcpP$_C$ de *P. aeruginosa*. NT : extension N-terminale cytoplasmique, TM : segment transmembranaire, TM/HR : région qui sépare les domaines TM et HR, HR : domaine HR, PDZ : domaine PDZ, CC : domaine coiled-coil. (B) Alignement des séquences de différents GspC. Le domaine HR est délimité par une barre verte. Le domaine PDZ est délimité par une barre bleue. La prédiction des structures secondaires du domaine HR montre qu'il n'est composé que de feuillets β. Les structures secondaires du domaine PDZ de EpsC (code pdb 2I4S) sont affichées sur la séquence équivalente. La proline 218 (P_{218}) est indiquée par un triangle jaune.

II. 2. 2. Le domaine TM/HR

Le domaine TM/HR est la région qui sépare le domaine transmembranaire du domaine HR. C'est une région prédite comme étant désordonnée ou tout au moins dépourvue de

structures secondaires. Chez *P. aeruginosa*, il a été montré que le remplacement du domaine TM/HR de $XcpP_C$ de *P. aeruginosa* par celui de OutC d'*E. chrysanthemi*, ne permet plus la sécrétion de l'élastase LasB (Gerard-Vincent *et al.*, 2002) (figure 9). Ce domaine pourrait donc être impliqué dans la reconnaissance des substrats puisque l'échange des autres domaines (PDZ, CC et HR) n'affecte pas la fonction de $XcpP_C$. Ces résultats mettent en évidence le rôle clé du domaine TM/HR dans la reconnaissance du substrat et/ou dans la spécificité du système (Gerard-Vincent *et al.*, 2002).

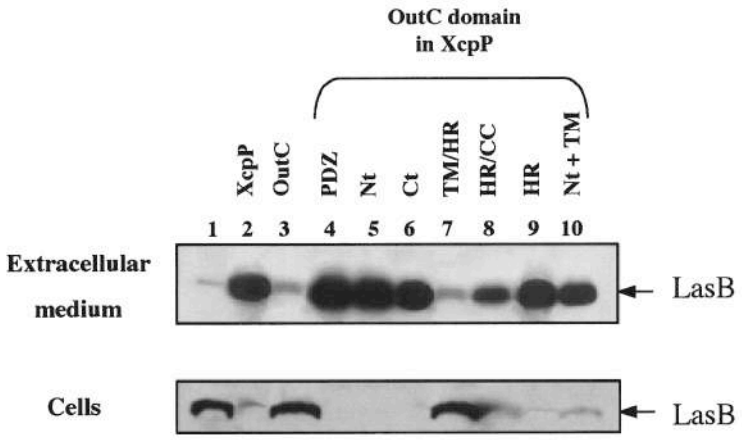


Figure 9 : Complémentation de la souche PAO1*ΔP* de *P. aeruginosa* délétée du gène x*cpP* par des gènes chimères *xcpP$_C$-outC*. Le surnageant des milieux de culture et les fractions cellulaires sont analysés par *Western-Blot* avec des anticorps anti-élastase (LasB). On peut voir que seule la chimère qui code pour XcpP fusionnée avec le domaine TM/HR de OutC ne sécrète pas l'élastase qui s'accumule dans les cellules. Adaptée de Gérard-Vincent *et al* (Gerard-Vincent *et al.*, 2002).

II. 2. 3. Le domaine HR

Les informations structurales sur les domaines HR proviennent uniquement des prédictions de structures secondaires. La prédiction de structures des domaines HR montre qu'ils sont composés principalement de feuillets β (Korotkov *et al.*, 2006) (figure 8). Le domaine HR a été identifié par Gérard-Vincent *et al* (Gerard-Vincent *et al.*, 2002), suite aux alignements des séquences entre différents représentants de la famille des GspC : $XcpP_C$ de *P. aeruginosa*, *P. putida* et *P. alcaligenes* ; OutC d'*E. chrysanthemi* et d'*E. carotovora* ; PulC de *K. oxytoca*, ExeC d'*A.hydrophila* ; GspC d'*E. coli* et EpsC de *V. cholerae*. La comparaison des différentes séquences montre l'existence d'une région conservée chez ces bactéries à Gram-négatif qu'ils ont appelé HR pour « *Homology Region* ».

Afin de comprendre le rôle du domaine HR dans le processus de sécrétion, Gérard-Vincent et al, ont remplacé le domaine HR de $XcpP_C$ de *P. aeruginosa* par le domaine HR de OutC d'*E. chrysanthemi* dans une souche de *P. aeruginosa* mutante du gène *xcpP* (Gerard-Vincent *et al.*, 2002). Contre toute attente, cette permutation des domaines HR n'affecte pas la sécrétion de l'élastase LasB. Ces observations révèlent que le domaine HR n'intervient pas alors dans le processus de reconnaissance du substrat et la sélectivité de la machinerie.

II. 2. 4. Les domaines PDZ et coiled-coil

La majorité des protéines GspC partagent la même organisation structurale avec un domaine N-terminal cytoplasmique et un domaine C-terminal périplasmique qui contient un domaine PDZ. Par contre, chez *P. aeruginosa* et *P. alcaligenes*, le domaine PDZ est remplacé par un domaine coiled-coil (CC) (Bleves *et al.*, 1999; Gerard-Vincent *et al.*, 2002). Les domaines PDZ et CC sont des domaines connus pour leur implication dans des interactions protéine-protéine (Pallen and Ponting, 1997; Gerard-Vincent *et al.*, 2002). Cependant, dans la famille des GspC, quelques membres ne possèdent ni domaine PDZ, ni domaine CC. Ceci est rencontré dans le cas des protéines $HxcP_C$ et XphA de *P. aeruginosa* (Peabody *et al.*, 2003; Michel *et al.*, 2007).

Le domaine PDZ a été nommé d'après les protéines dans lesquelles il a été initialement trouvé : PSD-95, Dlg et ZO-1 (Kennedy, 1995). On le retrouve aussi sous les anciens noms "domaine DHR" « *Disc-large homology repeats* » ou "répétitions GLGF" (motifs Gly–Leu–Gly-Phe découverts lors de la première description du domaine) (Kennedy, 1995). Ces domaines sont des modules globulaires composés d'une centaine de résidus. Ils ont la capacité de fixer les extrémités carboxyliques de leurs protéines partenaires. De plus, ils peuvent s'associer à d'autres molécules ne possédant pas de PDZ ou avec des domaines PDZ d'autres protéines.

Un domaine PDZ classique contient un feuillet β à 6 brins (βA à βF) entouré par deux hélices α (αA, αB) (figure 10A). La zone d'interaction avec le partenaire est localisée entre le brin βA et l'hélice αB (figure 10A). L'extrémité C-terminale du partenaire interagit avec le motif GLGF situé dans la boucle connectant les brins βA et βB comportant un motif très conservé : le motif de fixation GLGF (figure 10B).

La structure du domaine PDZ de la protéine EpsC de *V. cholerae* a été résolue par cristallographie aux rayon X (code pdb 2I6V, 2I4S) (Korotkov *et al.*, 2006). Ces codes pdb représentent respectivement les deux structures correspondantes aux deux variantes du

domaine PDZ : une version courte constituée des résidus 219 à 305 et une version plus longue allant du résidu 201 à 305 (figure 8).

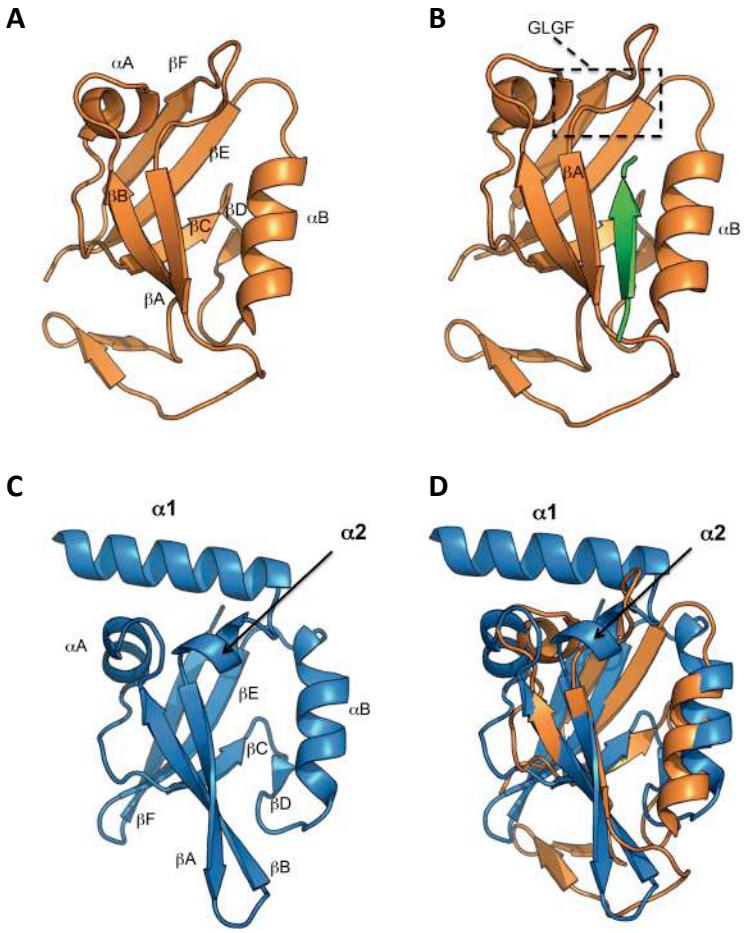


Figure 10 : Représentation des structures des domaines PDZ des protéines SNX27 et EpsC de *V. cholerae* (code pdb 2I4S). (A) Un domaine PDZ classique de la protéine SNX27 (code pdb 3QGL) présenté en orange. (B) Le domaine PDZ de SNX27 complexé au peptide ESESKV présenté en vert. Le motif GLGF est encadré en pointillé. (C) Le domaine PDZ de EpsC présenté en bleu. (D) Superposition des deux domaines PDZ de la protéine SNX27 et de EpsC.

La structure du domaine PDZ de EpsC de *V. cholerae* (code pdb 2I4S) montre un repliement légèrement différent de celui retrouvé dans les PDZ classiques (figure 10C & D). En effet, à la place de la boucle reliant les brins βA et βB on retrouve une courte hélice α2 qui constitue la continuité d'une hélice α1 qui lui est perpendiculaire. Le coude situé entre les hélices α1 et α2 est réalisé grâce à une proline (P218) (figure 8). En plus de cette divergence structurale, on note l'absence du motif de reconnaissance GLGF (Korotkov *et al.*, 2006). Ces observations suggèrent un mécanisme d'interaction différent du domaine PDZ classique avec son partenaire.

Afin de comprendre le rôle des domaines PDZ et CC dans la machinerie de sécrétion de type II, des expériences de délétion et de complémentation ont été réalisées sur les gènes ou fragments de gènes correspondants (Bleves *et al.*, 1999). Ainsi, il a été montré que chez *P. aeruginosa*, le domaine CC est indispensable à la sécrétion de LasB, puisque le mutant de $XcpP_C$ délété de son domaine CC n'est plus fonctionnel (Bleves *et al.*, 1999). Cependant, le domaine CC de $XcpP_C$ de *P. aeruginosa* a pu être remplacé par le domaine PDZ de OutC ($XcpP_C$-PDZ_{OutC}) d'*E. chrysanthemi* sans affecter sa fonction (Gerard-Vincent *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces résultats, rend l'attribution d'un rôle précis aux domaines PDZ et CC compliquée. Il a été suggéré que les domaines PDZ et CC des GspC, de part leur implication dans des interactions protéine-protéine, seraient impliqués dans l'homodimérisation des GspC. Cette suggestion a été prouvée dans le cas de $XcpP_C$ de *P. aeruginosa*, puisque il a été montré que la protéine $XcpP_C$ et la chimère $XcpP_C$-PDZ_{OutC} étaient capables de former des multimères (majoritairement des dimères) en présence d'un agent pontant : le formaldéhyde. De plus, un mutant de $XcpP_C$ délété de son domaine CC est incapable de multimériser (Gerard-Vincent *et al.*, 2002). Malgré ces observations, cette multimérisation n'est pas générale dans la famille des GspC puisqu'aucune multimérisation du domaine périplasmique de la protéine OutC d'*E. chrysanthemi* n'a été détectée (Douet *et al.*, 2004; Login and Shevchik, 2006).

II. 2. 5. Interaction de GspC avec le pore de sécrétion

L'analyse des données structurales et biochimiques rend l'attribution d'une fonction précise à GspC très complexe. Cependant, il a été suggéré que cette protéine joue le rôle de connecteur du pore de sécrétion à la plateforme de membrane interne (Michel and Voulhoux, 2009). En effet, la topologie de GspC avec son large domaine périplasmique ainsi que la localisation des gènes codant pour GspC quasiment toujours en tandem avec celui de la sécrétine GspD (figure 1), renforcent cette hypothèse.

D'autre part, plusieurs données ont montré que le couple GspC/GspD serait l'élément clé de la spécificité de la machinerie de sécrétion. Par exemple, chez *E. chrysanthemi* et *E. carotovora*, les systèmes Out des deux espèces sont très homologues. Chaque mutant des gènes *out d'E. chrysanthemi* est complémenté par le gène correspondant d'*E. carotovora* sauf les mutants des deux gènes codant OutC et OutD où la complémentation n'est rétabli que lorsque le couple OutC-OutD de la même souche est présent (Lindeberg *et al.*, 1996). Par conséquent, il été proposé que les protéines OutD et OutC puissent êtres directement impliquées dans ce processus de reconnaissance spécifique du substrat (Lindeberg *et al.*, 1996; de Groot *et al.*,

2001). Des travaux similaires réalisés entre *P. aeruginosa* et *P. alcaligenes* ont également montré que les protéines $XcpP_C$ et $XcpQ_D$ fonctionnent également en couple (de Groot *et al.*, 2001)

Des expériences de fractionnement cellulaire ont montré que la localisation dans la membrane externe de la protéine PulC de *K. oxytoca* est dépendante de la présence de la sécrétine PulD (Possot *et al.*, 1999) ce qui suggère que la protéine GspC interagit avec le pore de sécrétion.

Des travaux plus récents ont mis en évidence une interaction directe entre la sécrétine et la protéine GspC (Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Korotkov *et al.*, 2006; Login *et al.*, 2010). En effet, il a été montré par co-purification que la protéine EpsC de *V. cholerae* interagit avec le domaine N-terminal de la sécrétine péri-EpsD par son domaine HR, alors que le domaine PDZ n'intervient pas dans cette interaction (figure 11).

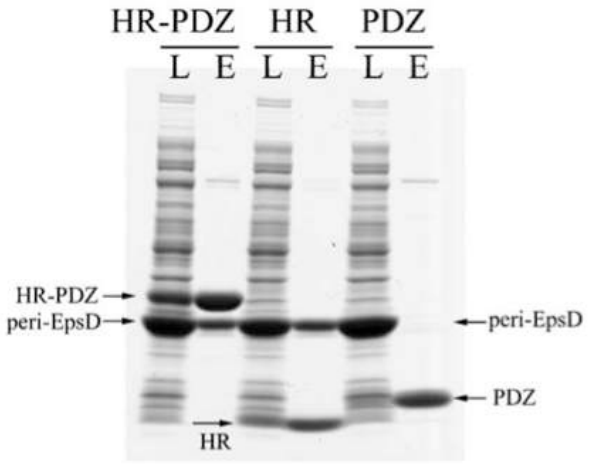


Figure 11 : Mise en évidence de l'interaction de EpsC-HR avec péri-EpsD de *V. cholerae*. Le domaine HR de EpsC co-purifie péri-EpsD. Le domaine PDZ de EpsC est incapable de co-purifier péri-EpsD. Adapté de Korotkov *et al* (Korotkov *et al.*, 2006).

Récemment, chez *E. chrysanthemi*, il a été montré que le site d'interaction de OutC avec la sécrétine OutD est situé entre les résidus 139-158 du domaine HR de OutC (Login *et al.*, 2010). Ce peptide nommé $OutC_{sip}$ « *secretin interacting peptide* » reconnaît deux sites différents de la sécrétine OutD. Le premier site d'interaction est localisé au niveau du domaine N0 alors que le deuxième est situé dans la zone couvrant la partie C-terminale du domaine N2 et la partie N-terminale de N3 (Login *et al.*, 2010).

II. 3. La plateforme de la membrane interne

Bien que le sécréton soit impliqué dans le transfert des exoprotéines à travers la membrane externe, plusieurs protéines ancrées ou associées à la membrane interne sont essentielles à son fonctionnement. Ainsi les protéines GspF, GspM, GspL et GspE forment dans la membrane interne un complexe multiprotéique appelé « plateforme de membrane interne », probablement impliqué dans l'énergisation du sécréton.

II. 3. 1. La protéine GspF

GspF est une protéine membranaire d'environ 400 résidus localisée dans la membrane interne. Les études topologiques de cette protéine chez *P. aeruginosa* et *E. carotovora* ont montré que $XcpS_F$ et PulF traversent trois fois la membrane interne. GspF possède ainsi deux domaines cytoplasmiques, trois segments transmembranaires et une courte boucle périplasmique (Thomas *et al.*, 1997; Arts *et al.*, 2007) (figure 12).

Des expériences de complémentation ont montré que $XcpS_F$ de *P. aeruginosa* peut remplacer $XcpS_F$ de *P. alcaligenes* qui lui est très similaire mais pas $XcpS_F$ de *P. putida* (Arts *et al.*, 2007). Ce dernier résultat montre que la protéine GspF interagit spécifiquement avec d'autres composants de la machinerie (Arts *et al.*, 2007). La construction de chimères de $XcpS_F$ de *P. aeruginosa* et de *P. putida* a montré que ce sont les domaines cytoplasmiques les plus engagés dans l'interaction avec les composants de la machinerie (Arts *et al.*, 2007). Les seules informations structurales sur la protéine entière proviennent des études menées sur $XcpS_F$ de *P. aeruginosa.* Ces observations montrent que $XcpS_F$ peut former des homomultimères (figure 13A). Les images de microscopie électronique montrent des formes hexamèriques de diamètre d'environ 10,2nm (Thèse Freya Senf, Utrecht-Hollande 2008) (figure 13B). La structure du domaine cytoplasmique de EpsF (résidus 56-171) de *V. cholerae* a été résolue par cristallographie au rayons X (codes pdb disponibles 3C1Q, 2VMA et 2VMB ; ces structures présentent différentes résolutions) (Abendroth *et al.*, 2009b). Ce domaine adopte un repliement tout α avec six hélices α (α1 à α6) (figure 13C). Les hélices ont une taille qui varie entre 10 et 15 résidus excepté l'hélice α6 qui est composée dune trentaine de résidus. C'est d'ailleurs à la suite de l'hélice α6 que se situe le segment transmembranaire (Abendroth *et al.*, 2009b) (figure 13C).

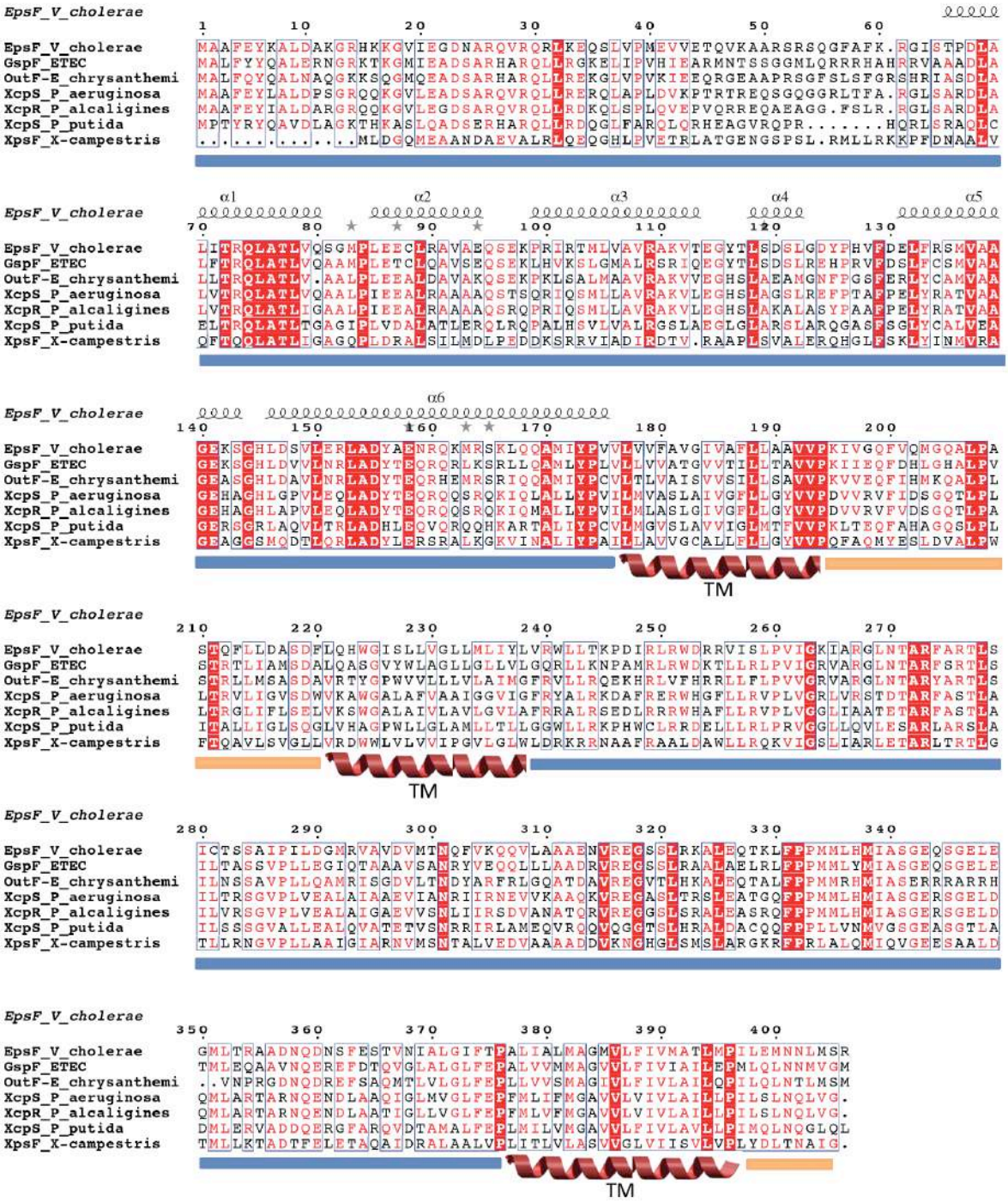


Figure 12 : Alignement des séquences des principaux membres de la famille des GspF. Les structures secondaires de EpsF de *V. cholerae* (code pdb 2VMA) sont présentées au dessus de l'alignement. La topologie de GspF est indiquée en dessous de l'alignement : en bleu les domaine cytoplasmiques, en orange les domaines périplasmiques. Les hélices transmembranaires sont indiquées par TM.

La purification du domaine cytoplasmique de EpsF montre qu'il est sous forme monomérique. Il est cependant retrouvé sous forme de dimère dans l'unité asymétrique où deux types de dimères coexistent : dans le premier on a un arrangement antiparallèle des hélices α6 des deux monomères, alors que dans le deuxième, les hélices α6 sont orientées dans le même sens (figure 13C) (Abendroth *et al.*, 2009b). C'est le deuxième dimère qui semble le plus proche de la réalité physiologique puisque les deux hélices α6 doivent êtres dirigées vers la membrane interne. La surface d'interaction entre les deux protéines est de l'ordre de 1750Å^2, ce qui suggère une interaction physiologique entre les deux monomères de EpsF (Jones and Thornton, 1996). Les résidus impliqués dans l'homodimérisation de EpsF au niveau du cytoplasme sont relativement conservés dans la famille des GspF, ce qui suggère que les autres membres de cette famille interagissent de la même façon.

Les deux domaines cytoplasmiques des GspF présentent entre 20 et 30% d'identité de séquence. Les prédictions de structures secondaires suggèrent que le second domaine cytoplasmique partage un repliement tout α assez similaire à celui déterminé pour le premier domaine de EpsF.

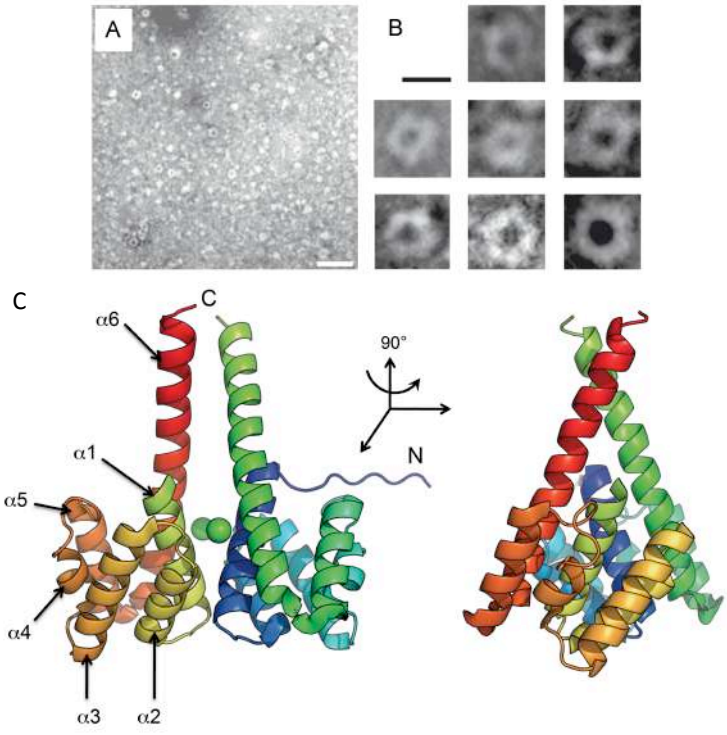


Figure 13 : (A) Observation en microscope électronique des multimères de XcpS$_F$ de *P. aeruginosa*. (B) XcpS$_F$ forme des anneaux en forme hexamèrique de 10,2nm de diamètre. (Adaptée de la thèse de F. Senf) (C) Structure tridimensionnelle du dimère de EpsF de *V. cholerae* (code pdb 2VMA). EpsF affiche un repliement tout α. La surface d'interaction entre les deux monomères de EpsF implique principalement les hélices α1 et α6.

II. 3. 2. La protéine GspM

GspM est une protéine bitopique de la membrane interne qui présente la même topologie que GspC (Bleves *et al.*, 1996; Abendroth *et al.*, 2004b). La protéine GspM est constituée d'un domaine cytoplasmique d'une vingtaine de résidus, un segment transmembranaire et un domaine périplasmique d'environ cent résidus. Malgré le peu d'information disponible sur sa fonction, elle reste néanmoins essentielle au processus de sécrétion, puisque sa délétion se traduit pas une perte totale de la sécrétion (Robert *et al.*, 2002; Abendroth *et al.*, 2004b).

Les données biochimiques montrent une dimérisation du domaine périplasmique ainsi que de la protéine entière (Sandkvist *et al.*, 1999). Ceci suggère que le domaine périplasmique de EpsM suffit pour la dimérisation et donc ne nécessite pas les domaines transmembranaires (Sandkvist *et al.*, 1999; Abendroth *et al.*, 2004b).

L'oligomérisation de GspM a également été observée dans le cas du système Out d'*E. chrysanthemi*. Les études d'interaction par double hybride ont révélé que les domaines périplasmiques de OutM interagissaient entre eux (Py *et al.*, 2001; Douet *et al.*, 2004). Ces données renforcent l'idée que la dimérisation de GspM est une réalité physiologique rencontrée dans les systèmes de sécrétion de type II.

La structure du domaine périplasmique de EpsM (résidus 44-165) de *V. cholerae* a été résolue par cristallographie au rayon X à 1,7Å de résolution (code pdb 1UV7) (Abendroth *et al.*, 2004b). La structure présente une organisation en dimère où chaque monomère est constitué d'un feuillet β à quatre brins antiparallèles (β1 à β4) et deux hélices α (α1 et α2) (Abendroth *et al.*, 2004b) (figure 14). Les structures secondaires du domaine périplasmique de EpsM s'organisent dans un motif de type αββ–αββ (Abendroth *et al.*, 2004b). L'interface entre les deux monomères implique principalement l'hélice α2 de chaque monomère avec une surface de contact de l'ordre de 925Å^2. Cette interaction met en jeux principalement des contacts hydrophobes et des liaisons hydrogènes. La recherche d'homologues structuraux a permis de mettre en évidence une similarité entre le domaine périplasmique de EpsM et les ferrédoxines (Abendroth *et al.*, 2004b). Les ferrédoxines présentent un motif structural en βαβ–βαβ.

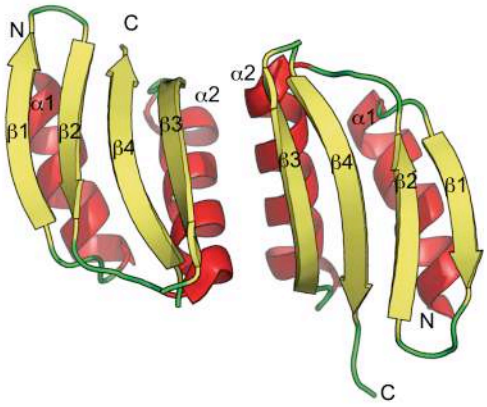


Figure 14 : Structure du dimère de EpsM (code pdb 1UV7). En rouge les hélices α et en jaune les feuillets β. La surface d'interaction implique les deux hélices α2.

Il a été considéré alors, que le motif αββ–αββ du domaine périplasmique de EpsM soit une variante du motif structural des ferrédoxines suite à une inversion structurale. La comparaison des séquences des ferrédoxines et des GspM montre une très faible identité de séquence (< 15%). Cette homologie structurale ne permet alors pas d'extrapoler une fonction autre qu'architecturale pour GspM. En effet, les ferrédoxines présentent une grande variété de fonctions, d'ou la difficulté d'attribuer une fonction précise à GspM (Abendroth *et al.*, 2004b).

II. 3. 3. La protéine GspL

Parmi les protéines associées à la membrane interne, GspL est la seule à avoir deux larges domaines localisés de part et d'autre de la membrane interne. GspL est un élément central de la plateforme de membrane interne qui connecte pratiquement toutes les protéines associées à cette plateforme (Sandkvist *et al.*, 1999; Sandkvist *et al.*, 2000b; Lee *et al.*, 2001; Py *et al.*, 2001; Robert *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2002; Filloux, 2004; Lee *et al.*, 2004).

GspL est une protéine d'environ 400 résidus répartis en trois domaines. La partie N-terminale d'environ 250 résidus est localisée dans le cytoplasme. La partie C-terminale répartie sur une centaine de résidus est localisée dans l'espace périplasmique. Les deux domaines sont séparés par un segment transmembranaire d'une vingtaine de résidus (Sandkvist *et al.*, 2000b). Comme toutes les protéines du système de sécrétion de type II, la délétion de GspL entraîne la perte de sécrétion (Ball *et al.*, 1999; Sandkvist *et al.*, 1999; Sandkvist *et al.*, 2000a).

Les structures des domaines cytoplasmique (code pdb 1W97) et périplasmique (code pdb 2W7V) de GspL ont été résolues par cristallographie au rayon X à 2,7 et 2,3Å, respectivement (Abendroth *et al.*, 2004a; Abendroth *et al.*, 2009a). La structure du domaine

cytoplasmique de EpsL de *V. cholerae* (résidus 1-253) comporte 7 hélices α et 14 brins β (figure 15A). Ces structures secondaires sont réparties en trois domaines appelés domaine I, II et III (Abendroth *et al.*, 2004a). Le domaine I couvre trois régions du polypeptide (S_2-A_{58}, R_{115}-P_{137} et L_{217}-K_{239}). Ce domaine présente la partie centrale de la structure et il est constitué d'un feuillet β à 5 brins et quatre hélices α. On retrouve également deux courtes hélices α qui relient le domaine I au domaine II. Le domaine II (L_{62}-A_{114}) est constitué d'un feuillet β à trois brins antiparallèles et d'une hélice α. Le domaine III (I_{142}-G_{216}) est composé d'un feuillet β à 5 brins et d'une hélice α (figure 15A).

La recherche d'homologie structurale via le serveur bioinformatique DALI (Holm and Rosenstrom) a permis de mettre en évidence une ressemblance avec la protéine PilM du SPT4 (Karuppiah and Derrick, 2011) ainsi qu'avec la famille des ATPases de type actine (Abendroth et al., 2004a). La structure de la protéine PilM de Thermus thermophilus (code pdb 2YCH) se superpose avec la protéine EpsL avec un RMSD « *root mean square deviation* » de 3,5Å pour la chaîne principale des polypeptides. Cependant, la superposition de EpsL avec un représentant de la famille des ATPases de type actine, la protéine FtsA (code pdb 1E4G) (van den Ent and Lowe, 2000), montre des RMSD élevés (> 5Å). Les protéines FtsA et PilM sont composées de deux sous-domaines appelés 1A/C et 2B/D (figure 15 B&C) (Karuppiah and Derrick, 2011).

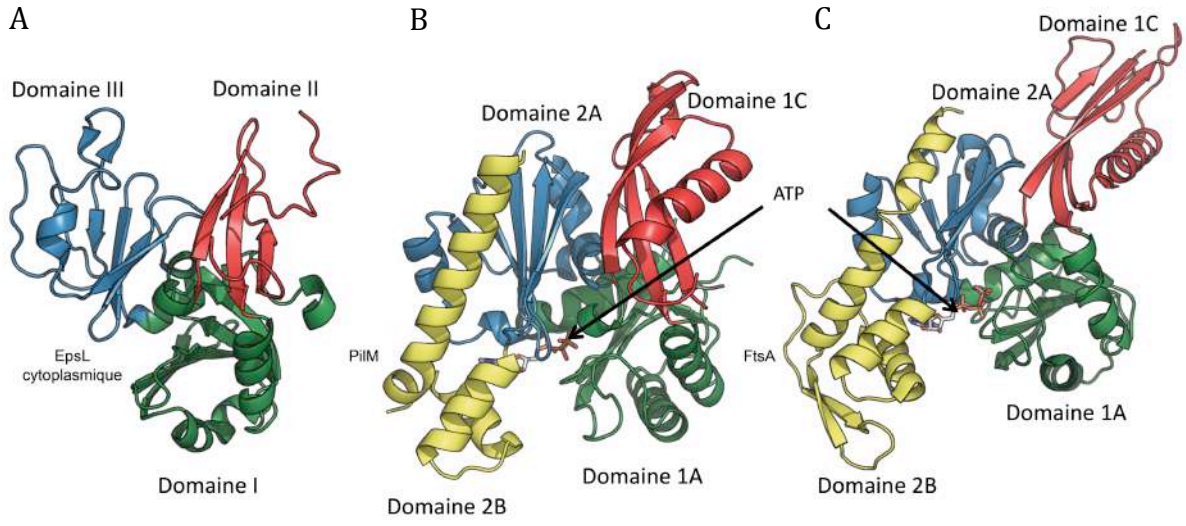


Figure 15 : Comparaison des structures du domaine cytoplasmique de EpsL de *V. cholerae* et de deux protéines de la famille des ATPases de type actine. (A) Structure du domaine cytoplasmique de EpsL (code pdb 1W97). Le domaine I coloré en vert, le domaine II en rouge et le domaine III en bleu. (B) Structure de PilM de *Thermus thermophilus* (code pdb 2YCH). (C) Structure de la protéine FtsA de *Thermotoga maritima* (code pdb 1E4G). Les domaines caractéristiques des ATPases de type actine sont présentés selon ce code couleur : le domaine 1A en vert, le domaine 1C en rouge, le domaine 2A en bleu et le domaine 2B en jaune.

L'homologie structurale de EpsL avec pilM et FtsA est limitée aux domaines I et III du domaine cytoplasmique de EpsL avec les domaines 1A et 2A de ces deux protéines. Il a été montré que la protéine FtsA est capable de fixer et d'hydrolyser l'ATP (Feucht *et al.*, 2001). Par contre, L'activité d'hydrolyse de l'ATP est absente chez PilM qui est capable uniquement de fixer l'ATP (Karuppiah and Derrick, 2011). Cependant, aucune activité de fixation ou d'hydrolyse de l'ATP n'a été détectée pour EpsL. L'absence des activités d'hydrolyse et de fixation de l'ATP peut s'expliquer par les observations structurales qui montrent que EpsL a perdu le domaine 2B qui intervient dans la fixation de l'ATP. Par conséquent, les auteurs proposent que EpsL joue le rôle de transducteur de signal via son interaction avec l'ATPase du système de sécrétion GspE « *ATP sensory function* » (Abendroth *et al.*, 2009a).

Afin de mieux comprendre l'homologie entre le SPT4 et le SST2, il est intéressant de noter que le peptide de PilN co-cristallisé avec PilM se superpose avec la partie C-terminale de EpsL. En effet, dans le système de piliation de type IV, la protéine PilN est une protéine bitopique avec un segment transmembranaire ancré dans la membrane interne et un domaine périplasmique (Ayers *et al.*, 2009; Sampaleanu *et al.*, 2009). Cette protéine forme un complexe avec la protéine PilM localisée dans le cytoplasme (Ayers *et al.*, 2009). En se basant sur ces observations structurales, on peut confirmer que l'homologue structural de GspL dans le système de piliation de type IV est le complexe PilM-PilN (Sampaleanu *et al.*, 2009).

Les informations structurales du domaine périplasmique de GspL proviennent de la structure de ce domaine chez EpsL de *V. parahaemolyticus* (code pdb 2W7V) (Abendroth *et al.*, 2009a) (figure 16). Cette structure a été résolue par cristallographie aux rayons X à 2,3Å. L'identité de séquence entre EpsL de *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* est de 56% ce qui suggère que leurs domaines périplasmiques partagent le même repliement. La résolution de structure révèle que la protéine est sous forme de dimère dans l'unité asymétrique. Chaque monomère constitue un domaine globulaire composé de deux hélices α et un feuillet β à 4 brins. Ces structures secondaires adoptent un motif structural type $\alpha\beta\beta$–$\alpha\beta\beta$. Les deux monomères s'associent de manière à ce que les deux feuillets β forment un seul feuillet à 8 brins (figure 16). La surface de contact entre deux monomères est de 1440Å^2 et fait intervenir principalement des résidus hydrophobes et aromatiques fortement conservés dans la famille des GspL (Abendroth *et al.*, 2009a).

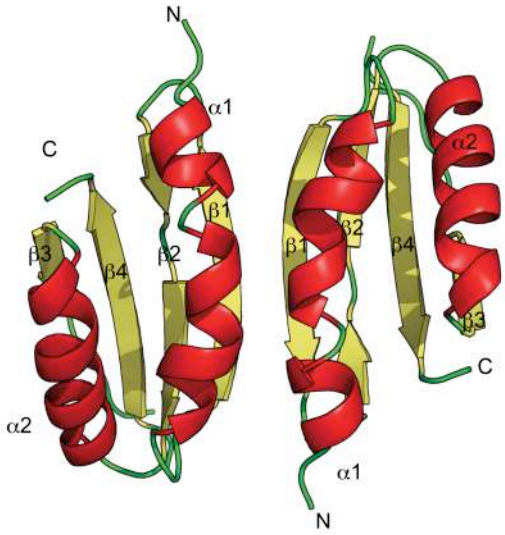


Figure 16 : Structure du dimère de EpsL périplasmique (code pdb 2W7V). En rouge les hélices α et en jaune les feuillets β. La surface d'interaction implique les deux hélices α1.

Ce motif structural a été rencontré dans la structure du domaine périplasmique de EpsM de *V. cholerae*. Cependant, les dimères de EpsM et de EpsL sont différents puisque dans le cas de EpsM, l'interaction se fait au niveau des hélices α2 (figure 14) alors que dans le cas de EpsL, l'interaction est localisée au niveau des deux hélices α1. La dimérisation du domaine périplasmique présente dans l'étape de purification ainsi que dans l'unité asymétrique, prévoit une dimérisation physiologique de la protéine entière soit à travers son domaine périplasmique, soit à travers les domaines cytoplasmiques et périplasmiques. Cette suggestion est confirmée par des études antérieures qui ont montré que la forme entière de EpsL peut s'associer en dimère (Py *et al.*, 1999; Sandkvist *et al.*, 1999).

II. 3. 4. La protéine GspE :

Le transport des protéines à travers l'enveloppe bactérienne est un processus qui nécessite de l'énergie. Dans le système de sécrétion de type II, cette énergisation est assurée par l'ATPase du système : la protéine GspE. Le rôle de ces ATPases est soit de fournir l'énergie nécessaire au processus de sécrétion, soit d'en assurer sa régulation. La famille des protéines GspE appartient à la superfamille des NTPases de sécrétion de type II et IV appelées aussi ATPases de trafic (Planet *et al.*, 2001). Les ATPases de trafic sont impliquées dans divers processus biologiques comme les SST2 et les systèmes de sécrétion de type IV (SST4), le transfert de l'ADN (T-DNA), la conjugaison bactérienne et l'assemblage des pili de type IV (Robien *et al.*, 2003).

Les ATPases de trafic possèdent quatre motifs conservés : un motif *Walker A* (GX4GK(S/T), un motif *Walker B* atypique (Dhhhh(G/A)E au lieu de DhhhhDE où h est un résidu hydrophobe) , une boite aspartate « *Asp Box* » et une boite histidine « *His Box* » (figure 17) (Filloux, 2004).

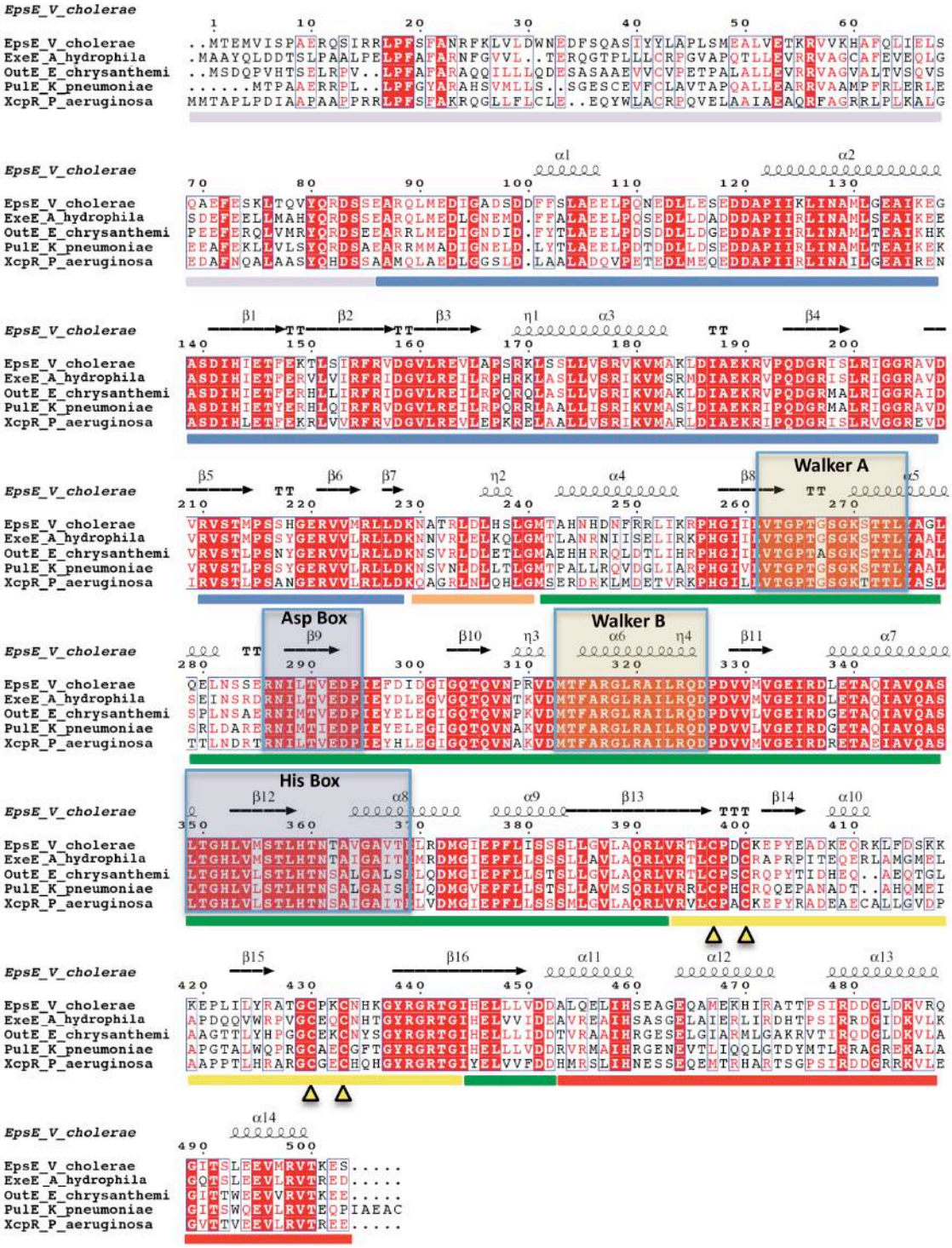
Les motifs *Walker A* et *Walker B* sont localisés dans le domaine C-terminal et permettent la fixation de l'ATP. La boîte « *Asp Box* » est localisée entre les deux motifs *Walker A* et *B*, alors que la « *His Box* » est située en aval de *Walker B*. Dans la famille des GspE, on trouve en plus de ces quatre motifs très conservés, un cinquième motif appelée « tétra-cystéine ». Les mutations au niveau du motif *Walker A* des GspE de *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *V. cholerae*, *E. chrysanthemi* et *X. campestris* réduisent fortement le processus de sécrétion, ce qui a suggéré une activité de fixation et/ou hydrolyse de l'ATP (Patrick *et al.*, 2011).

Récemment, il a été montré que les protéines XpsE de *X. campestris* et EpsE de *V. cholerae* ont une activité d'hydrolyse et de fixation de l'ATP. Cette activité est dépendante de la présence d'ions bivalents comme le Mg^{2+} (Camberg and Sandkvist, 2005; Shiue *et al.*, 2006). Cependant, cette activité n'a pas encore été démontrée pour $XcpR_E$ de *P. aeruginosa* ni pour PulE de *K. oxytoca*.

Les protéines GspE sont les seules protéines du sécréton de type II qui n'on ni séquence signal, ni domaine transmembranaire suggérant ainsi une localisation cytoplasmique. Des expériences de fractionnement cellulaire ont finalement montré que EpsE de *V. cholerae* et $XcpR_E$ de *P. aeruginosa* sont des protéines cytoplasmiques associées à la membrane interne. L'association de EpsE et $XcpR_E$ à la membrane interne est dépendante de GspL (Sandkvist *et al.*, 1995; Ball *et al.*, 1999; Camberg and Sandkvist, 2005; Gray *et al.*, 2011).

Les NTPases de SST2 sont formées de plusieurs domaines : les domaines N1 et N2 du coté N-terminal et les domaines C1, C_M et C2 du coté C-terminal (figure 17A). Les domaines N-terminaux des GspE divergent non seulement en séquence, mais aussi en longueur. Les GspE ont été classifiées en deux familles. Les membres de la famille « XpsE » de *X. campestris* dont fait également partie l'ATPase HplR de *P. aeruginosa* (Michel and Voulhoux, 2009) sont caractérisés par un domaine N0 supplémentaire du coté N-terminal absent chez les membres de la deuxième famille « EpsE » (figure 17B) dont fait partie $XcpR_E$ de *P. aeruginosa*, EpsE de *V. cholerae*, PulE de *K. oxytoca*, outE *d'E. chrysanthemi* et ExeE d'*A. hydrophila* (figure 17A) (Chen *et al.*, 2005; Michel and Voulhoux, 2009).

A


EpsE_V_cholerae
ExeE_A_hydrophila
OutE_E_chrysanthemi
PulE_K_pneumoniae
XcpR_P_aeruginosa
Walker A
Walker B
Asp Box
His Box

B

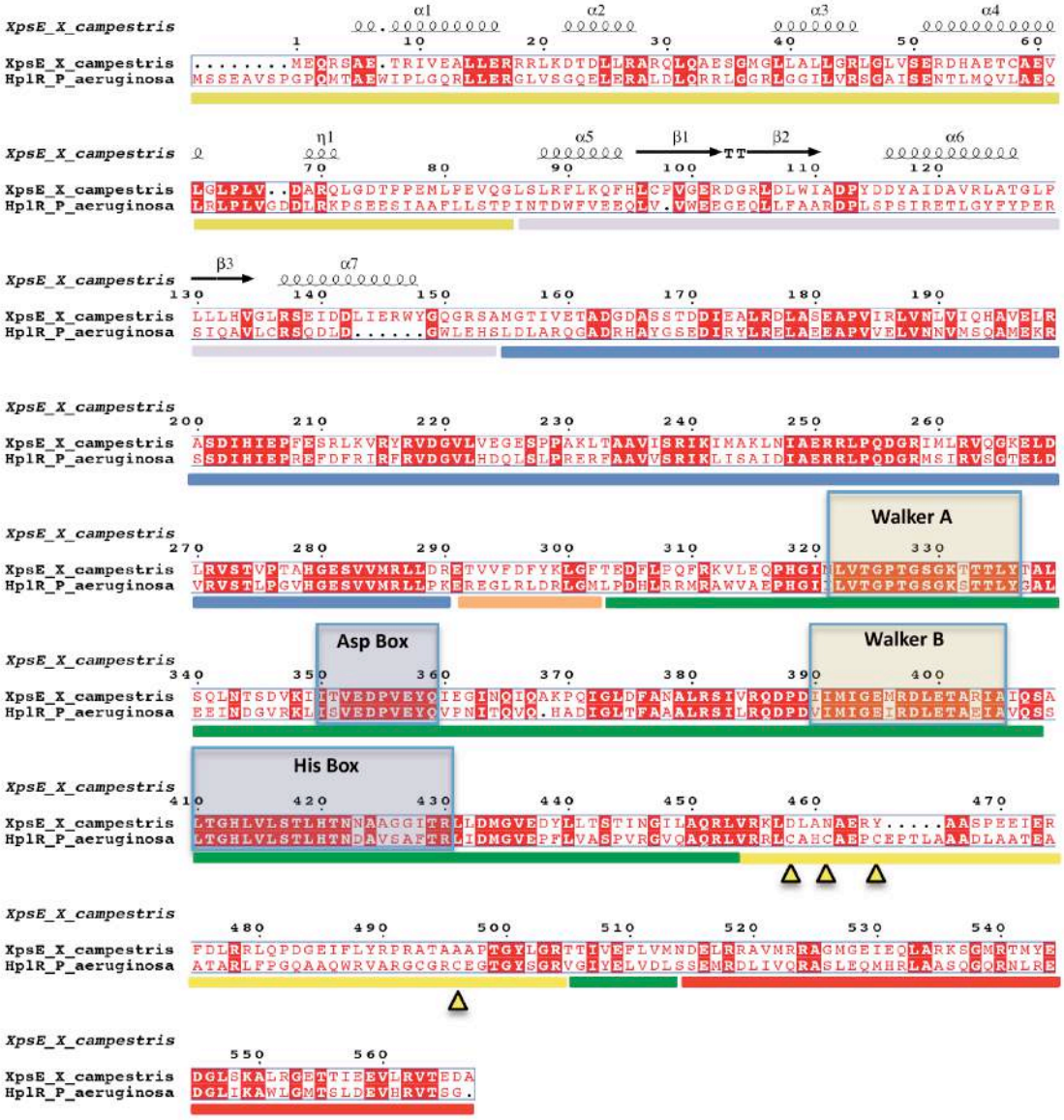


Figure 17 : Alignement des séquences des principaux membres de la sous-famille des ATPases de trafic du SST2. (A) Alignement des principaux membres de la famille des EpsE. Les résidus conservés sont colorés en rouge. Les différents domaines des ATPases sont soulignés par différents couleurs : le domaine N1 en violet, le domaine N2 en bleu, le domaine C1 en vert, le linker qui lie N2 à N1 en orange, le domaine CM en jaune et le domaine C2 en rouge. Les structures secondaires de EpsE de *V. cholerae* sont présentées au dessus de l'alignement. Les différents motifs conservés sont présentés dans des cadres (*Walker A, Walker B, His Box* et *Asp Box*). Les cystéines conservées dans le domaine C2 sont indiquées par des triangles jaunes. (B) Alignement de deux ATPases de la famille XpsE. La famille XpsE possède un domaine N0 en plus des domaines N1, N2, C1, C_M et C2. Les structures secondaires des domaines N0-N1 de XpsE de *X. campestris* sont présentées au dessus de l'alignement.

La première structure d'une ATPase de trafic d'un système de sécrétion de type II a été résolue par Robien et al en 2003 (Robien *et al.*, 2003) . C'est la structure de EpsE de *V. cholerae* tronquée de son domaine N1 (EpsEΔ90) en présence (code pdb 1P9W) et en absence d'un analogue de l'ATP (AMPPNP) (code pdb 1P9R) (Robien *et al.*, 2003). La structure de EpsEΔ90 contient le domaine N2 de l'ATPase connecté aux trois sous-domaines C1, C_M et C2. Le domaine N2 (résidus 101-225) est formé d'une face concave composée d'un feuillet β antiparallèle à six brins et d'une face convexe constituée de trois hélices αA, αB et αC (figure 18). Le domaine C1 comprend un feuillet β central (résidus 240-392) composé de six brins parallèles et d'un septième brin antiparallèle (résidus 442-450). Ce feuillet β est entouré par trois hélices α sur une face et quatre hélices α sur la face opposée. Le domaine C1 renferme les quatre motifs caractéristiques qui définissent la sous famille des NTPases des systèmes de sécrétion de types II et IV (Planet *et al.*, 2001): les boîtes « *Walker A* », « *Walker B* », « *Asp Box* » et « *His Box* ». Le domaine C_M (résidus 393-441) forme une boucle sinueuse en forme d'épingle à cheveux « *hairpin* » qui renferme le motif tétra-cystéine (C_{397}, C_{400}, C_{430} et C_{433}) capable de lier un ion Zn^{2+}. Enfin, le domaine C2 (résidus 451-500) est composé de quatre hélices α courtes positionnées entre les sous domaine C1 et C_M.

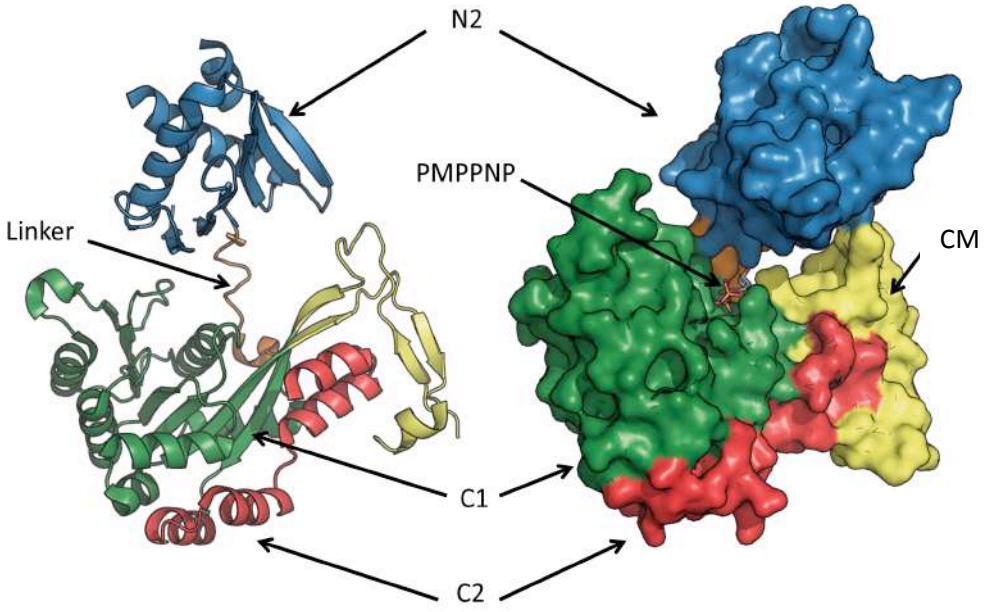


Figure 18 : Structure de l'ATPase de trafic EpsE de *V. cholerae* (code pdb 1P9W). A gauche représentation en « cartoon » des 4 domaines : le domaine N2 en bleu, le domaine C1 en vert, le domaine CM en jaune et le domaine C2 en rouge. A droite, vue de surface des 4 domaines qui participe à la fixation de l'analogue de l'ATP : le PMPPNP.

Une autre structure du domaine N-terminal (résidus 1-152) de l'ATPase de XpsE de *X. campestris* a été résolue (codes pdb 2D27 et 2D28) (figure 19). Cette structure présente les domaines N0 (résidus 1-62) et N1 (résidus 63-152) de la famille XpsE. Le domaine N0 est composé par quatre hélices α nommées α1 à α4. Ces hélices couronnent le domaine N1 formé par un domaine α/β central composé d'un feuillet β à trois brins antiparallèles entourés pas trois hélices α (α5 à α7). La structure du domaine N-terminal de XpsE montre deux conformations structurales différentes au niveau des hélices α1 et α2 couvrant les 36 premiers résidus. La délétion de ces 36 résidus affecte le processus de sécrétion. Par conséquent, il a été suggéré que le domaine N0 de XpsE était la zone de régulation du système de sécrétion chez *X. campestris* (Chen *et al.*, 2005).

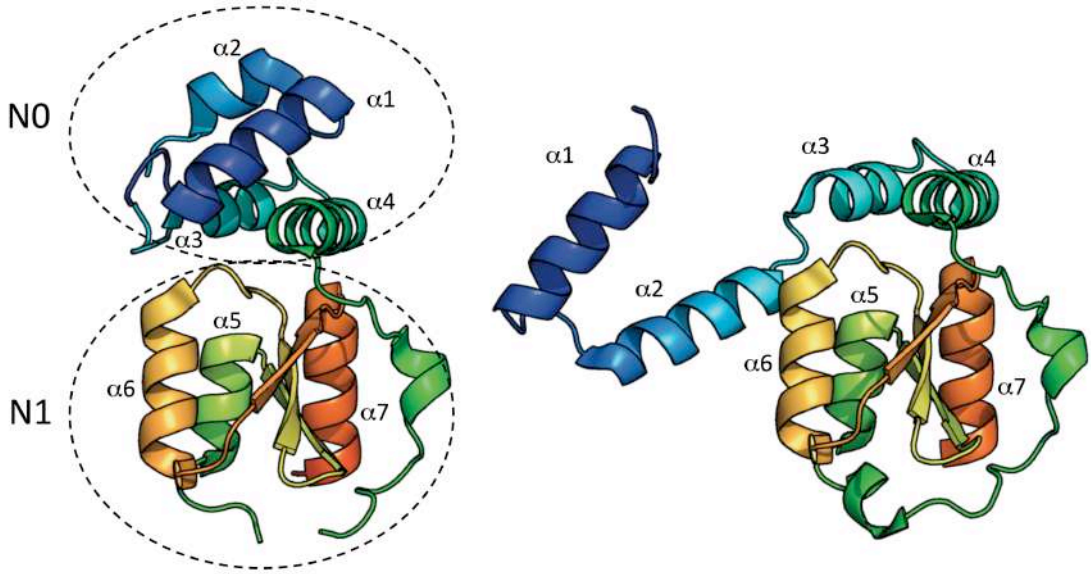


Figure 19 : Structure du domaine N-terminal (N0 et N1) de XpsE de *X. campestris* (code pdb 2D28 (A) et 2D27 (B)). Les deux conformations de XpsE trouvées dans deux groupes d'espèces différents. La différence réside dans le domaine N0.

Les études structurales indiquent que les ATPases de trafic des SST2 et SST4 subissent des changements conformationnels significatifs lorsqu'elles lient les NTPs. De plus, la recherche d'homologues structuraux par le serveur DALI des domaines N2 et C1 de EpsE, a montré que le plus proche homologue structural est l'ATPase de trafic HP0525 du SST4 d'*Helicobacter pylori* (Yeo *et al.*, 2000; Savvides *et al.*, 2003). Les travaux menés sur la protéine HP0525 suggèrent qu'elle puisse former un complexe hexamèrique dynamique agissant comme un pore qui contrôle le passage des protéines.

Des études biochimiques effectuées sur EpsE et XpsE ont montré que les protéines GspE peuvent aussi former des complexes hexamèriques (Possot and Pugsley, 1997; Savvides *et al.*, 2003). En effet, dans le cas de la protéine EpsE de *V. cholerae*, il a été montré que l'activité d'hydrolyse de l'ATP est beaucoup plus importante lorsque EpsE forme des oligomères. De plus, le maximum d'activité est atteint lorsque EpsE est sous forme hexamèrique (Camberg and Sandkvist, 2005). Ce phénomène d'induction de l'homomultimérisation en forme hexamèrique par la fixation de l'ATP a également été montré pour XpsE chez *X. campestris* (Shiue *et al.*, 2006). Par conséquent, Il a été suggéré que les ATPases GspE du SST2 adoptent des formes hexamèriques en présence de l'ATP lors du processus de sécrétion.

II. 3. 5. Analyse du réseau d'interactions entre les protéines de la plateforme de membrane interne

Le processus de sécrétion dans le SST2 repose sur une cascade d'interactions entre les différents composants de la machinerie qui permet la sécrétion des exoprotéines d'une façon spécifique et régulée. Les protéines de la membrane interne sont réparties dans l'espace cytoplasmique et dans le périplasme. Ces protéines forment un complexe multi-protéique appelé la plateforme de membrane interne. GspL est l'élément central de cette plateforme puisqu'il connecte les partenaires de la plateforme de part et d'autre de la membrane interne. En effet, la partie cytoplasique de GspL interagit avec les deux composants de la machinerie : l'ATPase GspE et le domaine cytoplasmique de EpsF. Au niveau du périplasme, GspL interagit avec GspM et GspC.

II. 3. 5. 1. Interaction entre les domaines cytoplasmiques : GspE-GspL-GspF

L'interaction de GspL avec l'ATPase GspE a été validée dans la plupart des SST2 : le système Xcp de *P. aeruginosa* ($XcpY_L$-$XcpR_E$) (Ball *et al.*, 1999), le système Out chez *E. chrysanthemi* (OuL-OutE) (Py *et al.*, 1999), le système Xps chez *X. campestris* (XpsL-XpsE) (Shiue *et al.*, 2006) et le système Eps de *V. cholerae* (Sandkvist *et al.*, 1995).

Par exemple, chez *V. cholerae*, il a été montré que l'association de EpsE à la membrane interne est dépendante de son interaction avec EpsL. La localisation des sites d'interaction entre ces deux protéines a été déterminée par la construction de chimères formées par l'association des domaines de EpsE et de l'ATPase d'*A. hydrophila* ExeE (Sandkvist *et al.*, 1995). Sachant que ExeE est incapable de remplacer EpsE, la chimère qui contient uniquement l'extrémité N-terminale de EpsE (93 résidus) permet de rétablir le processus de sécrétion Eps. Par

conséquent, il a été suggéré que le site d'interaction avec EpsL est localisé dans le domaine N-terminal de EpsE (Sandkvist *et al.*, 1995).

Des résultats similaires ont été obtenus dans le système Out, puisque le site d'interaction de OuL avec OutE est localisé dans la partie N-terminale de OutE (97 résidus N-terminaux) (Py *et al.*, 1999).

La formation de chimères entre EpsL de *V. cholerae* et ExeL d'*A. hydrophila* a été réalisée afin de localiser la région de EpsL responsable de l'interaction avec EpsE (Sandkvist *et al.*, 2000b). Cette méthode a permis de déterminer une zone d'interaction avec EpsE localisée entre les résidus 57 et 216 de EpsL (Sandkvist *et al.*, 2000b; Chen *et al.*, 2005).

Par conséquent, on peut suggérer que l'interaction des GspL avec les GspE qui appartiennent à la famille des EpsE est localisée dans son domaine N1. Ces données biochimiques ont été confirmées par les données structurales apportées par la résolution de la structure du complexe EpsL-EpsE de *V. cholerae* (Abendroth *et al.*, 2005).

La structure du complexe formé par le domaine cytoplasmique de EpsL (résidus 1-241) et le domaine N1 de EpsE (résidus 1-96) a été résolue par cristallographie au rayons X à 2,4Å de résolution (code pdb 2BH1) (Abendroth *et al.*, 2005). La structure montre un complexe tétramérique formé par un dimère du domaine cytoplasmique de EpsL et EpsE. Chaque monomère de EpsL interagit avec un monomère de EpsE (figure 20). La structure de EpsL dans le complexe se superpose parfaitement avec la structure de EpsL non complexée (Abendroth *et al.*, 2004a) (figure 19). On retrouve également un repliement du domaine N1 de EpsE similaire à celui du domaine N1 de XpsE de *X. campestris* (Chen *et al.*, 2005). La surface de contact entre le domaine N-terminal de EpsE et le domaine cytoplasmique de EpsL occupe environ 1700Å^2. La surface de contact fait intervenir des résidus hydrophobes fortement conservés dans la famille des EpsE. Par contre, la surface de contact entre deux monomère de EpsL est d'environ 675Å^2. Les résidus impliqués dans cette surface de contact ne sont pas conservés, ce qui suggère que ce dimère est un artefact de cristallisation (Abendroth *et al.*, 2005).

Dans le cas de XpsE de *X. campestris*, le site d'interaction entre XpsE et XpsL est localisé au niveau du domaine N0 de XpsE (Chen *et al.*, 2005). La comparaison des domaines N1 de EpsE de *V. cholerae* et le domaine N1 de XpsE de *X. campestris* montre que les deux domaines présentent le même repliement. Cependant, ces deux domaines ne présentent que 10% d'identité de séquence. La comparaison des séquences au niveau du site de fixation de EpsE sur

EpsL et de XpsE sur XpsL ne montre aucune similarité de séquences. Ceci suggère que le mode d'interaction entre les domaines XpsL-XpsE de *X. campestris* est différent de celui de EpsE-EpsL de *V. cholerae*.

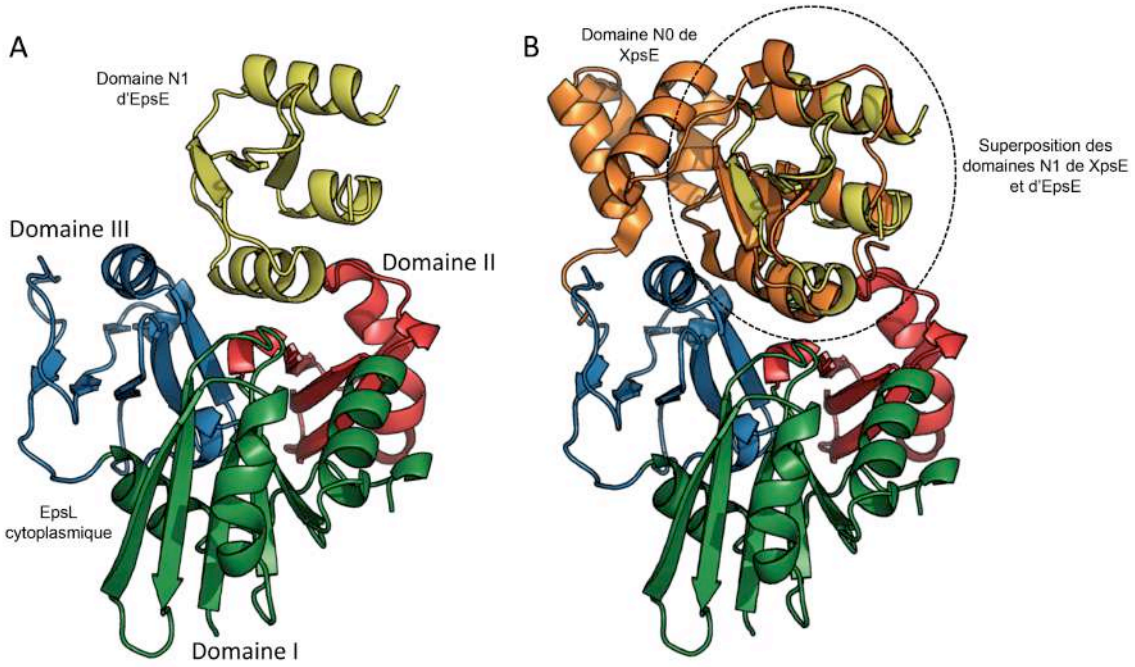


Figure 20 : Structure du complexe EpsL-EpsE de *V. cholerae* (code pdb 2BH1). (A) Le domaine I présenté en vert, domaine II en rouge et domaine III en bleu. La structure de EpsL est présentée en jaune. (B) Superposition du domaine N0-N1 (orange) de XpsE avec le domaine N1 (jaune) de EpsE complexé avec EpsL.

Toutefois, il a été montré que l'interaction de GspL avec GspE permet de réguler l'activité ATPasique de GspE ainsi que son oligomérisation (Camberg and Sandkvist, 2005). Les travaux menés sur EpsE-EpsL de *V. cholerae*, ont montré que l'activité d'hydrolyse de l'ATP de EpsE ainsi que son interaction avec EpsL sont stimulées par l'interaction avec les phospholipides (Camberg *et al.*, 2007). D'autres résultats obtenus sur la protéine XpsE de *X. campestris* montrent que l'oligomérisation et la liaison à XpsL est dépendante de la fixation de l'ATP et non à son hydrolyse. XpsE sous forme monomérique présente une très faible activité ATPase par rapport à la forme oligomérique. L'association à XpsL stimule donc l'activité ATPase. De plus, La mutation au niveau du motif *Walker A* diminue l'hydrolyse de l'ATP sans affecter l'association à XpsL. Ces résultats suggèrent alors que l'association de XpsE à XpsL précède l'hydrolyse de l'ATP (Shiue *et al.*, 2006).

Un modèle de l'association de XpsL à XpsE a été proposé par Shiue et al (Shiue *et al.*, 2006). Lors de la première étape, les monomères de XpsE fixent l'ATP. L'association à l'ATP

induit alors des changements conformationnels de l'ATPase (Shiue *et al.*, 2007). Les monomères de XpsE forment alors un complexe hexamèrique qui se lie à XpsL ancrée dans la membrane interne. Cette association des XpsE en hexamère ainsi que leur interaction avec XpsL permet l'hydrolyse de l'ATP.

Le complexe de GspL-GspE formé à proximité de la membrane interne s'avère être stabilisé par un autre composant de la machinerie : la protéine GspF. GspF est ancrée dans la membrane interne avec trois segments transmembranaires et deux domaines cytoplasmiques. Le rôle de GspF dans la machinerie est inconnu. Cependant, sa délétion entraîne la perte du processus de sécrétion (Arts *et al.*, 2007). Chez *E. chrysanthemi*, il a été montré par des études systématiques d'interaction protéine-protéine de double hybride, que la protéine OutF à travers son premier domaine cytoplasmique interagit avec OutL et OutE (Py *et al.*, 2001). Cette interaction est réalisée par le domaine N-terminal de OutF (Py *et al.*, 2001). Les mêmes résultats ont été obtenus dans le cas des protéines EpsF et EpsL de *V. cholerae*. Cependant, chez *P. aeruginosa*, il a été montré que le domaine C-terminal cytoplasmique de $XcpS_F$ stabilise le complexe formé par $XcpY_L$-R_E (Arts *et al.*, 2007).

II. 3. 5. 2. Interaction entre les domaines périplasmiques : GspL-GspM-GspC

L'interaction entre les domaines périplasmiques de GspL et GspM a été décrite dans plusieurs systèmes de sécrétion (Michel *et al.*, 1998; Sandkvist *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001; Py *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2002; Douet *et al.*, 2004; Robert *et al.*, 2005). Ces deux protéines forment le complexe le plus stable de la plateforme de membrane interne (Robert *et al.*, 2005). Chez *P. aeruginosa*, Robert et al ont identifié trois domaines de $XcpZ_M$ importants pour son interaction avec $XcpY_L$ (Robert *et al.*, 2002). Le domaine I est localisé dans la région à proximité du résidu 65. Le domaine II est localisé dans la partie C-terminale (résidus 127 à 141). Le domaine III se situe dans la partie transmembranaire (résidus 45 à 58). Ce domaine ne permet la stabilisation de $XcpY_L$ qu'en présence de $XcpP_C$ (Robert *et al.*, 2002). Chez *X. campestris*, il a été montré que XpsL-XpsM-XpsC forment un complexe ternaire. Ce complexe ternaire est formé par l'interaction de XpsL avec XpsM et l'interaction de XpsM avec XpsC (Tsai *et al.*, 2002).

L'étude du réseau d'interactions des protéines de la plateforme de membrane interne met en évidence le rôle clé de GspL dans la connexion des protéines du sécréton à travers le cytoplasme et l'espace périplasmique. Un modèle schématique du complexe GspE-GspL-GspM a été proposé par Abendroth *et al* (Abendroth *et al.*, 2009a) (figure 21). Ce modèle repose sur les

informations structurales et biochimiques des domaines cytoplasmiques de GspL et GspE et des domaines périplasmiques de GspL et GspM.

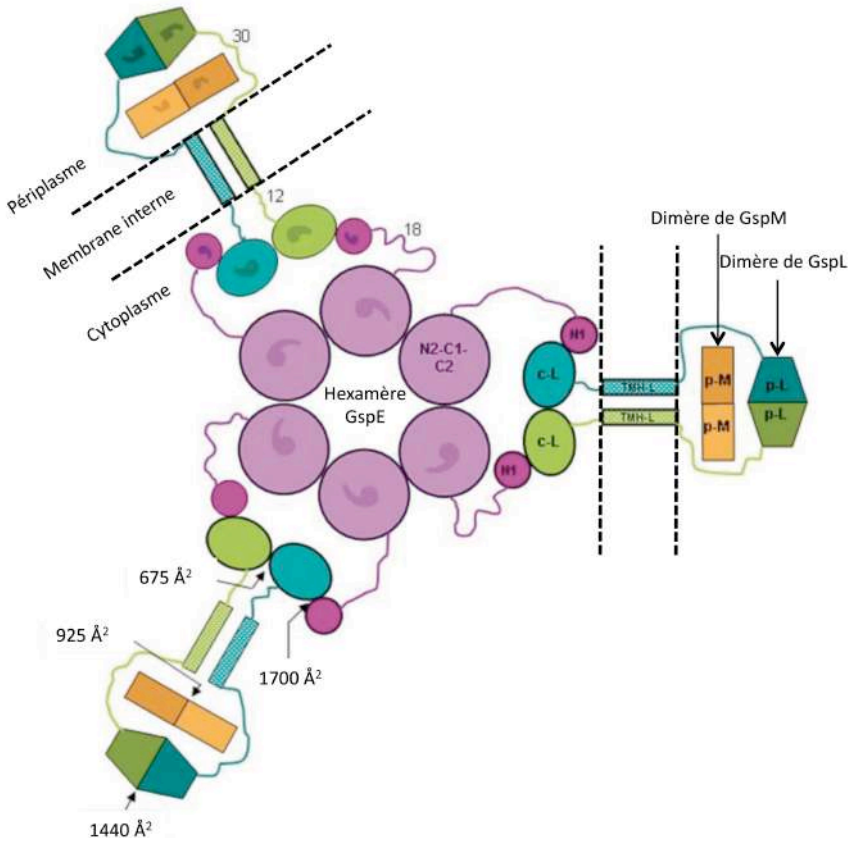


Figure 21 : Représentation schématique d'un modèle d'association des composants GspE, GspL et GspM de la plateforme de la membrane interne. GspE (violet) forme un complexe hexamèrique au niveau du cytoplasme avec ses domaines N2-C1-CM-C2 (Robien *et al.*, 2003). Avec son domaine N1, elle interagit avec le dimère du domaine cytoplasmique de GspL : c-L (vert et bleu) (Abendroth *et al.*, 2005). La surface de contact entre le domaine N1 de GspE et le domaine cytoplasmique de GspL est de 1700 Å² (Abendroth *et al.*, 2005). Le dimère de GspL qui présente au niveau du cytoplasme une surface de contact de 675Å² (Abendroth *et al.*, 2004a). Les domaines périplasmiques des GspL : p-L forment aussi des dimères avec une surface de contact de 1440Å² (Abendroth *et al.*, 2009a). Les domaines périplasmiques de GspL interagissent avec GspM : p-M (orange) (Sandkvist *et al.*, 1999; Sandkvist *et al.*, 2000a). Les protéines GspM forment des dimères avec une surface de contact de 925Å² (Abendroth *et al.*, 2004b). Adaptée de Abendroth *et al* (Abendroth *et al.*, 2009a).

Au niveau du cytoplasme, les protéines GspE forment un hexamère en fixant l'ATP. Ce complexe hexamèrique s'associe à la membrane cytoplasmique à travers l'interaction avec GspL. L'interaction entre ces deux partenaires est réalisée par les domaines N1 des ATPases et le domaine cytoplasmique des GspL. Chaque dimère des GspL est associé à deux monomères des GspE. Ainsi, le dimère de GspL, qui s'étend dans l'espace périplasmique, interagit avec un dimère de GspM.

II. 4. Connexion de la plateforme de la membrane interne au pore de sécrétion

Le rôle de GspC en tant qu'élément permettant la connexion de la plateforme de la membrane interne à la sécrétine a été partiellement élucidé dans les travaux de Lybarger *et al* (Lybarger *et al.*, 2009). Ces travaux effectués chez *V. cholerae*, reposent sur la localisation cellulaire et la formation de foci fluorescents des protéines EpsC et EpsM fusionnées à la protéine GFP en absence et en présence des autres partenaires du sécréton. Dans cette étude, les gènes *epsC* et *epsM* ont été remplacés par les gènes codant pour les chimères fusionnées à la GFP. Ainsi, les gènes *epsM-GFP* et *epsC-GFP* sont exprimés au niveau chromosomique dans un contexte biologique. Les foci fluorescents observés (figure 22A) indiquent donc les sites physiologiques d'assemblage du sécréton.

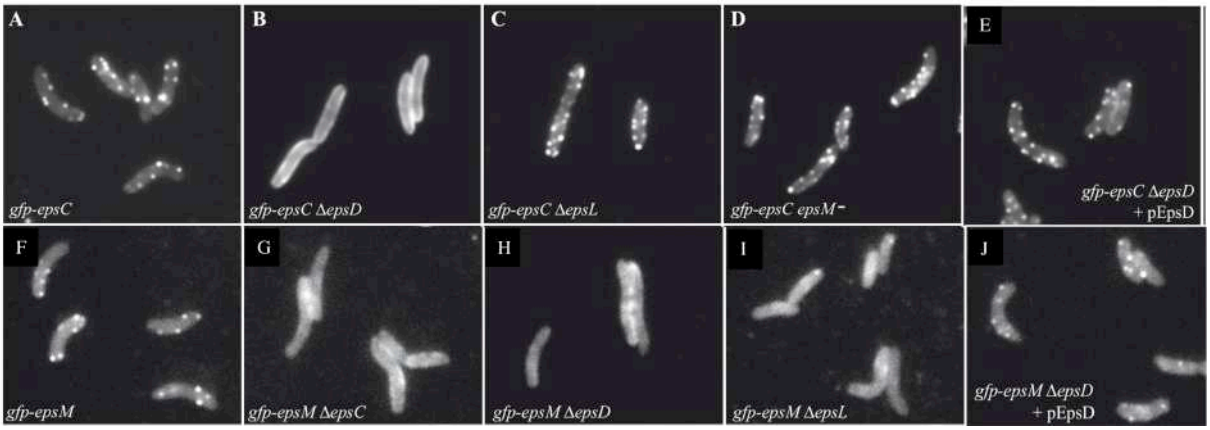


Figure 22 : Localisation des protéines fluorescentes GFP-EpsC et GFP-EspM en absence et en présence des composants du sécréton chez *V. cholerae*. (A) La fusion GFP-EpsC forme des foci denses à la périphérie des cellules. (B) En absence de EpsD, GFP-EpsC diffuse dans toute l'enveloppe de la cellule. (C&D) En absence de EpsL et EpsM, GFP-EpsC est capable de former des foci fluorescents comparés au panneau (A). (E) En présence d'un vecteur qui code pour EpsD dans un mutant du gène *epsD*, GFP-EpsC est capable de former des foci. (F) GFP-EpsM forme des foci à la périphérie des cellules. (G, H, I) GFP-EpsM diffuse dans toutes les cellules en absence des gènes codant pour EpsC, EpsD et EpsL. (J) En présence de EpsD, EpsM est capable de former des foci. Adaptée de Lybarger *et al* (Lybarger *et al.*, 2009).

Dans un mutant délété du gène *epsD* qui code pour la sécrétine, EpsC est totalement dispersée dans le périplasme (figure 22 B). Cependant, dans la souche sauvage, EpsC forme des foci denses. Dans un mutant délété des gènes *epsM* et *epsL*, EpsC est capable de former des foci comme dans la souche sauvage. On peut alors suggérer que la localisation cellulaire de EpsC en foci dépend uniquement de la présence de la sécrétine EpsD (figure 22 C, D, E). Cependant, chez un mutant délété des gènes *epsD*, *espC* et *epsL*, EpsM est dispersée dans la cellule (figure 22 F, G, H, I). Ceci prouve que EpsM dépend des protéines EpsD, EpsC et EpsL pour s'associer au sécréton.

Les auteurs proposent alors que la première étape d'assemblage du sécréton est l'insertion de la sécrétine dans la membrane externe et la formation du pore de sécrétion. Ensuite la protéine EspC interagirait avec le pore de sécrétion ce qui permettrait de lier la plateforme de la membrane interne à travers son interaction avec le complexe EpsM-EpsL (Lybarger *et al*., 2009).

II. 5. Modèle intermédiaire d'assemblage du sécréton

Sur la base des informations structurales et biochimiques décrites dans les paragraphes précédents, il est possible de proposer un modèle intermédiaire d'assemblage du sécréton (figure 23) (Nunn, 1999; Filloux, 2004; Johnson *et al.*, 2006; Cianciotto, 2009; Durand *et al.*, 2009). Ce modèle qui intègre principalement les données structurales sur le SST2 chez *V. cholerae* peut être cependant généralisé à la plupart des SST2 en raison des fortes homologies entre les différents partenaires des sécrétons. Dans le modèle intermédiaire proposé du sécréton, le pseudopilus n'est pas présenté. Nous proposons que son assemblage intervienne après l'étape 6 et en présence des exoprotéines.

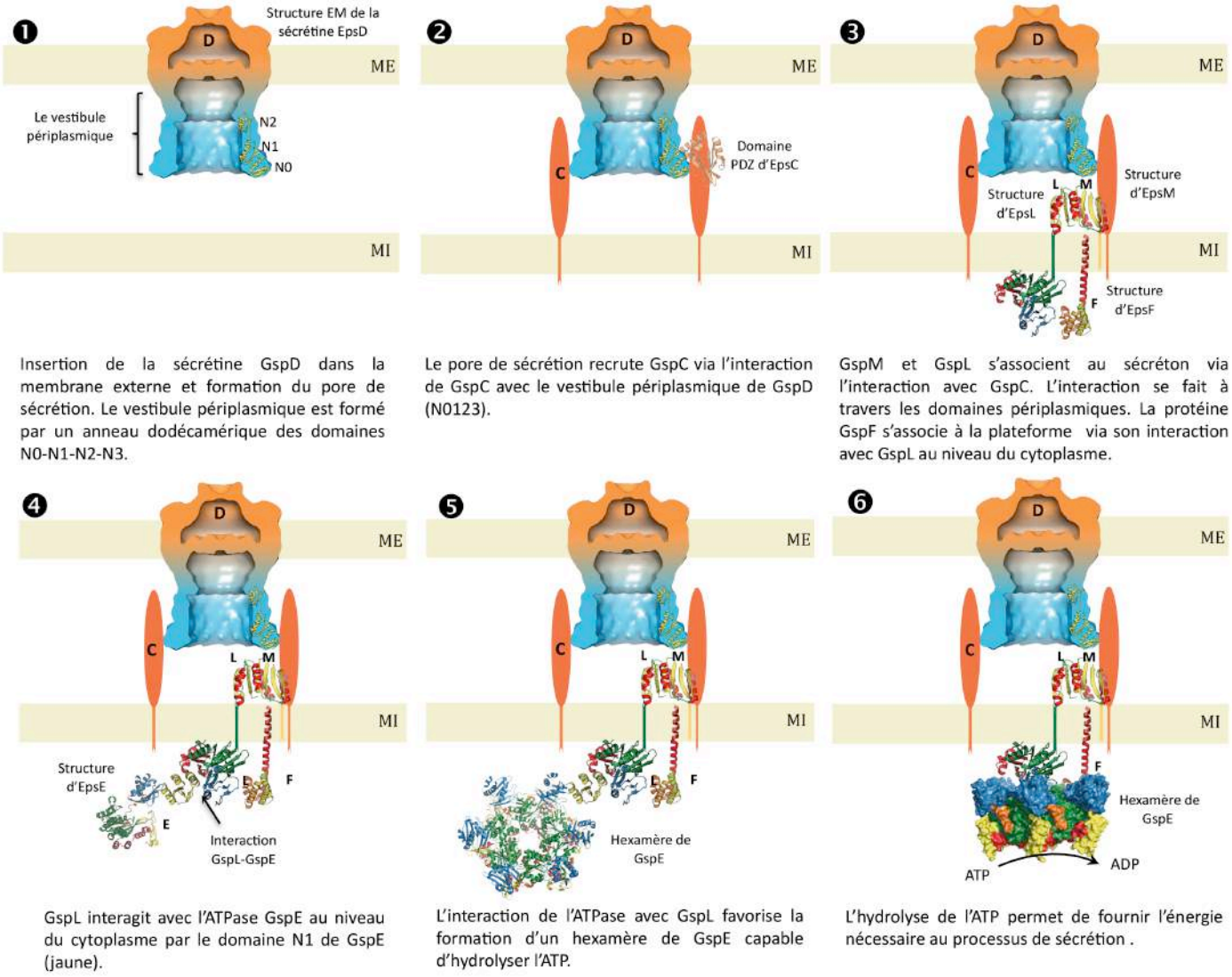


Figure 23 : Modèle d'assemblage de la plateforme de la membrane interne et du pore de sécrétion. La première étape dans l'assemblage du sécréton est la mise en place du pore de sécrétion formé par la multimérisation de GspD en dodécamère. La sécrétine est formée par deux domaines : le domaine « C » ancré dans la membrane externe et le domaine « N » localisé dans l'espace périplasmique. Une fois le pore formé, la protéine GspC est recrutée par le pore à travers l'interaction du domaine HR de GspC avec le vestibule périplasmique de GspD. Les protéines GspM et GspL s'associent à GspC via leur interaction avec les domaines périplasmiques. GspL est composée de deux domaines : un domaine périplasmique qui interagit avec GspM et un domaine cytoplasmique qui interagit avec GspF et l'ATPase de trafic GspE. GspF s'associe alors à GspL au niveau du cytoplasme. Le site d'interaction de GspE avec GspL est localisé au niveau du domaine N1 de GspE. Une fois GspE associée à GspL, elle fixe l'ATP. La fixation de l'ATP permet la multimérisation de GspE et la formation d'un complexe hexamèrique. L'organisation hexamèrique favorise l'hydrolyse de l'ATP et permet alors le processus de sécrétion.

II. 6. Le Pseudopilus : Le piston de la machinerie

Le pseudopilus est un complexe multiprotéique de la machinerie de sécrétion de type II. Il est formé par la pseudopiline majeure GspG et les quatre pseudopilines mineures GspI, GspH, GspJ et GspK (Nunn and Lory, 1993; Sauvonnet *et al.*, 2000; Vignon *et al.*, 2003). Les pseudopilines sont apparentées aux pilines des systèmes de piliation de type 4 (SPT4) avec lesquelles elles partagent plusieurs caractéristiques communes : i) un même processus de maturation, ii) une région N-terminale très conservée répartie sur les 30 premiers résidus, iii) une organisation structurale similaire avec une hélice N-terminale et un domaine C-terminal globulaire (Hobbs and Mattick, 1993; Forest and Tainer, 1997; Peabody *et al.*, 2003; Filloux, 2004; Johnson *et al.*, 2006; Durand *et al.*, 2009). C'est pourquoi, il a été proposé que les pseudopilines s'assemblent en un filament hélicoïdal périplasmique semblable à celui retrouvé dans les SPT4 (Filloux, 2004; Johnson *et al.*, 2006). Le rôle du pseudopilus dans le SST2 reste énigmatique. Cependant, il a été suggéré qu'il fonctionne comme un piston qui permet d'éjecter les exoprotéines à travers le pore de sécrétion (Shevchik *et al.*, 1997; Filloux *et al.*, 1998; Nunn, 1999; Filloux, 2004).

II. 6. 1. Maturation des pseudopilines et des pilines

Les pseudopilines ainsi que les pilines sont synthétisées sous formes de précurseurs qui sont maturés par une enzyme spécifique appelée la prépiline peptidase GspO/PilD qui permet le clivage d'une pré-séquence N-terminale (Strom *et al.*, 1991; Bally *et al.*, 1992; Nunn and Lory, 1992; Pugsley and Dupuy, 1992; Tommassen *et al.*, 1992; Bleves *et al.*, 1998; Marsh and Taylor, 1998) (figure 24). Cette pré-sequence est composée de 6 à 7 résidus constitués majoritairement de charges positives. Elle précède un domaine hydrophobe d'une vingtaine de résidus très conservés qui permet à la fois l'export des pseudopilines par les systèmes SRP et Sec vers la membrane interne puis leur ancrage dans la membrane interne (Francetic *et al.*, 2007). GspO permet, grâce à son activité peptidase, de cliver la pré-séquence au niveau d'un résidu très conservé : la glycine en position -1 par rapport à la séquence mature (Filloux, 2004). Il a été montré que le résidu G(-1) est essentiel à la maturation des pilines et des pseudopilines ainsi qu'aux processus de formation des pili et de sécrétion qui leurs sont associés (Strom and Lory, 1991; Bleves *et al.*, 1998). Le nouveau résidu N-terminal, qui peut être soit une phénylalanine F(+1) soit un résidu hydrophobe telle une méthionine ou une leucine, est méthylé par GspO également dotée d'une activité méthyltransférase (MTase) (Nunn and Lory, 1993; Strom *et al.*, 1994).

En plus des deux résidus conservés G(-1) et F(+1), un autre résidu, l'acide glutamique en position +5 s'avère très conservé chez les pilines et les pseudopilines. Ce résidu est un facteur déterminant dans l'assemblage des sous-unités des deux machineries en pilus/pseudopilus, puisque la substitution du E(+5) en valine (E5V) affecte la méthylation des sous-unités ainsi que leur association en pilus mais n'affecte pas le clivage de la présequence. Par contre, la mutation F(+1) en serine n'affecte ni la maturation, ni l'assemblage des pilines mais altère uniquement la N-méthylation (Strom and Lory, 1991). Donc, seul le rôle de la méthylation du résidu N-terminal est jusqu'à présent mal compris.

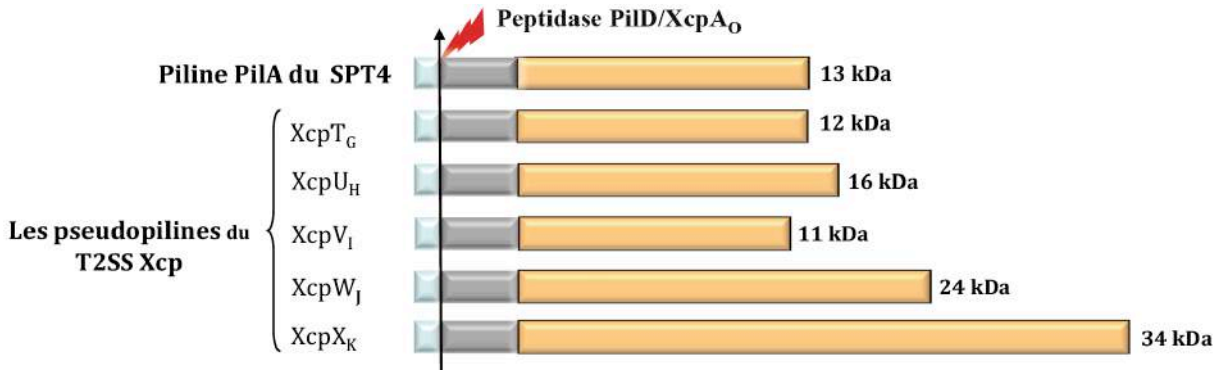


Figure 24 : Maturation de la piline majeure PilA du SPT4 et des pseudopilines du SST2 Xcp par la prépiline peptidase PilD/XcpA$_O$ chez *P. aeruginosa*. La pré-séquence N-terminale (en bleu) est clivée par la prépiline peptidase PilD/XcpA$_O$. Les pilines/pseudopilines matures sont composées d'un domaine N-terminal hydrophobe (gris) et d'un domaine soluble (orange). Les poids moléculaires des domaines solubles sont indiqués à coté de la protéine correspondante.

II. 6. 2. Les pili de type IV

Les pili de type IV sont des fibres protéiques produites par de nombreuses bactéries à Gram-négatif (Craig *et al.*, 2004; Hazes and Frost, 2008). Les pili sont présents à la surface externe des bactéries où ils interviennent dans plusieurs fonctions dont l'adhérence, la motilité, la formation de micro-colonies et la sécrétion des facteurs de virulence et de colonisation (Hager *et al.*, 2006; Craig and Li, 2008). Les pili sont des fibres extrêmement fines (60 à 80Å de diamètre) et longues (de plusieurs microns de longueurs) (figure 25). Les pili sont des filaments dynamiques avec des mouvements d'assemblage et de rétraction extrêmement rapides (Maier *et al.*, 2004; Clausen *et al.*, 2009a; Clausen *et al.*, 2009b).

Les pili sont des homomultimères constitués de sous-unités appelées les pilines majeures dont le poids moléculaire varie entre 15 et 20kDa. Plusieurs structures des pilines

majeures ont été déterminées : PilE de *N. gonorrhoeae*, PilA et PilA^{PAK} de deux souches de *P. aeruginosa*, BfpA d'*E. coli* enteropathogénique (EPEC) et TcpA de *V. cholerae* (Parge *et al.*, 1995; Hazes *et al.*, 2000; Craig *et al.*, 2003; Ramboarina *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2010).

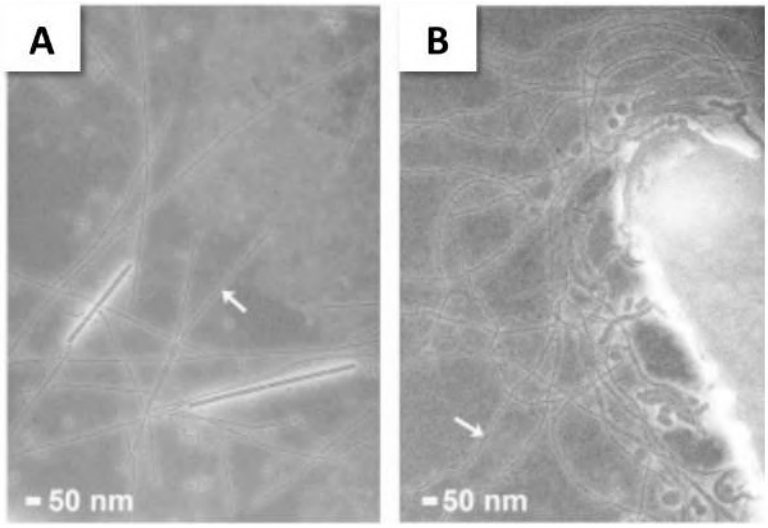


Figure 25 : Observation en microscopie électronique des pili de type IV chez *N. gonorrhoeae* (A) et chez *V. cholerae* (B). Les pili sont indiqués par des flèches. Les virus de *Tobacco mosaic* de 18nm de diamètre sont présents en (A). Adaptée de Craig *et al* (Craig *et al.*, 2004).

Ces pilines partagent un motif α/β caractéristique appelé le motif « piline ». Ce motif est composé d'une hélice α N-terminale, d'un domaine variable et d'un domaine C-terminal avec un feuillet β à plusieurs brins antiparallèles contenant un pont disulfure situé au niveau de son extrémité C-terminale qui délimite une région appelée la « région D » (figure 26D) (Parge *et al.*, 1995; Forest and Tainer, 1997). Un modèle d'assemblage de la piline PilE (code pdb 2HIL) de *N. gonorrhoaea* en pilus a été proposé en se basant sur la structure du pilus déterminée par microscopie électronique à 12,5Å de résolution (figure 26 A, B, C, E, F) (Craig *et al.*, 2006). Le modèle est basé sur les interactions entre les extrémités hydrophobes des hélices N-terminales de chaque protomère. Les hélices forment l'axe du pilus avec un pas de 10.5Å entre deux protomères successifs (N, N+1) (figure 26G). Les domaines globulaires sont exposés à l'extérieur de la fibre hélicoïdale, ce qui confirme le rôle des domaines globulaires dans l'adhérence cellulaire (Craig *et al.*, 2006). Dans ce modèle, les E(+5) des protomères N sont positionnés de façon à former des ponts salins avec les F(+1) N-terminales des protomères N+1 (figure 26G) (Parge *et al.*, 1995; Craig *et al.*, 2003; Craig *et al.*, 2006).

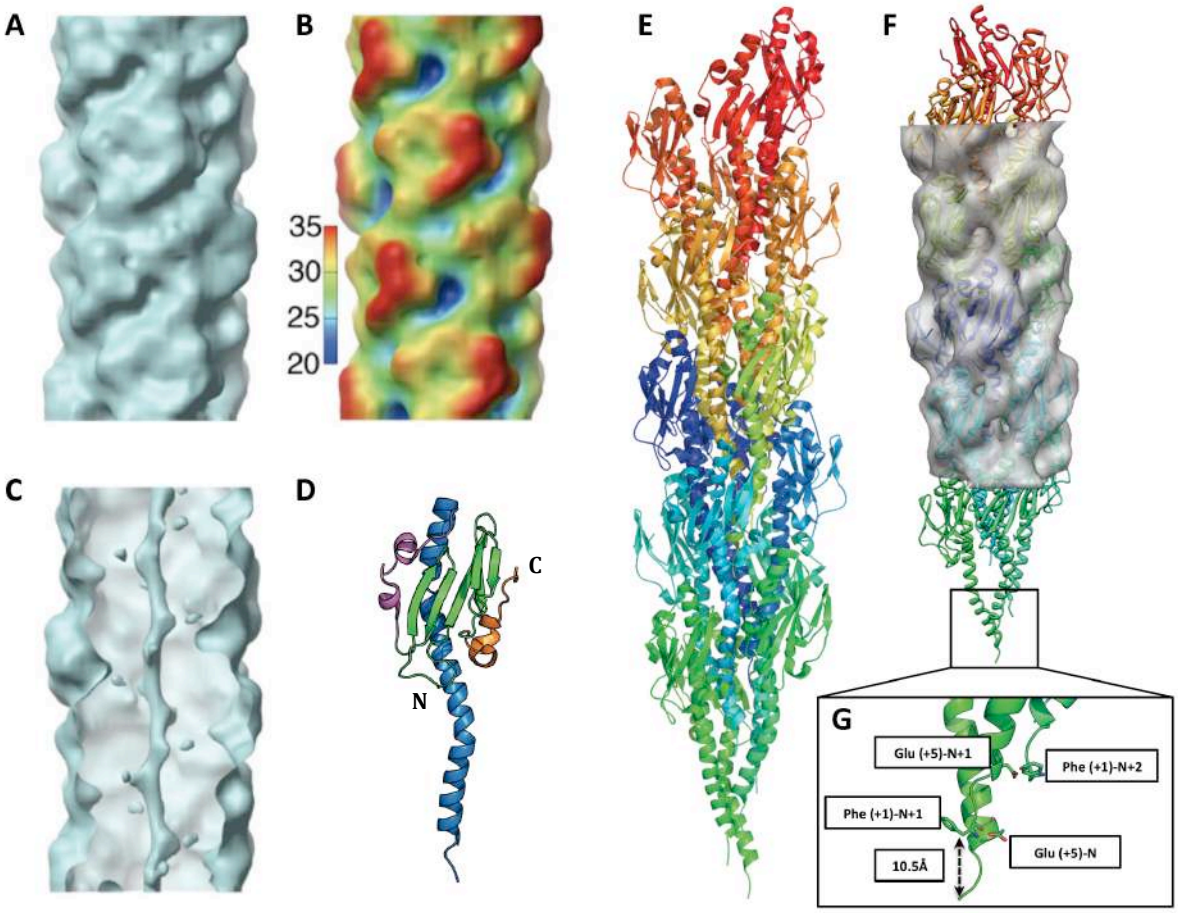


Figure 26 : Modèle d'assemblage des pili de type IV sur la base des observations en microscopie électronique et de la structure de PilE de *N. gonorrhoeae* (Craig *et al.*, 2006). (A) Structure du pilus à basse résolution (12,5Å). (B) Coloration de la structure du pilus par rapport à la distance axiale. (C) Coupe longitudinale du pilus montrant l'existence d'un axe central. (D) Structure de la piline PilE (code pdb 2HIL). L'hélice α N-terminale est présentée en bleu, le domaine variable en violet, le feuillet β en vert et la région D en orange. (E) Modèle d'assemblage des pilines PilE en pilus. Le modèle est basé sur la structure du pilus montrant que les pilines s'associent entre elles au niveau des hélices N-terminales. (F) Vue de face de l'arrimage moléculaire « *docking* » du modèle d'assemblage des pilines PilE dans l'enveloppe du pilus générée par microscopie électronique. (G) L'association des pilines au niveau du pilus implique les extrémités N-terminales des hélices α qui interagissent entre elles par des interactions hydrophobes. Les hélices sont organisées de façon à former un pont salin entre la F(+1) du protomère N avec la E(+5) du protomère N+1. Le pas entre deux protomères successifs est de 10,5Å.

II. 6. 3. Formation du pseudopilus et de l'hyper-pseudopilus (HPP)

Dans le mécanisme de sécrétion de type II, l'hypothèse de l'existence d'une structure qui traverse le périplasme afin de permettre l'export des exoprotéines à travers le pore de sécrétion a été proposée depuis longtemps (Hobbs and Mattick, 1993; Shevchik *et al.*, 1997; Filloux *et al.*, 1998). Les études de topologie des pseudopilines ont montré que ces dernières sont des protéines de la membrane interne. Cependant, et dans des conditions de surproduction, les pseudopilines matures sont localisées au niveau de la membrane externe (Bally *et al.*, 1992). Ces observations pourraient indiquer une réelle relocalisation ou un assemblage des pseudopilines en un complexe multimérique qui co-fractionnerait avec la membrane externe (Filloux, 2004).

L'assemblage du pseudopilus en filaments qui ressemblent aux pili de type IV a été mis en évidence pour la première fois pour les protéines du système de sécrétion Pul de *K. oxytoca* reconstitué chez *E. coli K12* (figure 27A) (Sauvonnet *et al.*, 2000). Les observations en microscopie électronique réalisées après immuno-marquage de la protéine PulG ont révélé que ces appendices sont formés par la pseudopiline majeure PulG (figure 27A). La formation de tels appendices extracellulaires appelés hyper-pseudopilus (HPP) est considérée comme le résultat d'une élongation non contrôlée du pseudopilus périplasmique normalement localisé au niveau du périplasme dans les conditions physiologiques. En effet, chez *X. campestris*, il a été montré que dans les conditions physiologiques, la pseudopiline majeure XpsG forme un complexe protéique soluble de haut poids moléculaire (>440 kDa) retrouvé dans la fraction périplasmique (Hu *et al.*, 2002). Ces observations indiquent que la formation du pseudopilus périplasmique est un processus contrôlé qui permet dans les conditions physiologique la sécrétion des exoprotéines et non la formation d'appendices à la surface cellulaire.

La formation d'un HPP a été également observée chez *P. aeruginosa* et *X. campestris* lors de la surproduction des pseudopilines majeures $XcpT_G$ et XpsG respectivement (Hu *et al.*, 2002; Durand *et al.*, 2003). Cette propriété de former des structures « pilus-like » a été validée pour plusieurs pseudopilines majeures homologues à PulG comme GspG d'*E. coli*, ExeG d'*A. hydrophila*, OutG d'*E. carotovora*, EpsG de *V. cholerae* et $XcpT_G$ de *P. aeruginosa* dont les gènes correspondants complémentent une mutation de *PulG* (Durand *et al.*, 2003; Vignon *et al.*, 2003).

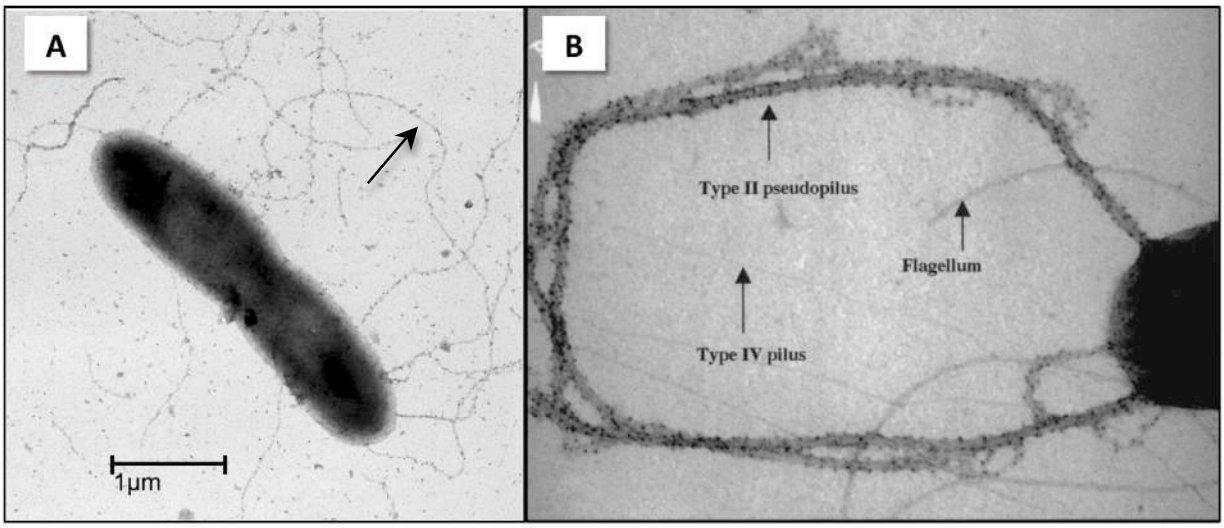


Figure 27 : Observation en microscopie électronique de l'HPP. (A) Observation de l'HPP formée par la surproduction de PulG par *E. coli K12* qui contient le cluster qui code pour le système Pul. (B) Observation de l'HPP généré par la surproduction de $XcpT_G$ chez *P. aeruginosa*. Les HPPs ainsi que les pili de type IV et les flagelles sont indiqués par des flèches. Adaptée de Vignon *et al* (Vignon *et al.*, 2003)et Durand et al (Durand *et al.*, 2003).

II. 6. 4. La pseudopiline majeure GspG

La pseudopiline GspG est le constituant le plus abondant de la machinerie de sécrétion de type II. Les proportions approximatives des différentes pseudopilines chez *P. aeruginosa* ont été estimées à 16:1:1:4 respectivement pour $XcpT_G$, $XcpU_H$, $XcpV_I$ et $XcpW_J$ (Nunn and Lory, 1993). Il a été montré que la machinerie de sécrétion Pul de *K. oxytoca* permet l'assemblage en HPP de la pseudopiline majeure des autres SST2 (Vignon *et al.*, 2003). Ceci peut s'expliquer par la forte identité de séquences entre les pseudopilines majeures des différents sécrétons (Vignon *et al.*, 2003). De plus, ces homologues permettent aussi de restaurer la sécrétion de la pullulanase PulA chez un mutant délété du gène codant pour la protéine PulG (Vignon *et al.*, 2003). Ces observations suggèrent que les pseudopilines majeures n'interviennent pas dans le processus de reconnaissance des exoprotéines et que leur rôle dans la machinerie est plutôt architectural et limité à la formation d'un pseudopilus périplasmique.

II. 6. 4. 1. Etude structurale de GspG

La structure du domaine soluble tronqué de l'extrémité N-terminale hydrophobe (20 résidus) de la protéine PulG de *K. oxytoca* a été obtenue par cristallographie aux rayons X en 2004 (code pdb 1T92) (Kohler *et al.*, 2004). Cette structure présente une organisation dimérique

non détectée dans les étapes de purification. Chaque monomère (résidus 25 à 134) est organisé suivant le motif piline caractéristique des pilines des SPT4 (figure 28 A&B). PulG est composée d'une longue hélice α N-terminale (résidus 54 à 98), suivie du domaine variable contenant une hélice 3_{10} et d'un feuillet β à 4 brins antiparalelles (β1 à β4). Le brin β4 interagit avec le brin β3 du second monomère formant ainsi un feuillet à 4 brins intermoléculaires (figure 28A). Cependant, malgré une interface de 1100Å^2 entre les deux monomères, ce dimère serait le résultat d'un artefact de cristallisation. L'agencement tête-bêche des deux monomères est incompatible avec la formation d'un pseudopilus en se basant sur les structures des pili de type IV et de l'HPP (Kohler *et al.*, 2004).

D'autres structures du domaine soluble des pseudopilines majeures ont été déterminées par cristallographie aux rayons X. Il s'agit des structures de GspG d'*E. coli* entérohémorragique (EHEC) (code pdb 3G20), EpsG des *V. Cholerae* (code pdb 3FU1), et *V. vulnificus* (code pdb 3GN9) (Korotkov *et al.*, 2009a) (figure 28C). Ces trois structures présentent un repliement semblable à leur homologue PulG de *K. oxytoca*. En effet, on retrouve le motif piline avec l'hélice α N-terminale, le domaine variable et le feuillet β C-terminal. Cependant, quelques particularités ont été révélées par rapport à la structure de PulG : la forme dimérique est observée uniquement chez EpsG de *V. cholerae*, alors que les deux autres protéines sont présentes en forme trimérique dans le cas de *V. vulnificus* et monomérique pour EpsG d'EHEC.

Toutefois, la différence la plus marquante entre PulG et les autres pseudopilines majeures est l'absence d'un brin β4 qui est remplacé par une courte hélice α (figure 28A&C). De plus, la boucle qui connecte les brins β2 et β3 chez PulG s'avère plus longue dans les 3 autres structures. Cette boucle retrouvée dans les 3 structures permet la fixation d'un ion calcium stabilisé par deux résidus conservés dans la famille des pseudopilines majeures : D116 et D127.

Il a été montré que le processus de sécrétion était dépendant de la fixation des ions Ca^{2+} puisque chez un double mutant D116A et D127A, aucune activité de sécrétion n'a été détectée. Les auteurs ont également montré que les protéines contenant la double mutation ainsi que les protéines incubées en présence d'EDTA étaient moins stables que la protéine native. On peut alors supposer que la fixation des ions Ca^{2+} permet de stabiliser cette boucle et de la maintenir dans un repliement bien adapté au processus de sécrétion (Korotkov *et al.*, 2009a). L'importance des ions Ca^{2+} dans la sécrétion peut donc se manifester au niveau du repliement des sous-unités et leur assemblage en pseudopilus. Il aurait été intéressant de voir si la surproduction du double mutant conduisait ou non à la formation de l'HPP.

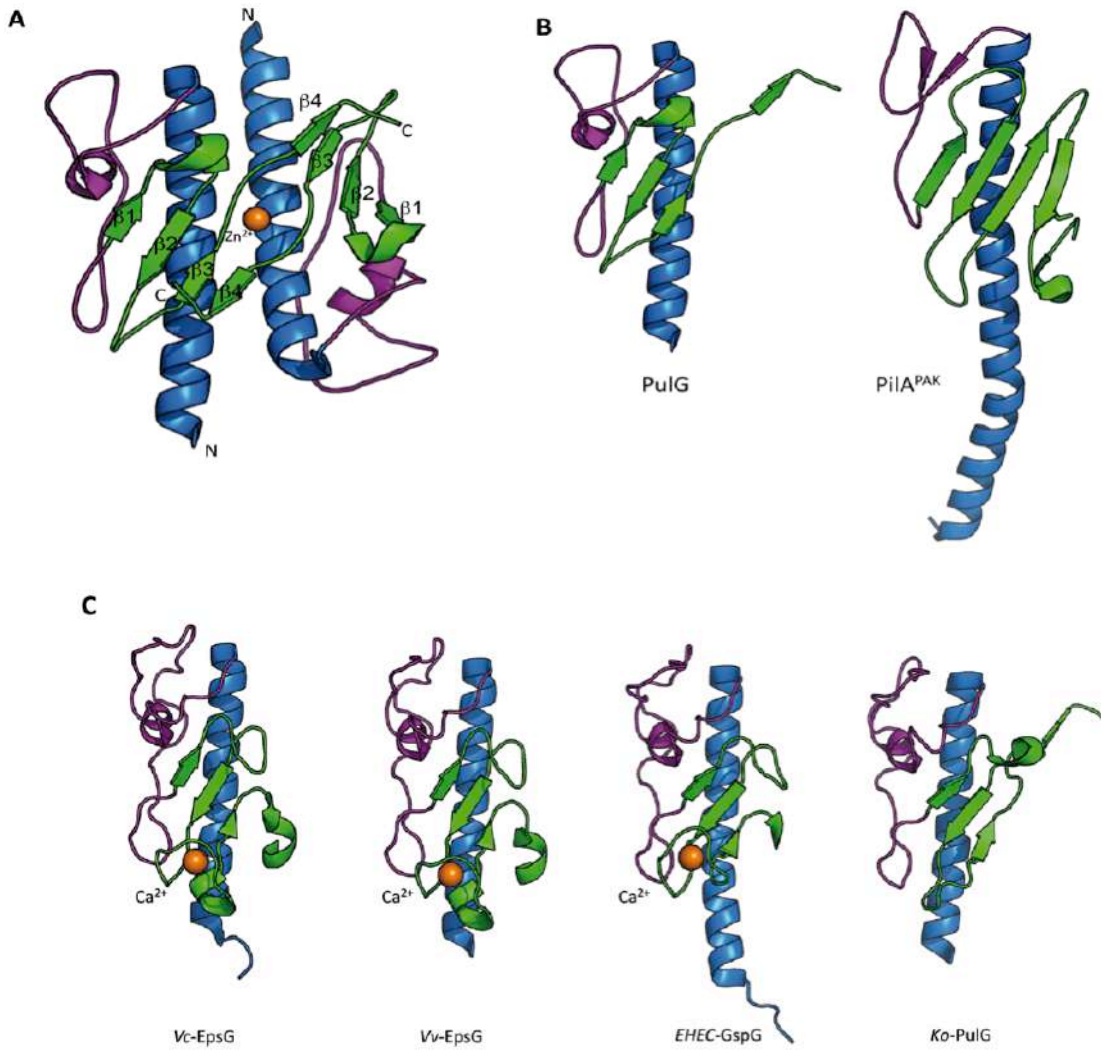


Figure 28 : Représentation des structures des pseudopilines majeures GspG. Le domaine N-terminal est présenté en bleu, le domaine C-terminal en vert et le domaine variable en violet. (A) Structure dimérique de PulG de *K. oxytoca* (code pdb 1T92). (B) Comparaison entre la structure de PulG et de PilA^{PAK} de *P. aeruginosa* (code pdb 1OQW). (C) Structures des trois GspG comparées à la structure de PulG : de gauche à droite, la structure de EpsG de *V. cholerae* (code pdb 3FU1), celle de *V. vulnificus* (code pdb 3GN9) et la structure de GspG d'*E. coli* EHEC (code pdb 3G20). Les trois structures sont similaires à celle de PulG et présentent le même repliement avec une hélice α N-terminale, un domaine variable et un feuillet β C-terminal. Les sphères orange représentent les ions calcium présents dans les structures des GspG mais pas dans celle de PulG.

II. 6. 4. 2. Modèle d'assemblage de GspG en pseudopilus

Récemment, un modèle d'assemblage de la pseudopiline PulG a été proposé par Campos et al (Campos *et al.*, 2010b). Ce modèle est basé sur les structures disponibles des GspG, la structure du pseudopilus déterminée par microscopie électronique à 25Å (Kohler *et al.*, 2004) ainsi que sur les données structurales et microscopiques obtenues pour les pilines du SPT4 (Craig *et al.*, 2003; Craig *et al.*, 2006).

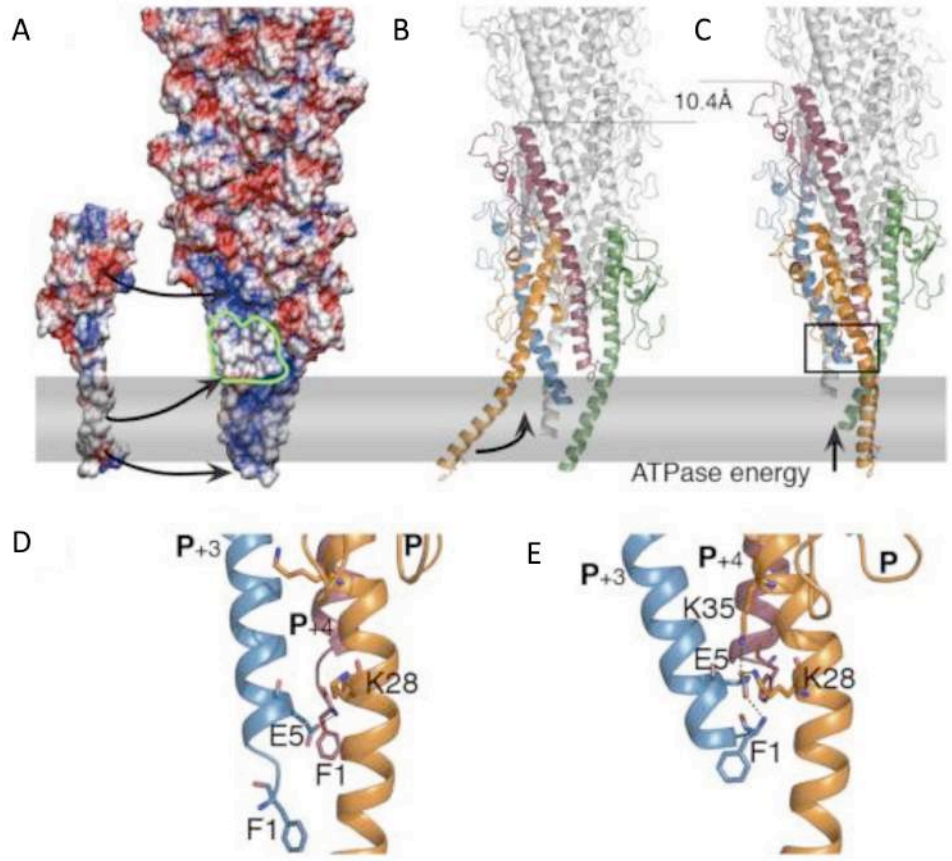


Figure 29 : Modèle d'assemblage du pseudopilus formé par l'oligomérisation de PulG de *K. oxytoca* proposé par campos *et al.* (Campos *et al.*, 2010b) (A) Enveloppe électrostatique du pseudopilus et de PulG calculée par APBS (Baker *et al.*, 2001). Le rectangle gris représente la membrane interne. Les flèches indiquent les zones d'interactions électrostatiques et hydrophobes. La flèche inférieure indique le pont salin formé entre E_5 et F_1 de deux protomères successifs. (B) Présentation en « cartoon » des différents protomères dans le pseudopilus. Le protomère P (en orange) s'associe au protomère P+1 (en vert) à travers des interactions électrostatiques. Les protomères P+3 et P+4 sont présentés respectivement en bleu et rouge. (C) les pseudopilines sont stabilisées par les interactions hydrophobes qui sont générées par les hélices N-terminales. Chaque protomère qui s'ajoute au pseudopilus permet son déplacement de 10,4Å vers le haut. Ce déplacement est énergisé grâce à l'hydrolyse de l'ATP. (D & E) présentation des interactions au niveau des extrémités N-terminales des différents protomères. Le E5 du protomère P+3 interagit avec la F1 du protomère P+4.

La structure de PulG entière a été modélisée sur la base des structures des protéines PilA et GspG-EHEC (Craig *et al.*, 2003; Korotkov *et al.*, 2009a). La structure de PilA (code pdb 1OQW) (Craig *et al.*, 2003) a été utilisée pour modéliser la partie N-terminale qui couvre les 20 premiers résidus puisqu'elle présente 50% d'identité de séquence avec PulG. Cependant, la structure de GspG-EHEC a été utilisée afin de modéliser la partie C-terminale constituée par le brin β4 qui formait un brin intermoléculaire entre deux monomères dans la structure dimérique de PulG (Kohler *et al.*, 2004). Cette partie C-terminale répartie sur les 20 résidus C-terminaux de PulG présente 80% d'identité de séquence avec GspG-EHEC. Le modèle d'assemblage de PulG en pseudopilus a été généré *in silico* grâce à des contraintes de distances entre les résidus des hélices N-terminales décrites dans la littérature (Campos *et al.*, 2010a; Campos *et al.*, 2010b).

Les modèles générés ont été validés expérimentalement par des inversions de charges ainsi que la substitution des résidus probablement impliqués dans l'interaction des pseudopilines par des cystéines. La stratégie de substitution des résidus par des cystéines permet de valider la capacité de ces résidus à interagir en formant des ponts disulfures. Ces expériences ont permis de déterminer une carte d'interaction entre un protomère P qui interagit avec les protomères P+1, P+3, P+4, P-1, P-3 et P-4 (figure 29A). Le protomère P interagit par des interactions hydrophobes avec les protomères P+1 et P-1 alors que l'interaction avec les autres protomères est établi grâce à des interactions électrostatiques. Ce modèle ressemble à celui proposé pour la piline PilE de *N. gonorrhoeae* (code pdb 2HIL) avec un diamètre de 60Å et un pas de 10,4Å entre deux protomères successifs (figure 29 B&C).

II. 6. 5. Les pseudopilines mineures GspH, GspI, GspJ, GspK

Les pseudopilines mineures jouent un rôle essentiel dans le processus de sécrétion. En effet, la délétion d'une seule d'entre elles entraîne une perte totale de la sécrétion via le SST2 (Durand *et al.*, 2005). Les pseudopilines mineures sont cependant incapables de former un HPP comme la protéine GspG (Sauvonnet *et al.*, 2000; Durand *et al.*, 2005), et aucune de ces pseudopilines n'a été détectée dans l'HPP formé par GspG (Vouhoux *et al*, donnés non publiées) (Vignon *et al.*, 2003). Toutefois, il a été suggéré que les pseudopilines mineures interviennent dans la biogenèse et la régulation de l'assemblage en pseudopilus (Durand *et al.*, 2005; Kuo *et al.*, 2005). Chez *P. aeruginosa*, bien que les mutants délétés des gènes codant pour $XcpU_H$ et $XcpW_J$ forment un HPP, le mutant délété de $xcpV_I$ n'en est plus capable (Durand *et al.*, 2005). Ces

résultats montrent l'importance de $XcpV_I$ dans l'initiation de la formation d'un pseudopilus. De plus, dans un mutant délété du gêne codant pour $XcpX_K$, on retrouve un HPP beaucoup plus développé avec une quantité de $XcpT_G$ extracellulaire largement augmentée (Durand *et al.*, 2005). Inversement, la co-surproduction de $XcpX_K$ avec $XcpT_G$ conduit à un HPP très peu développé voir inexistant. Par conséquent, il a été suggéré que $XcpX_K$ joue un rôle clé dans le contrôle de la taille du pseudopilus.

Les pseudopilines partagent toutes l'organisation structurale typique de pilines avec le motif α/β composé d'une hélice α N-terminale, un domaine variable et un feuillet β C-terminal. Contrairement aux autres pseudopilines, GspK présente deux particularités : à la place du résidu E_5 on trouve une thréonine et du côté C-terminal, GspK possède un domaine supplémentaire appelé domaine α. Comme il a été mentionné précédemment, les pseudopilines, qu'elles soient majeures ou mineures, se caractérisent par une très forte conservation de leurs domaines hydrophobes. Il est donc possible que la régulation de l'assemblage et la biogenèse du pseudopilus impliquent probablement les domaines solubles. Ainsi, les études structurales des différentes pseudopilines mineures ont été réalisées uniquement sur les domaines solubles.

II. 6. 5. 1. Structure de GspH

La structure de la forme tronquée de la pseudopiline mineure EpsH (résidus 30 à 188) de *V. cholerae* a été résolue par cristallographie aux rayons X à 2,0Å (code pdb 2QV8) (figure 30) (Yanez *et al.*, 2008a). EpsH présente un repliement typique des pilines avec une hélice α hydrophobe au niveau de l'extrémité N-terminale (résidus 30 à 54) et un feuillet β à 4 brins antiparallèles : β3 (96-101), β7 (152-158), β8 (167-171) et β9 (177-180) (figure 30A). Entre ces deux régions, on retrouve le domaine variable qui est très différent de celui observé chez GspG puisqu'il est formé par un feuillet β à 5 brins antiparallèles au lieu d'une longue boucle et d'une hélice 3_{10}. Ce feuillet contient les brins appelés β1, β2, β3, β4 et β6. La comparaison de la structure de EpsH par rapport à celles des pilines et pseudopilines majeures montre que EpsH est similaire à celle de $PilA^{PAK}$ de *P. aeruginosa* avec seulement 13% d'identité de séquence (Craig *et al.*, 2003; Yanez *et al.*, 2008a). En effet, les protéines EpsH et $PilA^{PAK}$ présentent au niveau de leurs domaines variables un feuillet β formé respectivement de 5 et 4 brins antiparallèles. Cependant la recherche d'homologues structuraux par les serveurs bioinformatiques ne permet pas d'identifier GspG comme un homologue structural même s'il présente le même motif piline.

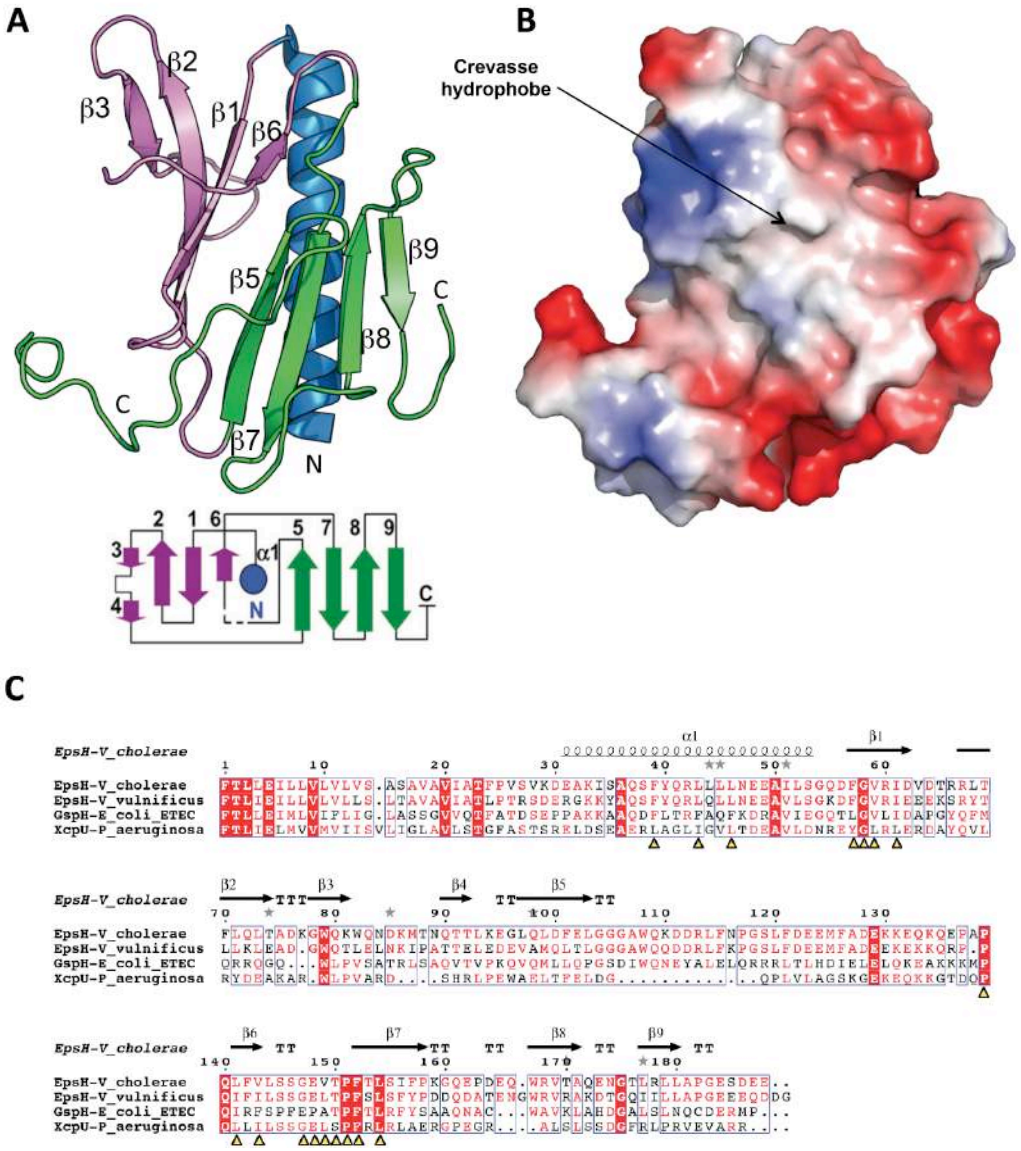


Figure 30 : Structure de EpsH de *V. cholerae* (code pdb 2QV8) (A) La structure de EpsH présente le motif piline avec l'hélice a N-terminale (bleu), le domaine variable (violet) et le feuillet β C-terminal à 4 brins antiparallèles. (B) Présentation de la surface électrostatique de EpsH qui montre une crevasse hydrophobe. (C) Alignement des séquences de EpsH de *V. cholerae*, de *V. vulnificus*, de GspH d'*E. coli* ETEC et de $XcpU_H$ de *P. aeruginosa*. Les résidus de la crevasse hydrophobe sont majoritairement conservés dans la famille des GspH (Yanez et al., 2008a).

L'analyse de la surface de EpsH a permis de révéler la présence d'une crevasse hydrophobe formée à l'interface de l'hélice N-terminale et des deux feuillets β (figure 30B). Les résidus impliqués dans cette crevasse sont conservés dans la famille des GspH (figure 30C). La conservation de cette région hydrophobe laisse suggérer une importance fonctionnelle qui peut

se manifester par l'interaction, soit avec une ou plusieurs protéines sécrétées, soit avec un autre composant de la machinerie de sécrétion.

II. 6. 5. 2. Structure de GspI-GspJ

La structure du complexe formé par les domaines solubles de EpsI et EpsJ de *V. vulnificus* a été déterminée à 2,3Å (code pdb 2RET) (Yanez *et al.*, 2008b). Cette structure représente la première preuve structurale de l'interaction entre deux pseudopilines de la machinerie de sécrétion de type II. Cette interaction a permis de confirmer les expériences de double hybride qui ont montré que les deux homologues de EpsI et EpsJ chez *E. chrysanthemi* OutI et OuJ interagissaient entre elles (Douet *et al.*, 2004).

II. 6. 5. 2. 1. Structure de EpsI

La structure de la pseudopiline EpsI tronquée des premiers 24 résidus possède un repliement standard des pilines, avec une hélice α N-terminale (résidus 31-53) et un feuillet β C-terminal à 3 brins antiparallèles : β1 (69-79), β2 (86-94) et β3 (103-110) (Yanez *et al.*, 2008b). Cependant et à la différence des pilines, le domaine variable de EpsI se limite à un brin β de 6 résidus (54-60) (figure 31).

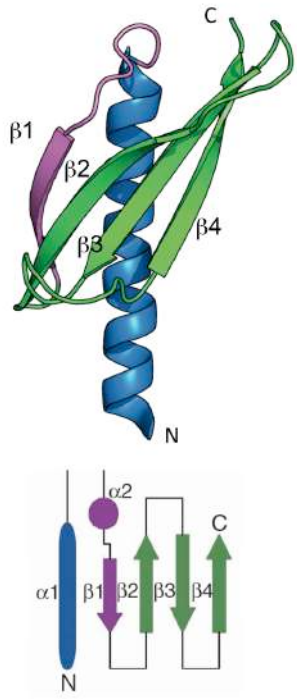


Figure 31 : Structure de EpsI de *V. vulnificus* (code pdb 2RET) (Yanez *et al.*, 2008b). La structure de EpsI montre un motif piline avec l'hélice α N-terminale (bleu), le domaine variable (violet) formé uniquement d'un brin β et le feuillet β C-terminal à 3 brins antiparallèles.

Comme dans le cas de EpsH, même si EpsI présente un repliement similaire à celui de la pseudopiline majeure GspG, elle reste toutefois assez distincte pour ne pas être identifiée comme un homologue structural par les serveurs bioinformatiques DALI et EBI-SSM. En effet, EpsI et les protéines GspG se superposent bien au niveau des hélices α N-terminales mais divergent au niveau des domaines C-terminaux. EpsI contient dans le feuillet β C-terminal des brins plus étendus ainsi qu'un brin supplémentaire dans sa partie N-terminale. Il est intéressant de noter que la boucle reliant les deux brins β3 et β4 chez EpsI adopte le même repliement que la boucle reliant les brins β2 et β3 chez GspG et qui fixent le calcium (Korotkov *et al.*, 2009a).

II. 6. 5. 2. 2. Structure de EpsJ

La structure de EpsJ montre également une organisation typique des pilines avec une hélice α N-terminale et un feuillet β à 4 brins antiparallèles : β6 (145-153), β7 (156-160), β8 (171-179) et b9 (182-189). Contrairement à EpsI, EpsJ possède un domaine variable assez volumineux organisé en un feuillet β à 5 brins antiparallèles (β1 à β5) (figure 32).

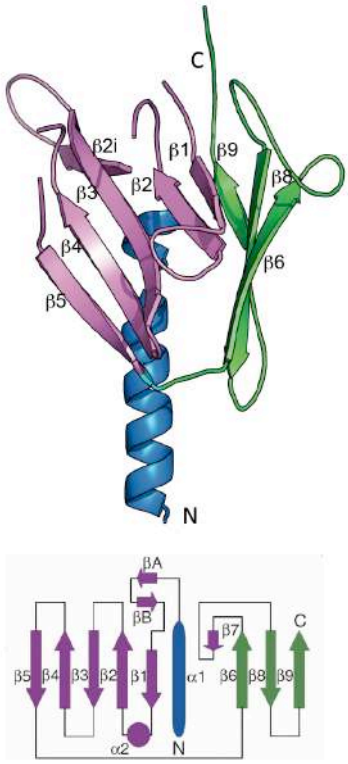


Figure 32 : Structure de EpsJ de *V. vulnificus* (code pdb 2RET) (Yanez *et al.*, 2008b). La topologie de EpsJ montre un motif piline avec l'hélice α N-terminale (bleu), le domaine variable (violet) formé uniquement d'un feuillet β à 5 brins antiparallèles et le feuillet β C-terminal à 3 brins antiparallèles.

La comparaison de la structure de EpsJ avec celle des pseudopilines montre des différences structurales significatives surtout au niveau des domaines variables ainsi qu'au niveau de la disposition du feuillet β C-terminal par rapport à l'hélice N-terminale. En effet, EpsJ se caractérise par la présence de brins plus étendus dans son domaine variable surtout au niveau des brins β2 (86-97) et β3 (106-117). De plus, le domaine variable et le domaine formé par le feuillet β C-terminal couvrent la partie C-terminale de l'hélice N-terminale avec un shift de 22Å par rapport aux domaines équivalents dans EpsH. Cette différence dans la disposition des domaines variables et des feuillets C-terminaux par rapport à l'hélice N-terminale pourrait intervenir dans l'association séquentielle des pseudopilines dans le pseudopilus.

II. 6. 5. 2. 3. Structure de l'hétérodimère EspI-J

Le complexe formé par EpsI-EpsJ (code pdb 2RET) présente une surface de contact de l'ordre de 1450Å^2 déterminée par le serveur ProtorP (figure 33A) (Yanez *et al.*, 2008b; Reynolds *et al.*, 2009). Cette interface implique majoritairement des interactions hydrophobes (Yanez *et al.*, 2008b). Pour EpsI, les résidus impliqués dans l'interaction sont répartis au niveau de l'hélice N-terminale et le brin β1. Dans le cas de EpsJ, ces résidus sont répartis au niveau de l'hélice N-terminale, le brin β9 et la boucle reliant les brins β8 et β9. Par conséquent, cette interface peut être répartie en 3 zones de contact :

- Interaction hélice$^{(EpsI)}$-hélice$^{(EpsJ)}$: L'interaction des deux hélices N-terminales de EpsI-EpsJ implique une douzaine de résidus : 6 résidus de EpsI (V_{31}, L_{34}, E_{35}, M_{38}, F_{39}, M_{42}) et 6 résidus de EpsJ (R_{37}, T_{38}, L_{41}, L_{44}, Q_{45}, L_{48}). Les contacts entre les deux hélices sont majoritairement de nature hydrophobe. L'alignement des séquences de quelques membres des deux familles de GspI et GspJ montre que ces résidus sont conservés (figure 33B).

- Interaction hélice$^{(EpsI)}$-feuillet$^{(EpsJ)}$: L'interaction de EpsI et EpsJ implique aussi le feuillet β de EpsJ au niveau de son brin β9 qui établit des contacts hydrophobes et polaires avec l'hélice N-terminale de EpsI. Les résidus de EpJ impliqués dans cette interaction sont Y_{181}, I_{184}, A_{185}, R_{186}, T_{187}, L_{189}, ceux de EpsI sont E_{35}, F_{39}, M_{42}, N_{46}, A_{48}, M_{50}.

- Interaction feuillet$^{(EpsI)}$-feuillet$^{(EpsJ)}$: La dernière interface implique les interactions entre le brin β1 de EpsI et le brin β9 de EpsJ. Les résidus qui interviennent dans cette interface sont L_{67}, A_{68}, G_{69} pour EpsI et T_{181}, L_{183}, I_{184}, A_{185} pour EpsJ. Ces interactions sont majoritairement hydrophobes.

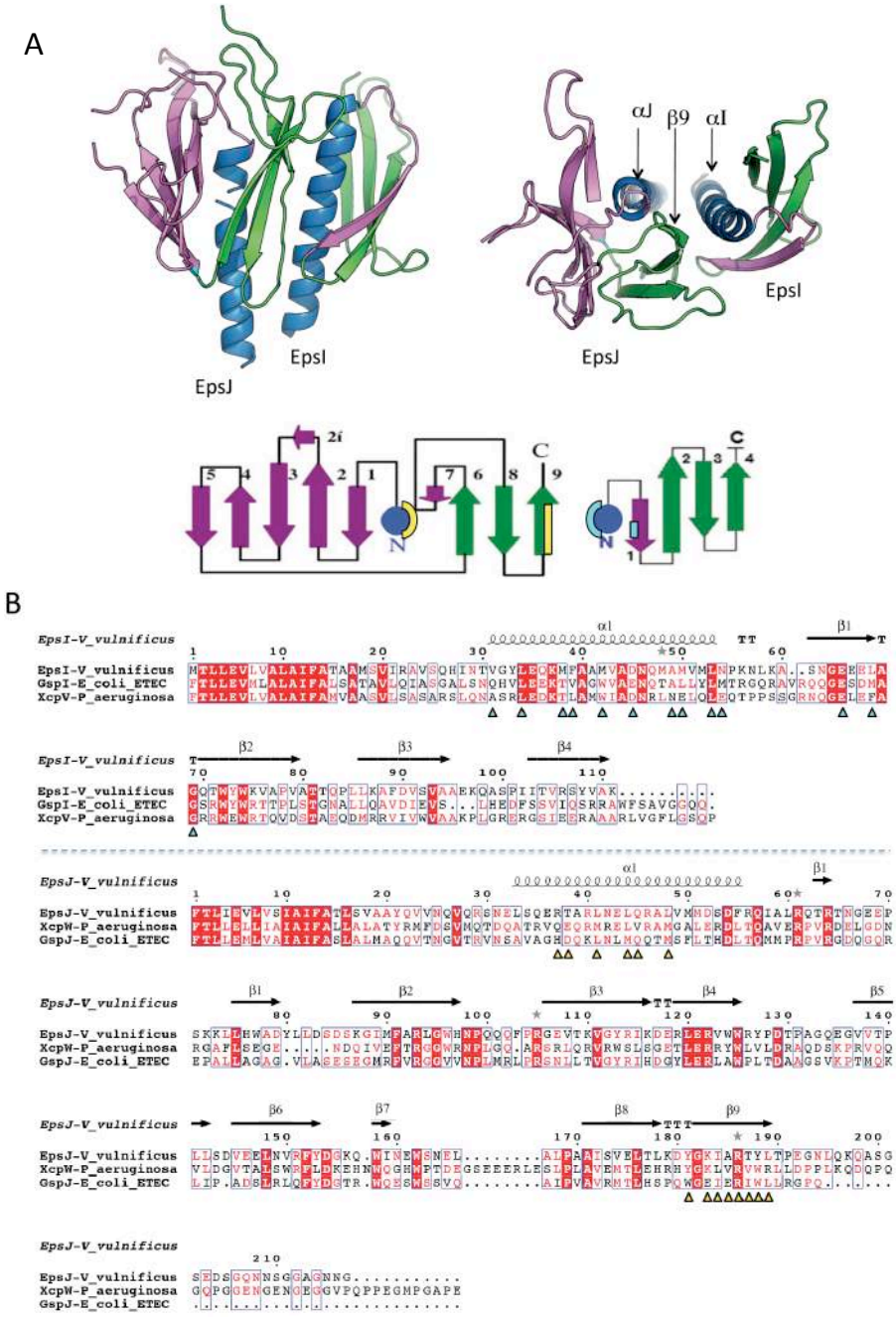


Figure 33 : Structure du complexe EpsI-EpsJ (code pdb 2RET) (Yanez *et al.*, 2008b). (A) Vue de profil et de dessus du complexe EpsI-EpsJ. Les zones qui interviennent dans la surface d'interaction sont indiquées en haut par des flèches (Les hélices αJ et αI et le feuillet β9 de EpsJ). En dessous, les zones d'interactions sont indiquées sur les représentations schématiques des structures de EpsI et EpsJ. Les zones impliquées dans l'interaction de EpsI avec EpsJ sont colorées en cyan. Le jaune indique les zones de EpsJ impliquées dans l'interaction avec EpsI. (B) Alignement des séquences de EpsI-EpsJ de *V. vulnificus*, de $XcpV_I$-$XcpW_J$ de *P. aeruginosa* et de GspI-GspJ d'*E. coli* ETEC. Les résidus impliqués dans la surface d'interaction entre EpsI et EpsJ sont indiqués par des flèches colorées. Les structures secondaires sont indiquées au-dessus des alignements.

L'étude de la disposition de EpsI et EpsJ dans le complexe formé révèle que les deux protéine peuvent intégrer le modèle du pseudopilus sous sa forme hélicoïdale. L'interaction des formes tronquées des extrémités hydrophobes EpsI-EpsJ met en jeu des contacts hydrophobes entre les deux hélices. Cette association au niveau des hélices rappelle celle trouvée dans le cas des GspG (Kohler *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2010b). De plus, le décalage de 10Å observé entre les hélices de EpsJ et EpsI peut se traduire par le fait que le complexe fait partie d'un tour d'hélice. Ces données suggèrent que le complexe EpsI-EpsJ formé pourrait être une forme transitoire ou permanente qui s'intègre au pseudopilus périplasmique (Yanez *et al.*, 2008b).

II. 6. 5. 3. Structure du complexe GspI-J-K

La protéine GspK présente deux particularités par rapport aux autres pseudopilines : l'absence de la glutamate en +5 et sa taille largement plus importante (35kDa) (Bleves *et al.*, 1998). La structure de la protéine GspK d'*E. coli* ETEC a été résolue par cristallographie aux rayons X sous forme complexée avec les deux protéines GspI-GspJ (code pdb 3CI0) (Forest, 2008; Korotkov and Hol, 2008). Les trois protéines qui forment le complexe ont été tronquées de leurs extrémités N-terminales hydrophobes afin d'augmenter leur solubilité (Korotkov and Hol, 2008).

La structure de GspK montre que la protéine est formée de deux domaines : un premier qui est le domaine α/β classique des pilines/pseudopilines et un deuxième domaine atypique appelé domaine α. Le domaine piline est composé d'une hélice α N-terminale (résidus 29-60), d'un segment variable (61-81) formé par un tour d'hélice et un brin β. Du coté C-terminal, on retrouve un feuillet β à 4 brins antiparallèles β1, β2, β3 et β4. Le domaine α qui s'étend sur 185 résidus est formé par 12 hélices α (αA à αL) et 4 courts brins β (βA à βD). Ce domaine s'insère entre les deux brins β2 et β3 du feuillet C-terminal (figure 34A).

L'interaction entre GspK et GspJ implique les domaines piline et α de GspK qui contribuent respectivement à 46% et 54% de la totalité de l'interface d'interaction. Cette interface entre GspK et GspJ représente la plus grande interface dans le complexe trimérique avec 3.510Å^2 où on trouve plusieurs liaisons hydrogène et trois ponts salins. Les résidus impliqués dans cette interface sont majoritairement conservés dans la famille des GspK. L'interaction entre GspK et GspI implique uniquement les domaines pilines des deux protéines. La surface au niveau de l'interface est beaucoup plus petite que celle observée pour GspK-GspJ

avec 1360Å². Les interactions retrouvées dans cette interface sont majoritairement de type hydrophobe et impliquent essentiellement le feuillet C-terminal de GspI et l'hélice N-terminale de GspK. Les résidus impliqués dans les interfaces d'interaction entre GspK-GspJ et GspK-GspI sont majoritairement conservés dans la famille des GspK. Pour le complexe GspI-GspJ, on retrouve la même orientation que celle du dimère EpI-EpsJ décrit chez *V. vulnificus* (Yanez *et al.*, 2008b). Ainsi ces deux versions du même dimère chez *V. vulnificus* et *E. coli* EHEC se superposent avec un RMSD de 1,6Å. La plus grande variation entre ces dimères est localisée au niveau des domaines variables de GspJ (EpsJ).

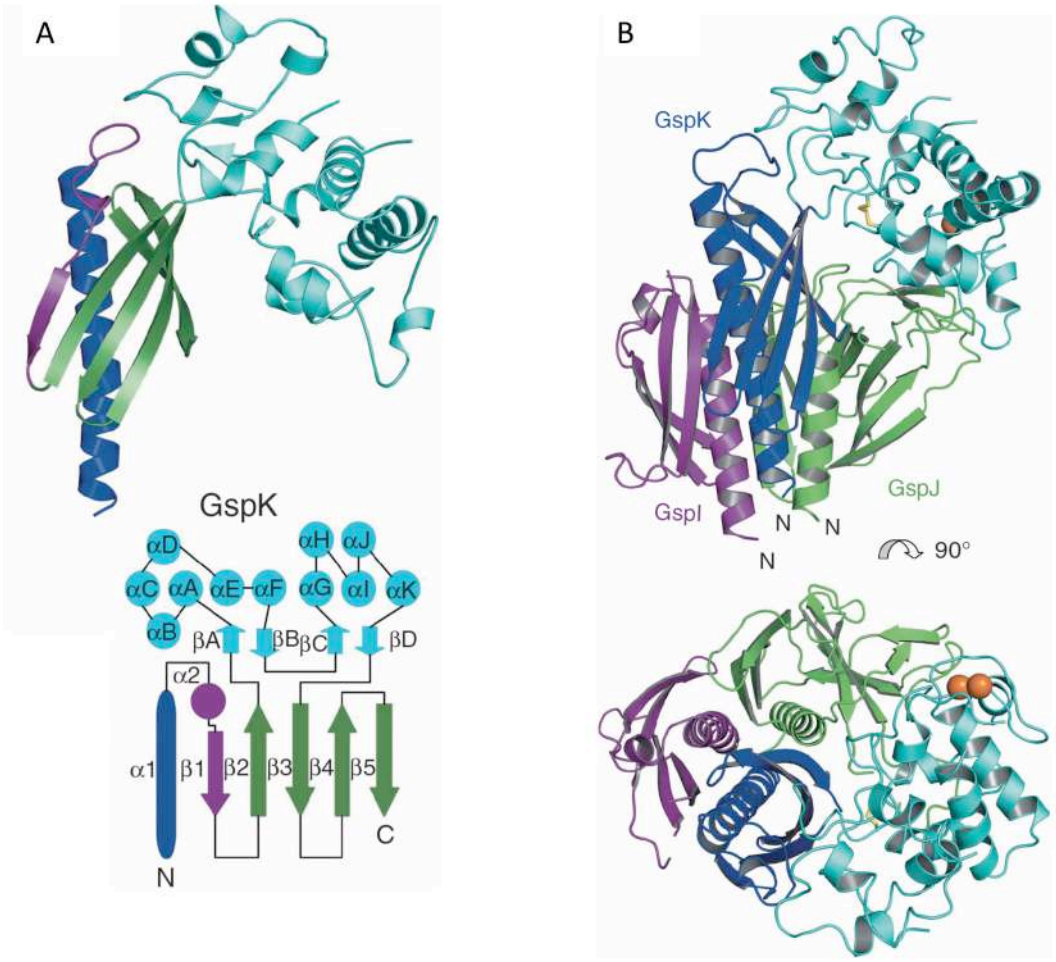


Figure 34 : Structure de GspK et du complexe formé par GspI-J-K d'*E. coli* ETEC (code PDB 3CIO) (A) La structure de GspK présente comme toutes les pseudopilines un motif piline formé par : l'hélice α N-terminale (bleu), le domaine variable (violet) composé d'un tour d'hélice et d'un brin β, le feuillet β C-terminal formé par 4 brins antiparallèles. GspK présente la caractéristique d'avoir un domaine supplémentaire: le domaine α (cyan) composé dé 12 hélices α et 4 brins β. (B) La structure du complexe GspI-J-K montre que les protéines s'associent entre elles à travers les hélices N-terminales ainsi qu'avec leurs domaines solubles. Adaptée de Korotkov *et al* (Korotkov and Hol, 2008).

Au final, on retrouve une surface d'interaction totale entre le dimère GspI-GspJ et GspK de 4670Å² (avec près de 75% impliquant uniquement l'interface GspK-GspJ) où les trois composants interagissent par leurs hélices α N-terminales avec un décalage de 10Å entre chaque protéine du complexe ternaire avec GspJ à la base du complexe, ensuite GspI et au final GspK au sommet. Cette organisation hélicoïdale rappelle l'oligomérisation des pilines en pilus et des pseudopilines en pseudopilus (Craig *et al.*, 2004; Kohler *et al.*, 2004; Craig *et al.*, 2006).

II. 6. 5. 4. Modèle d'assemblage des pseudopilines mineures dans le pseudopilus

La structure du complexe ternaire formé par GspI-J-K révèle que le domaine α de GspK couvre le sommet de cet hétérotrimère. De plus, si on considère que ce complexe intègre le pseudopilus, alors cela ne peut être qu'au niveau du sommet de celui-ci car aucune autre sous unité des pseudopilines ne peut se greffer en aval de ce complexe, c'est à dire au dessus de GspK si on reste fidèle à la forme hélicoïdale du pseudopilus. Cette structure trimérique et sa localisation au sommet du pseudopilus sont en accord avec l'hypothèse que le pseudopilus fonctionnerait comme un piston qui obstruerait le pore par son sommet (Nunn, 1999; Filloux, 2004; Johnson *et al.*, 2006). Les données montrant l'importance de GspK dans le contrôle de la taille de l'HPP de *P. aeruginosa* sont en accord avec la localisation apicale du complexe trimérique (Durand *et al.*, 2005). Le rôle de GspK dans le contrôle de la taille du pseudopilus pourrait ainsi avoir une explication purement mécanique (figure 35) (Forest, 2008).

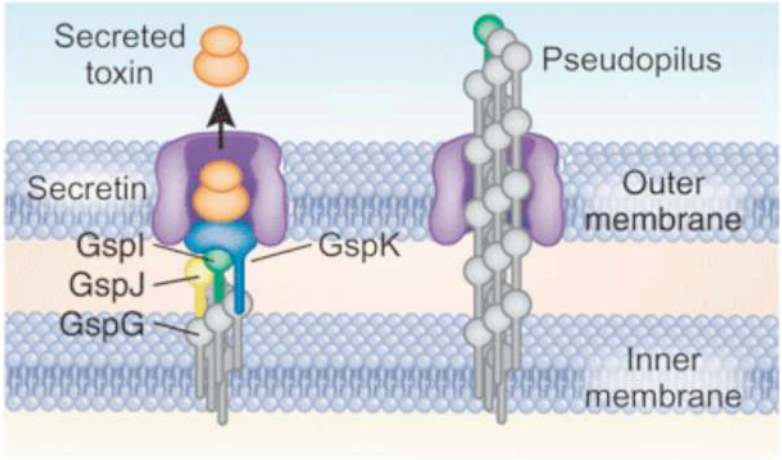


Figure 35 : Modèle hypothétique de l'assemblage des pseudopilines dans le processus de sécrétion d'après Forest KT (Forest, 2008). Le complexe hétérotrimérique GspI-J-K est localisé au sommet du pseudopilus formé par l'oligomérisation des GspG. Le pseudopilus agit comme un piston afin de pousser les exoprotéines à travers la sécrétine. GspK permet d'obstruer le pore de sécrétion empêchant le piston de traverser la sécrétine. En absence de GspK, le pseudopilus pourrait quitter la membrane externe et forme ainsi le HPP.

En effet, le trimère GspI-J-K situé au sommet du pseudopilus serait trop volumineux pour permettre son passage dans la sécrétine. Au contraire, en absence de GspK, la taille du sommet du pseudopilus est largement réduite, il peut alors librement traverser la sécrétine. La pseudopiline mineure GspH n'est pas représentée dans le modèle du pseudopilus en raison de l'absence d'interaction avec les autres composants du pseudopilus bien qu'elles aient toutes les caractéristiques structurales pour intégrer cette structure fibrillaire.

II. 6. 6. Interaction entre le pseudopilus et les autres composants du sécréton

Si l'association des pseudopilines en pseudopilus permet de pousser le substrat à travers la sécrétine, le pseudopilus doit être reconnu par les composants du sécréton, d'une part par la sécrétine et d'autre part par la plateforme de membrane interne.

Pour le premier point, les travaux de Gray et al (Gray *et al.*, 2011) ont montré que chez *V. cholerae*, EpsG interagit avec EpsL. Les auteurs proposent que EpsL joue le rôle de transducteur de signal entre l'ATPase EpsE et la pseudopiline majeure EpsG *via* son interaction avec EpsL (Gray *et al.*, 2011). Toutefois, il serait souhaitable de tester l'interaction de GspG avec les autres composants de la plateforme de membrane interne afin de mieux comprendre le rôle de chaque partenaire dans la sécrétion.

Pour le second, l'interaction du pseudopilus avec le pore de sécrétion a été décrite récemment par les travaux de Reichow *et al* (Reichow *et al.*, 2010). Ces travaux ont montré par Résonance Plasmonique de Surface (SPR) ou BIAcore que le complexe ternaire GspI-J-K interagit avec le vestibule périplasmique de la sécrétine formé par les sous domaines N0-N1-N2 (Reichow *et al.*, 2010). Cette interaction révèle que le complexe trimérique situé au sommet du pseudopilus interagit avec la sécrétine au niveau de l'espace périplasmique, ce qui est en accord avec le modèle du piston. Des études antérieures avaient montré que OutJ interagissait avec OutD chez *E. chrysanthemi* (Douet *et al.*, 2004). Ceci suggère que le pseudopilus interagit avec la sécrétine au niveau de GspJ.

II. 7. Schémas récapitulatifs des réseaux d'interactions au sein du sécréton

II. 7. 1. Réseau d'interactions au sein de chaque sous-complexe

II. 7. 1. 1. Le pseudopilus

De nombreuses interactions entre les 5 pseudopilines ont été identifiées «*in vivo*» par différentes techniques. Ceci confirme donc que ces pseudopilines appartiennent à un même sous-complexe. Cependant, afin de comprendre le rôle des pseudopilines mineures et de leurs domaines solubles, des études d'interaction ciblées sur les composants du pseudopilus ont été réalisées. Ci-dessous, sont présentées les références clées à l'origine du modèle actuel de l'assemblage des pseudopilines en pseudopilus.

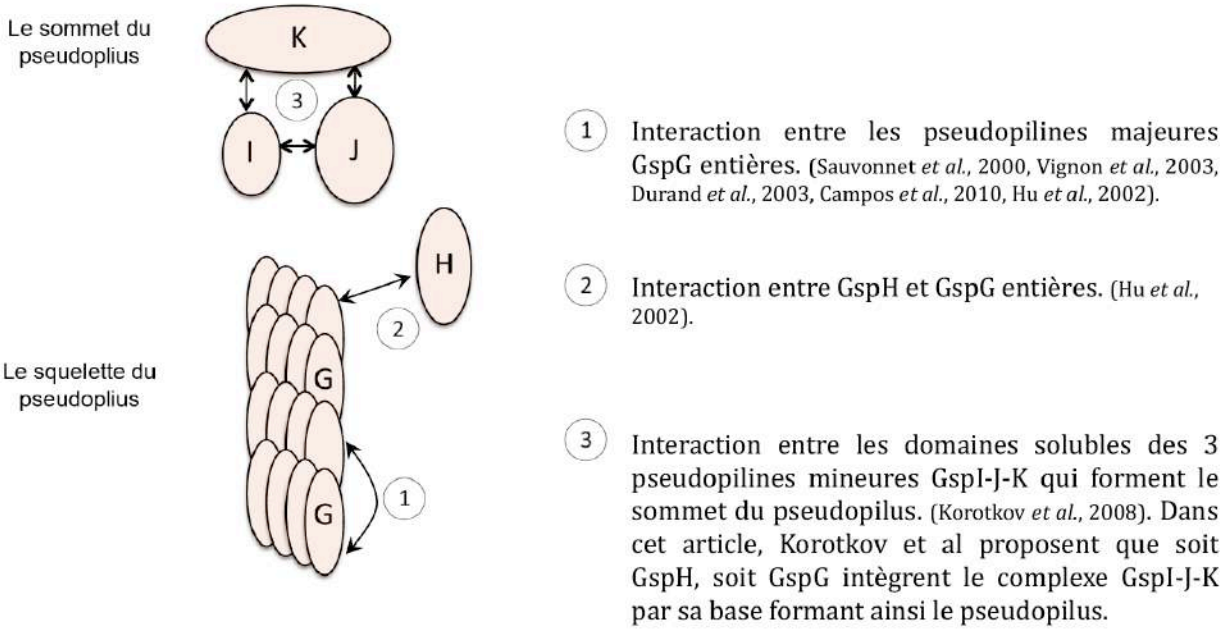
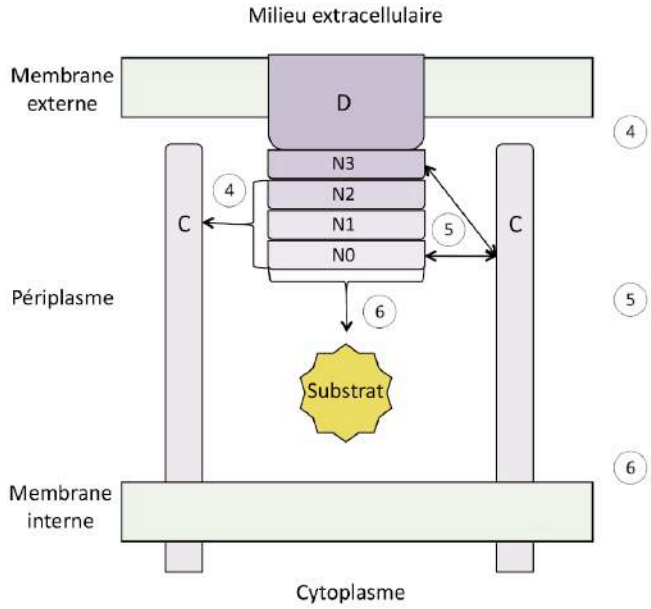


Figure 36 : Réseaux d'interactions au sein du pseudopilus.

II. 7. 1. 2. Le sous-complexe GspC-GspD-substrat

Bien que ce soit une protéine de membrane interne, le composant GspC forme avec le pore de membrane externe (la sécrétine GspD) un couple fonctionnel responsable de la spécificité du substrat. Malgré le fait que l'interaction directe entre GspC et GspD ait été proposée dès 1996 (Lindeberg *et al.*, 1996), il aura fallu attendre 2006 pour qu'elle soit démontrée.



4 Dans une étude effectuée chez *V. vulnificus*, il a été montré que le domaine HR de GspC interagit avec les sous-domaines N0-N1-N2 de GspD. (Korotkov *et al.*, 2006).

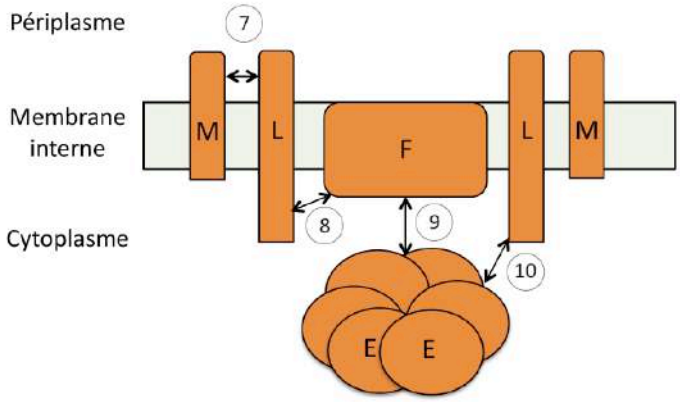
5 Chez *E. chrysanthemi*, il a été montré que OutC interagit avec OutD sur deux sites différents de la sécrétine : N0 et N3. (Login *et al.*, 2010).

6 L'interaction entre le domaine N-terminal de la sécrétine et son substrat a été décrite deux fois. (Shevchik *et al.*, 1997, Reichow *et al.*, 2010).

Figure 37 : Les interactions décrites entre le pore de sécrétion et les domaines périplasmiques des composants du sécréton.

II. 7. 1. 3. La plateforme de membrane interne

Les composants de la plateforme de membrane interne forment un complexe protéique réparti dans le cytoplasme et l'espace périplasmique. Dans ce complexe multiprotéique, la protéine GspL joue un rôle essentiel dans la connexion des composants de la plateforme à travers ses interactions avec GspM, GspF et GspE.



7 Interaction entre les domaines périplasmiques de GspM-GspL. (Sandkvist *et al.*, 1999, Py *et al.*, 2001, Lee *et al.*, 2001).

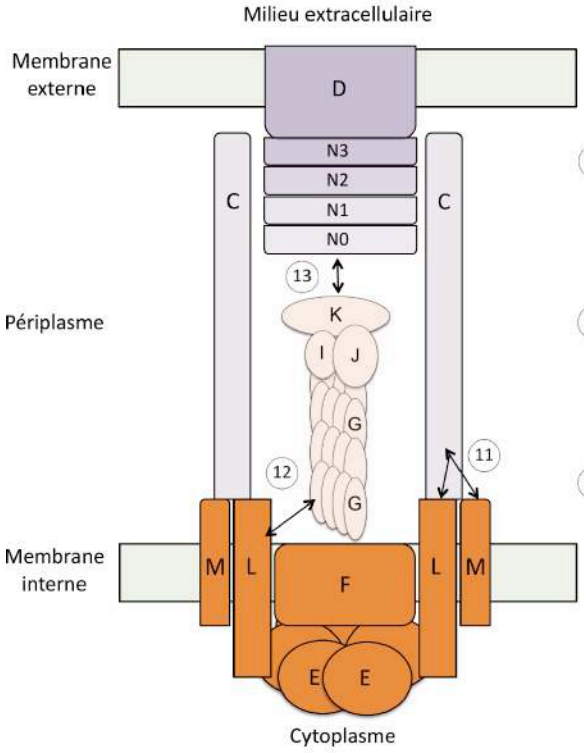
8 Interaction entre GspL et GspF : (Py *et al.*, 2001).

9 Interaction entre les domaines cytoplasmiques de GspF et l'ATPase GspE : (Py *et al.*, 2001, Arts *et al.*, 2007).

10 Interaction entre les domaines cytoplasmiques de GspL et l'ATPase GspE. (Sandkvist *et al.*, 1995, Ball *et al.*, 1999, Sandkvist *et al.*, 2000, Abendroth *et al.*, 2005).

Figure 38 : Réseaux d'interactions entre les composants de la plateforme de membrane interne.

II. 7. 2. Interactions entre les sous-complexes du sécréton



11 Le couple GspC-GspD est lié à la plateforme de membrane interne à travers l'interaction entre GspC et le couple GspM-GspL. (Tsai *et al.*, 2002, Robert *et al.*, 2002).

12 La première interaction directe entre le pseudopilus et la plateforme de membrane interne a été décrite récemment à travers l'interaction entre GspG et GspL. (Gray *et al.*, 2011).

13 Enfin, deux interactions directes ont été montrées entre le pseudopilus et le pore. (Py *et al.*, 2001, Reichow *et al.*, 2010).

Figure 39 : Connexion entre les 3 sous-complexes qui forme un large complexe protéique, le sécréton qui traverse toute l'enveloppe bactérienne.

A travers l'introduction de ce manuscrit, j'ai essayé de citer les différentes études structurales ainsi que les réseaux d'interactions décrits entre les composants de la machinerie de sécrétion de type II. Bien que, les structures de la majorité des composants aient été déterminées, leur rôle et leur organisation dans le processus de sécrétion sont toujours males connus. Afin de mieux comprendre le fonctionnement du SST2, nous avons choisi de réaliser l'étude systématique des réseaux d'interactions entre les domaines solubles des composants du sécréton Xcp de *P. aeruginosa*. Nous nous sommes dans un premier temps intéressé aux interactions entre les cinq pseudopilines. Nous avons ensuite étendu notre étude à d'autres composants périplasmiques ainsi qu'aux substrats sécrétés par cette machinerie. Nos résultats nous ont permis de proposer un nouveau modèle du sécréton dans lequel sont décrites les différentes étapes du cheminement des exoprotéines durant le processus de sécrétion.

Résultats & Discussion

Chapitre I : Etudes structurale et biochimique des pseudopilines Xcp de *Pseudomonas aeruginosa* : vers une compréhension du mode d'assemblage et du rôle du pseudopilus

Chez *P. aeruginosa*, le système de sécrétion de type II est composé de 12 protéines différentes. Ces protéines s'associent en un large complexe protéique appelé le sécréton Xcp. Comme les autres sécrétons GSP, le sécréton Xcp est organisé en 3 sous-complexes :

i) Le pore de sécrétion formé par l'homomultimérisation de la sécrétine $XcpQ_D$. La sécrétine est formée de deux domaines N et C structuralement distincts. Le domaine N est localisé dans l'espace périplasmique alors que le domaine C est ancré dans la membrane externe

ii) La plateforme de membrane interne constituée de 4 protéines appelées $XcpR_E$-S_F-Y_L-Z_M. $XcpR_E$ est une ATPase de trafic qui permet l'énergisation du sécréton. La plateforme de membrane interne est reliée à la sécrétine par la protéine trans-périplasmique $XcpP_C$.

iii) Le pseudopilus constitué de 5 protéines $XcpT_G$-U_H-V_I-W_J et X_K. Le pseudopilus est une fibre protéique formée par la multimérisation de la pseudopiline majeure $XcpT_G$.

I. 1. Identification d'un complexe quaternaire situé au sommet du pseudopilus (article 1)

Comme il a été décrit dans l'introduction, cette machinerie de sécrétion partage de nombreuses caractéristiques communes avec le système de piliation de type IV (SPT4). Une des plus fortes similarités repose sur la présence d'une structure fibrillaire appelé pilus dans le cas de PT4 et pseudopilus dans le cas du SST2. Chez *P. aeruginosa*, les pilines et les pseudopilines sont maturées par la même prépiline peptidase $PilD/XcpA_O$ qui permet de cliver une présequence N-terminale. Cependant, la ressemblance entre le SST2 et le SPT4 n'est pas restreinte à la prépiline peptidase et ses substrats puisque les deux systèmes ont également chacun une sécrétine dans la membrane externe, et une plate-forme de membrane interne formée d'une ou plusieurs ATPase de trafic et d'une protéine intégrale de membrane interne de type XcpS (Filloux, 2004).

En se basant sur ces similitudes et malgré l'évidente différence de fonction entre ces deux systèmes, l'un secrétant des exoprotéines et l'autre assemblant un pilus, il a été proposé que les pseudopilines majeures sont capables de former une structure semblable au pilus du SPT4 (Hobbs and Mattick, 1993). Une telle structure appelée l'hyper-pseudopilus ou HPP a été observée lors de la surproduction de la pseudopiline majeure $XcpT_G$ (Durand *et al.*, 2003). Cette structure de type pilus venait d'une part confirmer sur un plan fonctionnel la ressemblance entre les deux systèmes (SST2 et SPT4) et d'autre part, elle permettait de conforter l'hypothèse de l'existence et de l'implication d'une telle structure dans le processus de sécrétion de type II qui pourrait agir comme un piston permettant de pousser les exoprotéines au niveau du périplasme afin de les expulsées à travers le pore de sécrétion vers le milieu extracellulaire.

Les données structurales de l'HPP obtenues par microscopie électronique sont similaires à celles du pilus de SPT4 (Craig *et al.*, 2003; Durand *et al.*, 2003; Kohler *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2010a; Campos *et al.*, 2010b). Il s'agit dans les deux cas d'une structure hélicoïdale dont l'ossature est réalisée par l'assemblage des hélices α hydrophobes présentes à l'extrémité N-terminale de la pseudopiline majeure.

Toutefois, les conditions artificielles de l'obtention d'un HPP ne reflètent sans doute pas le « vrai » pseudopilus permettant la sécrétion puisque dans ces conditions, la sécrétion Xcp est totalement bloquée, probablement en raison d'un encombrement permanent de la sécrétine par cet HPP. Cependant, bien que probablement non physiologique, la mise en place d'une telle structure lors du processus de sécrétion a été confortée par les travaux de Durand et al qui ont clairement montré que $XcpX_K$ permet de contrôler la taille du HPP alors que $XcpV_I$ permet l'initiation de la formation de l' HPP (Durand *et al.*, 2005). Il est clair alors que ces deux pseudopilines mineures interviennent dans la régulation de l'HPP. Cependant, les deux pseudopilines mineures $XcpU_H$ et $XcpW_J$ n'ont aucun effet sur la formation de l'HPP alors qu'elles sont essentielles pour la sécrétion. Ceci peut s'expliquer de deux manières : soit le rôle de ces deux protéines dans la sécrétion ne se situe pas au niveau du pseudopilus, soit leur rôle dans la régulation du pseudopilus n'est pas observable lors de la formation de l' HPP, et dans ce cas, elles auraient donc un rôle très important dans le « vrai » pseudopilus.

Les études structurales ont révélé que les pseudopilines majeures et mineures partagent un repliement similaire à celui des pilines constituées d'une longue hélice α N-terminale hydrophobe conservée et d'un domaine soluble non conservé (Korotkov and Hol, 2008; Yanez *et al.*, 2008a, b; Korotkov *et al.*, 2009a) . Ainsi, ces domaines solubles contribuent certainement au

rôle spécifique de chacune des pseudopilines mineures dans l'assemblage du pseudopilus. Ainsi, nous avons essayé de déterminer, de manière systématique, l'ensemble des interactions possibles entre les domaines solubles des pseudopilines. Pour cela, nous avons cloné, exprimé et purifié les domaines solubles des 5 pseudopilines qui seront par la suite nommés $XcpT_G$, $XcpU_H$, $XcpV_I$, $XcpW_J$ et $XcpX_K$ (article 1).

Les interactions entre les cinq domaines purifiés ont été systématiquement testées par deux techniques complémentaires d'interaction protéine-protéine, la résonance plasmonique de surface (SPR) ou BIAcore et la co-purification par chromatographie d'affinité « *pull-down* ».

Dans un premier temps, le BIAcore a été utilisé comme une méthode de criblage afin de tester toutes les combinaisons possibles (25 combinaisons en total) entre les domaines solubles des pseudopilines. Cette méthode nous a permis de révéler trois interactions entre $XcpV_I$-$XcpW_J$, $XcpV_I$-$XcpX_K$ et $XcpW_J$-$XcpU_H$ avec des constantes de dissociation (K_{diss}) calculées de l'ordre du μM. Le pattern des interactions et les valeurs des K_{diss} montrent que les complexes binaires formés sont des complexes transitoire ce qui est en accord avec l'aspect transitoire du pseudopilus qui subit, selon l'hypothèse du piston, des mouvements d'assemblage et de désassemblage rapide dans l'espace périplasmique.

L'analyse du réseau d'interaction suggère que les protéines $XcpV_I$-W_J-X_K forment un complexe ternaire comme celui décrit chez *E. coli* ETEC dans les travaux de Korotkov et al (Korotkov and Hol, 2008). Ce complexe est supposé être au sommet du pseudopilus. Afin de vérifier l'existence de ce complexe, nous avons réalisé par BIAcore une expérience appelée « *epitope mapping* ». Cette expérience permet de vérifier si $XcpV_I$ présente deux sites d'interactions différents pour $XcpX_K$ et $XcpW_J$. Nous avons aussi détecté l'existence d'un complexe ternaire entre $XcpV_I$-W_J-X_K. Ce complexe ternaire, par analogie avec celui identifié chez *E. coli* ETEC, est supposé être au sommet du pseudopilus de *P. aeruginosa*.

De plus, nous avons montré, grâce à la nouvelle interaction $XcpU_H$-$XcpW_J$, que $XcpU_H$ intègre le complexe ternaire. Ces résultats permettent pour la première fois de positionner cette quatrième pseudopiline dans le pseudopilus et plus précisément au sommet du pseudopilus en association avec les trois autres pseudopilines formant ainsi un complexe non pas ternaire mais quaternaire.

De façon intéressante, nous n'avons trouvé aucune interaction entre les domaines solubles de la pseudopiline majeure $XcpT_G$ et ceux des pseudopilines mineures. Ce résultat

indique que l'interaction entre le squelette du pseudopilus (formé par la multimérisation de $XcpT_G$) et son sommet se fait via les domaines hydrophobes. Sachant que l'ajout des pseudopilines au niveau du sommet ne peut se faire que par sa base constituée de $XcpW_J$ et puisque nous avons montré que $XcpU_H$ intégrait le complexe par $XcpW_J$, nous proposons alors que $XcpU_H$ soit la charnière entre le sommet et le corps du pseudopilus en interagissant avec $XcpW_J$ par le domaine soluble et avec $XcpT_G$ par le domaine hydrophobe.

Afin de confirmer l'existence du complexe quaternaire, nous avons utilisé une autre méthode complémentaire : le « pull-down » ou co-purification par chromatographie d'affinité. Cette méthode nous a permis de valider toutes les interactions trouvées par BIAcore. Elle a également permis de valider le fait que $XcpT_G$ n'interagit avec aucune des pseudopilines et que le domaine soluble de $XcpW_J$ n'interagit pas avec celui de $XcpX_K$.

En se basant sur nos résultats et les données obtenues dans notre laboratoire (Durand *et al.*, 2005) qui montrent que $XcpV_I$ intervient dans l'initiation de la formation du pseudopilus, nous avons proposé un modèle séquentiel de la formation du pseudopilus (figure 40). Dans une première étape, le domaine soluble de $XcpV_I$ interagit avec les domaines solubles $XcpX_K$ et $XcpW_J$. Dans une deuxième étape et une fois que le complexe ternaire est formé, $XcpU_H$ interagit avec le complexe ternaire par son domaine soluble à travers son interaction avec le domaine soluble de $XcpW_J$. Le complexe quaternaire composé des quatre pseudopilines mineures peut maintenant se positionner sur le corps du pseudopilus formé par l'association des domaines hydrophobes de $XcpT_G$. La liaison du squelette du pseudopilus avec son sommet est réalisé à travers l'interaction de $XcpU_H$ et $XcpT_G$ par leurs domaines hydrophobes.

Les résultats obtenus dans ce travail nous ont permis de mieux comprendre le mode d'insertion des pseudopilines mineures dans le pseudopilus durant l'étape d'assemblage. Nous avons montré que les pseudopilines mineures forment un complexe quaternaire non caractérisé auparavant situé au sommet du pseudopilus. La formation du complexe quaternaire, qui initie la formation du pseudopilus, suit un processus séquentiel qui permet son positionnement au sommet du pseudopilus. De plus, nos données convergent vers un rôle central de $XcpV_I$ dans la formation du complexe quaternaire et par la suite pour la formation du pseudopilus.

Nos résultats révèlent également des différences importantes entre le complexe $XcpU_H$-V_I-W_J-X_K et le complexe GspI-J-K. En particulier, nos donnés n'indiquent aucune interaction directe entre $XcpW_J$ et $XcpX_K$ alors que les homologues GspI et GspK interagissent

fortement dans la structure cristalline. Cela pourrait refléter une architecture différente entre les complexes des pseudopilines mineures des différents SST2.

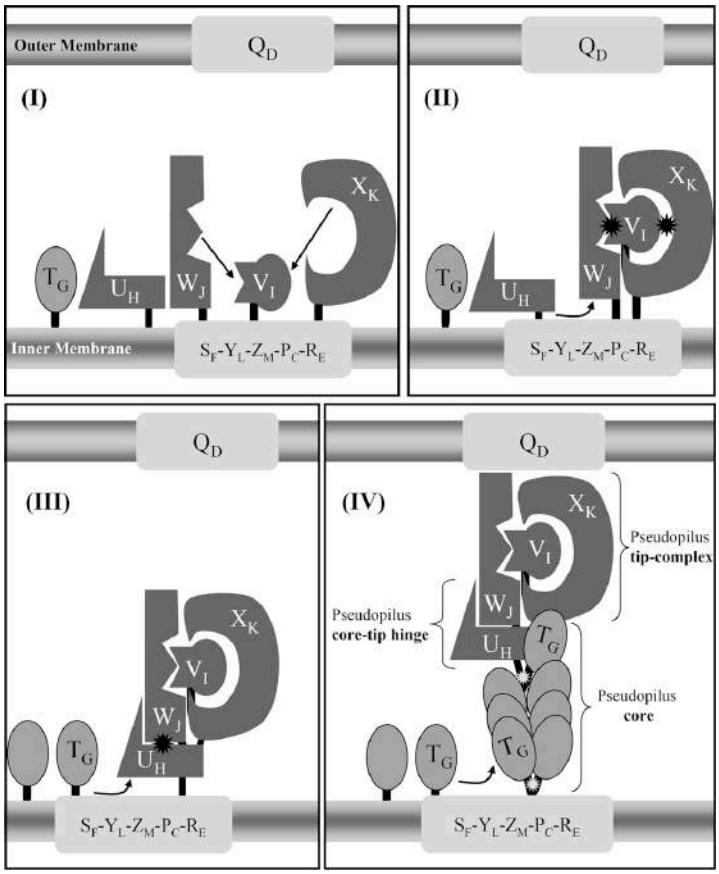


Figure 40 : Modèle représentant les différentes étapes de formation du pseudopilus. Le sécréton Xcp du SST2 Xcp de *P. aeruginosa* est présenté sous forme de trois sous-complexes : i) Le pore de sécrétion est constitué par la sécrétine Q_D dans la membrane externe. ii) La plateforme de membrane interne est composée de XcpS_F-Y_L-Z_M-P_C-R_E. iii) Les pseudopilines XcpT_G, XcpU_H, XcpV_I, XcpW_J et XcpX_K sous leurs formes entières sont localisées au niveau de l'espace périplasmique. Les pseudopilines sont insérées dans la membrane interne par leurs domaines transmembranaires. (I) XcpV_I interagit par son domaine soluble avec les domaines solubles de XcpW_J-X_K. (II) Intégration de XcpU_H au complexe ternaire XcpV_I-W_J-X_K. (III) Une fois que le complexe quaternaire est formé, la pseudopiline majeure XcpT_G s'incorpore à sa base grâce à l'interaction de son domaine hydrophobe avec celui de de XcpU_H. (IV) L'addition successive de XcpT_G au niveau de la base du pseudopilus conduit à l'élongation du pseudopilus en direction du pore de sécrétion.

Article I

The XcpV/GspI pseudopilin has a central role in the assembly of a quaternary complex within the T2SS pseudopilus.

Douzi Badreddine, Durand Eric, Bernard Cédric, Alphonse Sébastien, Cambillau Christian, Filloux Alain, Tegoni Mariella, Voulhoux Romé*.

J Biol Chem. 2009. 284(50):34580-9.

Supplemental Material can be found at:
http://www.jbc.org/content/suppl/2009/10/14/M109.042366.DC1.html

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 284, NO. 50, pp. 34580–34589, December 11, 2009
© 2009 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

The XcpV/GspI Pseudopilin Has a Central Role in the Assembly of a Quaternary Complex within the T2SS Pseudopilus*[S]

Received for publication, July 8, 2009, and in revised form, October 8, 2009 Published, JBC Papers in Press, October 14, 2009, DOI 10.1074/jbc.M109.042366

Badreddine Douzi[‡§], Eric Durand[¶], Cédric Bernard[‡], Sébastien Alphonse[‡], Christian Cambillau[‡], Alain Filloux[¶‖], Mariella Tegoni[‡], and Romé Voulhoux[¶1]

From the [‡]Architecture et Fonction des Macromolecules Biologiques, UMR6098, CNRS, and Universites d'Aix-Marseille I and II, 13288 Marseille Cedex 9, France, the [§]Laboratoire des Maladies Transmissibles et Substances Biologiquement Actives (LR99ES27), Faculté de Pharmacie, TU-5000 Monastir, Tunisia, the [¶]Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires, UPR 9027, CNRS, Université de la Méditerranée, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, 13402 Marseille Cedex 20, France, and the [‖]Centre for Molecular Microbiology and Infection, Division of Cell and Molecular Biology, Imperial College, London SW7 2AZ, United Kingdom

Gram-negative bacteria use the sophisticated type II secretion system (T2SS) to secrete a large number of exoproteins into the extracellular environment. Five proteins of the T2SS, the pseudopilins GspG-H-I-J-K, are proposed to assemble into a pseudopilus involved in the extrusion of the substrate through the outer membrane channel. Recent structural data have suggested that the three pseudopilins GspI-J-K are organized in a trimeric complex located at the tip of the GspG-containing pseudopilus. In the present work we combined two biochemical techniques to investigate the protein-protein interaction network between the five *Pseudomonas aeruginosa* Xcp pseudopilins. The soluble domains of XcpT-U-V-W-X (respectively homologous to GspG-H-I-J-K) were purified, and the interactions were tested by surface plasmon resonance and affinity co-purification in all possible combinations. We found an $XcpV_I$-W_J-X_K complex, which demonstrates that the crystallized trimeric complex also exists in the *P. aeruginosa* T2SS. Interestingly, our systematic approach revealed an additional and yet uncharacterized interaction between $XcpU_H$ and $XcpW_J$. This observation suggested the existence of a quaternary, rather than ternary, complex ($XcpU_H$-V_I-W_J-X_K) at the tip of the pseudopilus. The assembly of this quaternary complex was further demonstrated by co-purification using affinity chromatography. Moreover, by testing various combinations of pseudopilins by surface plasmon resonance and affinity chromatography, we were able to dissect the different possible successive steps occurring during the formation of the quaternary complex. We propose a model in which $XcpV_I$ is the nucleator that first binds $XcpX_K$ and $XcpW_J$ at different sites. Then the ternary complex recruits $XcpU_H$ through a direct interaction with $XcpW_J$.

The extracellular secretion of proteins by Gram-negative bacteria requires specialized secretion machineries to allow the selective passage through the normally impermeable envelope constituted by the cytoplasmic or inner membrane, the periplasm and the outer membrane (OM).[2] In type II secretion systems (T2SSs), exoproteins precursors are first translocated across the inner membrane via either the general export pathway (Sec) or the twin arginine translocation pathway (Tat) and then taken in charge by the secreton for OM translocation (1, 2). The secreton is a multiprotein complex involving at least 12 different proteins called $XcpA_O$, $XcpP_C$–Z_M[3] in our model organism, the Gram-negative bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* (for review see Ref. 3). In the current model for the assembly of the Xcp secreton, three subcomplexes are defined: the inner membrane platform ($XcpR_ES_FY_LZ_M$), required for providing energy to the secretion process; the OM secretin $XcpQ_D$, forming a pore in the OM through which the substrate is secreted; and a third subcomplex called the pseudopilus by homology with the type IV pilus (T4P). Type 4 pili are long fimbrial structures present at the cell surface of various Gram-negative bacteria (4, 5). They are formed in the periplasm by the polymerization of the major pilin subunit. In *P. aeruginosa*, five Xcp proteins ($XcpT_G$ to $XcpX_K$) are, like type IV pilins, processed by the specific prepilin peptidase $XcpA_O$/PilD (6, 7) and have therefore been named pseudopilins. $XcpT_G$ is the most abundant and was therefore called the major pseudopilin (8), in contrast to $XcpU_H$, V_I, W_J, and X_K, which were named minor pseudopilins. $XcpA_O$/PilD cleaves a short leader peptide located at the extreme N terminus of the pilin/pseudopilin and preceding a highly conserved hydrophobic domain. This domain is followed by a less conserved C-terminal soluble domain.

In contrast to T4P, very little is known about the structural organization of the pseudopilus involved in type II secretion because such a structure could not be detected under physiological conditions. Recent works have shown that the major pseudopilin $XcpT_G$ is able, upon overproduction, to form an abnormally long pseudopilus also called hyperpseudopilus (HPP) protruding at the cell surface (9–11). This observation reveals that major pseudopilins such as $XcpT_G$ have the ability to pack into an helical complex similar to the type IV pilus.

* This work was supported by Agence Nationale de la Recherche Program "Jeune Chercheur" Grant ANR-JC07-183230 and by funds from the Royal Society (to A. F.).

[S] The on-line version of this article (available at http://www.jbc.org) contains supplemental Tables S1 and S2 and Figs. S1 and S2.

[1] To whom correspondence should be addressed: LISM-UPR 9027, CNRS, IMM, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille cedex 20, France. Tel.: 33-4-91-16-41-26; Fax: 33-4-91-71-21-24; E-mail: voulhoux@ifr88.cnrs-mrs.fr.

[2] The abbreviations used are: OM, outer membrane; T2SS, type II secretion system; HPP, hyperpseudopilus; RM, reaction mixture; T4P, type 4 pilus.

[3] Because a different nomenclature is used for non-*Pseudomonas* T2SS, the alternative gene or protein nomenclature will also be indicated, for example in $XcpT_G$ the "G" will refer to GspG, which will reciprocally be called $GspG_T$.

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on December 6, 2009

Supplemental Material can be found at:
http://www.jbc.org/content/suppl/2009/10/14/M109.042366.DC1.html

According to this observation, the crystallographic structure of the major type II secretion pseudopilin $PulG_T$ shows an overall fold similar to the major type IV pilin monomer (12). It is a four-stranded anti-parallel β-sheet that forms a buried hydrophobic core with the N-terminal hydrophobic α-helix to create an $\alpha\beta$-roll (see Ref. 13 for review).

The structures of the four T2SS minor pseudopilins from *Escherichia coli* and various *Vibrio* species have recently been solved (14–17). Even though each pseudopilin displays specific motifs, they all show the typical $\alpha\beta$-fold, suggesting that they may physically be incorporated into the pseudopilus.

All of the pseudopilins are essential for secretion, but except for $XcpT_G$, none of them is able to form an HPP upon overproduction (18). Alternatively, specific functions have been considered for minor pseudopilins, such as a role for $XcpV_I$ in HPP initiation and for $XcpX_K$ in the control of HPP length (9, 18). Altogether these data suggest important accessory functions for the minor pseudopilins in the pseudopilus formation.

Several interactions between full-length pseudopilins have been previously detected by various biochemical and genetic approaches (8, 11, 18–21). Interestingly, interactions between the soluble domains were also detected, indicating that contacts between the pseudopilins are not restricted to the N-terminal hydrophobic domain which form the helical backbone as shown with the type IV pilus. The recent co-crystallization of *E. coli* $GspI_V$-J_W-K_X-soluble domains in a ternary complex confirms the capacity of these domains to directly interact (17).

In the present work we extended the study of the interaction network between the five pseudopilin-soluble domains using the *P. aeruginosa* Xcp T2SS as model system. By performing a combination of protein-protein interaction experiments, we brought more understanding into the sequential assembly of the four minor pseudopilins $XcpU_H$-V_I-W_J-X_K. We showed that these proteins could form a yet uncharacterized quaternary complex possibly present at the tip of the $XcpT_G$ pseudopilus. Moreover, our data converge toward the suggestion of a central role of $XcpV_I$ in the formation of the quaternary complex and subsequently for pseudopilus formation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Nomenclature for Soluble Domains of Xcp Pseudopilins Produced and Used in This Study—All of the pseudopilin variants used in this study are deleted for their N-terminal hydrophobic domains; they are called pseudopilin-soluble domains. Then either histidine-tagged (^{his}N) or nontagged (N) soluble domains of pseudopilins were used in this study, where "N" designates any pseudopilins and "^{his}" designates the N-terminal six-histidine tag.

Cloning, Expression, and Purification of Untagged Soluble Domains of the Five Xcp Pseudopilins—The classical heterologous over-expression of the non-tagged minor pseudopilins V_I, U_H, W_J and X_K soluble domains did not give sufficient material. This technical problem was solved by fusing the four constructs to thioredoxin which gives to the construction a soluble character (22). In our constructs, thioredoxin is cleaved off after expression and the resulting proteins are soluble, stable and produced in sufficient amount for biochemical and biophysical characterization.

The DNA sequence encoding non-tagged soluble domain of $XcpT_G$ pseudopilin (T_G) (starting at the Methionine 25 relative to the prepiline peptidase cleavage site was cloned for a periplasmic expression into the Gateway pETG-22b expression vector (23) leading to plasmid pETG-22b-T_G (supplemental Table S1); a His_6 tag encoding DNA and the sequence encoding for a TEV protease cleavage site were inserted in frame between the attB1 and the sequence encoding T_G. Primers (T_G-Forward and T_G-Reverse) used for amplification are shown in supplemental Table S2.

The DNA sequence encoding nontagged soluble domains of XcpU, V, W, and X pseudopilins, respectively called V_I, U_H, W_J and X_K and corresponding to the residues serine 22 for V_I, serine 23 for U_H, arginine 22 for W_J, and arginine 23 for X_K relative to the prepiline peptidase cleavage site were cloned for cytoplasmic expression into the pETG-20A expression vector leading to plasmids pETG-20A-U_H, pETG-20A-V_I, pETG-20A-W_J, and pETG-20A-X_K (supplemental Table S1). The resulting constructions thus contain a N-terminal thioredoxin sequence, followed by a His_6 tag, the attB1, a His_6 tag, and the TEV protease cleavage site. The primers (U_H-V_I-W_J-X_K-Forward and -Reverse) used for amplification of soluble domains of following pseudopilins are presented in supplemental Table S2.

E. coli BL21 (DE3) pLys-S (Invitrogen) cells were transformed with pET-22b-T_G. Precultures grown on Luria Broth at 37 °C were used to start the culture (A_{600} = 0.4) at 37 °C in auto-inductor ZYP-5052 medium (BNL; rich medium containing yeast extract, tryptone, phosphate-buffer, 0.05% glucose, 0.5% glycerol, and 0.2% lactose). At A_{600} = 0.8, the temperature was decreased to 30 °C, and the cells were cultivated for 18 h. Ampicillin (100 μg/ml) and chloramphenicol (35 μg/ml) were present continuously during expression. The periplasmic purification of T_G, in line with the procedure described in Ref. 18, started with an osmotic shock followed by dialysis against 50 mM phosphate buffer, 150 mM NaCl, pH 8, overnight at 4 °C. The resulting fraction goes through the chromatographic steps as specified below for the other pseudopilins.

E. coli BL21 (DE3) pLys-S cells were transformed with pETG-20A-U_H, pETG-20A-V_I, pETG-20A-W_J, and pETG-20A-X_K. Precultures grown on Luria Broth at 37 °C were used to inoculate large cultures in ZYP-5052 auto-inductor medium. In the case of V_I, the culture was carried on at 30 °C for 24 h. In the case of U_H, W_J, and X_K, the cultures were carried on at 37 °C. At A_{600} = 0.8, the temperature was decreased at 17 °C, and the cells were allowed to grow for 24 h. The precultures and cultures were performed in presence of ampicillin (100 μg/ml) and chloramphenicol (35 μg/ml). The cytoplasmic purification of U_H, V_I, W_J, and X_K started by a cell lysis step was performed at 4 °C. The cells were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 μg/ml lysozyme, phenylmethylsulfonyl fluoride), submitted to three freeze-thawing cycles, and sonicated after the addition of DNase at 20 μg/ml and $MgCl_2$ at 20 mM. The pellet and soluble fraction were separated by centrifugation for 30 min at 16,099 × *g*.

Soluble fractions containing T_G-U_H-V_I-W_J-X_K were 1) dialyzed against 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0; 2) loaded on a nickel (HisTrap™ FF crude column 1.6 × 2.5 cm (5 ml)) on ÄKTA Express (Amersham Biosciences) pre-equilibrated in

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on December 6, 2009

Supplemental Material can be found at:
http://www.jbc.org/content/suppl/2009/10/14/M109.042366.DC1.html

50 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, pH 8.0; 3) eluted by washing with 50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8.0, in the presence of 250 mM imidazole; 4) desalted on HiPrep 26/10 Desalting column (Sephadex™ G-25; Amersham Biosciences); 5) cleaved by the TEV protease 1 mg/ml (4 °C, 18 h); and 6) loaded on a nickel column pre-equilibrated in 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0, which selectively retard both the TEV and the fusion protein, which are still His_6-tagged. The untagged pseudopilin was recuperated in the flow-through and concentrated on Centricon (cut-off 3 kDa). After concentration, the pseudopilins were passed through a Sephadex G75 equilibrated in 50 mM phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.

The final concentrations of the proteins were calculated on the value of $A_{280\,nm}$ by using the following extinction co-efficients found by ProtParam (T_G 12,000 $(mg/ml)^{-1}$; V_I 11,563 $(mg/ml)^{-1}$; U_H 16,177 $(mg/ml)^{-1}$; W_J 24,169 $(mg/ml)^{-1}$; X_K 34,071 $(mg/ml)^{-1}$). The yields were 4, 8, 8, 18, and 11 mg/liter of T_G, V_I, U_H, W_J and X_K, respectively, evaluated by NanoDrop (Thermo Scientific).

Cloning and Expression of the His_6-tagged Soluble Domains of Xcp Pseudopilins—The DNA sequence encoding His_6-tagged soluble domains of $XcpT_G$, U_H, W_J, and X_K pseudopilins, respectively called $^{his}T_G$, $^{his}U_H$, $^{his}W_J$, and $^{his}X_K$ and corresponding to residues methionine 25 for $^{his}T_G$, serine 23 for $^{his}U_H$, arginine 22 for $^{his}W_J$, and arginine 23 for $^{his}X_K$ relative to the prepiline peptidase cleavage site were generated following the strategy used for $XcpT_G$ and $XcpX_K$ described in Ref. 18, where $XcpT_{G\text{-}NH}$ and $XcpX_{K\text{-}NH}$ are now called $^{his}T_G$ and $^{his}X_K$, respectively. Briefly, plasmids pET-$^{his}U_H$ and pET-$^{his}W_J$ were generated as follows. The genes encoding pseudopilin-soluble domains were PCR-amplified using primers 5′UpC1 (BamHI;His_6) and 3′UpC2 (HindIII) for *xcpU*$_H$ and 5′WpC1 (BamHI;His_6) and 3′WpC2 (HindIII) for *xcpW*$_J$. The PCR introduced a region encoding an N-terminal His_6 tag together with BamHI/HindIII cloning sites. PCR products were first subcloned into the pCR2.1 vector (Invitrogen) and sequenced. BamHI/HindIII DNA fragments were then generated and subcloned into pET22b (Novagen). The cloning created an in-frame fusion of the *xcp* genes with the *pelB* region encoding the N-terminal signal sequence and under the control of the T7 promoter of the pET22b. In this way the recombinant protein could be produced in the periplasm. Production of the recombinant proteins was performed in the *E. coli* BL21 (DE3) strain (Invitrogen) grown in ZYP-5052 auto-inducing medium. After 4 days of growth, His_6-tagged pseudopilins were purified from the periplasmic fraction by affinity chromatography following the procedure previously described in (18) with an additional step of gel filtration on HiLoad 16/60 Superdex 75 (Pharmacia) in buffer: 50 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7. The purified proteins were concentrated using Centricon (Millipore) with a cut-off size of 5 kDa. The final sample concentrations were 13.1 mg/ml for $^{his}T_G$, 2.2 mg/ml for $^{his}U_H$, 4.4 mg/ml for $^{his}W_J$, and 1.4 mg/ml for $^{his}X_K$ as evaluated by the Bradford colorimetric test.

Affinity Measurements—Steady state or kinetic analysis of the interaction between different pseudopilins was performed on BIAcore 1000 at 25 °C. All of the buffers were 0.2-μm filtered and degassed before use. We indicate with ΔRU the variation of the resonance plasmon signal recorder upon addition of a ligand to the surface of the chip or addition of an analyte to the previously immobilized protein. The CM5 (carboxymethylated dextran) sensor chip was coated with V_I and X_K (pI > 8), immobilized by amine coupling (ΔRU = 300–700). The immobilization of the other Xcp was prevented by their low pI. A control flow cell was activated for amine coupling and desactivated, under conditions identical to the other flow cells. Solutions of X_K, T_G, U_H, W_J, V_I, the binary mix W_J-X_K, and the ternary mix, W_J-X_K-U_H (0.625–30 μM in 50 mM phosphate, pH 7.0, 150 mM NaCl, 0,005% surfactant P20) were passed over the flow cell with V_I and X_K covalently bound and on the control flow cell. Binding traces were recorded for three to six concentrations of analyte, in duplicate. In each cycle, 50 μl of buffer (50 mM phosphate, pH 7.2, 150 mM NaCl, 0,005% surfactant P20) were injected first to stabilize the base line; the analyte (80–320 μl) was then injected. No binding regeneration cycle was necessary because spontaneous dissociation was observed in each binding experiment.

The chip nickel-nitrilotriacetic acid was saturated with Ni^{2+} and regenerated with EDTA 350 mM. The buffer was 10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.005% surfactant P-20, supplemented with 0.05 mM EDTA for the continuous flow pump and 3 mM EDTA for the sample pump. The chip was first saturated with Ni^{2+} by washing it with 0.5 mM $NiCl_2$ (20 μl at 20 μl/min); one of the His_6-tagged pseudopilins ($^{his}U_H$, $^{his}W_J$, or $^{his}X_K$) was then passed over the chip (10–50 nM, 40 μl at 20 μl/min, ΔRU = 200–400), followed by the non-His_6-tagged pseudopilins (U_H, T_G, W_J, X_K, and V_I) (0.3125–5 μM in 10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0,005% surfactant P20, 0.05 mM EDTA). In control traces, $NiCl_2$ injection was followed by injection of buffer (same volume as the His_6-tagged protein) and by the injection of the untagged proteins. The binding traces were recorded for three to six concentrations of analyte, in duplicate. Regeneration was achieved by washing the flow cell with 350 mM EDTA (20 μl at 20 μl/min). We were able to immobilize and get a stable signal for each of the His_6-tagged pseudopilin; nevertheless, in all cases but $^{his}U_H$, the very intense aspecific signal prevented a correct calculation of the interaction sensorgrams.

The chip streptavidine was used in 50 mM phosphate buffer, 150 mM NaCl, pH 7. Washing with 1 M NaCl and 50 mM NaOH was carried out as specified by the supplier before fixing biotinylated T_G and W_J (100 nM, 2–70 μl at 10 μl/min) at 500–600 ΔRU. Nonbiotinylated T_G, U_H, V_I, W_J, and X_K in 50 mM phosphate, 150 mM NaCl, pH 7, were passed over the flow cells (0.625–10 μM, 60 μl at 20 μl/min). The binding traces were recorded for four to five concentrations of analyte, in duplicate. No regeneration was necessary because spontaneous dissociation was observed. Reproducible interactions were detected only on immobilized W_J.

The aspecific signal for the experiments reported in supplemental Fig. S1 was 2–6% of the specific for V_I on X_K, X_K on V_I, and U_H on W_J, and 30–40% of the specific for W_J on V_I, W_J on U_H, and V_I on W_J. The aspecific signal for the experiments reported in Fig. 2 was 20–30% for W_J-X_K on V_I, and 7% for W_J-X_K-U_H on V_I. Aspecific binding was subtracted from binding traces before calculation. Dissociation constants (K_{diss}) can

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on December 6, 2009

Supplemental Material can be found at:
http://www.jbc.org/content/suppl/2009/10/14/M109.042366.DC1.html

be estimated with the BIA-Evaluation software either as the ratio of the kinetic dissociation and association constants (k_{off}/k_{on}) or on the basis of the steady state levels of ΔRU, directly related to the concentration of complex. Fitting of a secondary plot of the concentration of complex at different concentrations of analyte allows the estimation of K_{diss}. In the present case, k_{on} and k_{off} were always very fast, and their estimation has been possible only for the complex W_J-X_K. Indeed, as specified by the supplier in the case of BIAcore 1000, good estimations of k_{on} and k_{off} can be calculated for the values in the range 10^3–10^6 M^{-1} s^{-1} and 10^{-5}–10^{-2} s^{-1}, respectively. Out of these ranges, the error of the estimation is very large.

T_G and W_J have been biotinylated with Sulfo-NHS-SS-Biotin (Pierce) following the protocol specified by the supplier, with minor modifications. The proteins were diluted at 25 μM in 50 mM phosphate buffer, 150 mM NaCl, pH 7.5, and the reactive was added at 100 μM (molar ratio, 4:1). The reaction was let going for 4 h on ice. To eliminate the excess reactive, the protein solutions were first filtered on NAP-5 column (GE Healthcare) equilibrated in the same buffer as specified above and then dialyzed by NOVAGEN Dialyzer Midi (cut-off, 3.5 kDa) against two times 400 ml of the same buffer as specified above at 4 °C overnight.

Batch Co-purification of Pseudopilin Soluble Domains—We used as bait His_6-tagged pseudopilin soluble domains. All of the experiments were carried out at 4 °C. In reaction mixture 1 (RM1), ^{his}N (where "N" designates any pseudopilins) was incubated in 1 ml of equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole) with 200 μl of 5% nickel-nitrilotriacetic acid magnetic bead solution (Qiagen) pre-equilibrated in equilibration buffer. In reaction mixture 2 (RM2), the untagged pseudopilin partners were incubated in 1 ml of equilibration buffer. Both RM1 and RM2 were placed on a rotary shaker and gently mixed for 1 h. RM1 was placed on a magnet for 1 min to catch the magnetic beads. The flow-through was discarded, and the magnetic beads were rinsed twice with 500 μl of equilibration buffer including for each wash 1 min of mixing on the rotary shaker and 1 min of catch on the magnet. Then RM2 was mixed with the ^{his}N-coated magnetic beads issued from RM1 and gently mixed on the rotary shaker for 1 h. After 1 min catch on the magnet, the flow-through was discarded, and the magnetic beads were washed with 500 μl of wash buffer (50 mM Tris-HCl, pH8, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole) six times, including for each wash 1 min of mixing on the rotary shaker and 1 min of catch on the magnet. Proteins specifically bound to the magnetic beads were then eluted with 100 μl of elution buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 300 mM NaCl, 500 mM imidazole) two times, including for each elution 1 min of mixing on the rotary shaker, a spin at 8734 × *g* to pellet the beads, and 1 min of catch on the magnet. To analyze each fraction, 18 μl of protein samples were mixed with 6 μl of 4× concentrated SDS loading buffer. The 24-μl samples were boiled for 10 min and then loaded and run on a 15% SDS-PAGE gel as described in Ref. 18. After electrophoresis, the gels were stained with Coomassie Blue. For each co-purification experiment, the following amount of pseudopilins has been used: $^{his}T_G$ (137 μg), $^{his}U_H$ (71 μg), $^{his}W_J$ (259 μg), T_G (116 μg), U_H (95 μg), V_I (49 μg), W_J (150 μg), and X_K (119 μg).

Quantification of Bands from Polyacrylamide Gels—Coomassie Blue-stained gels were scanned. The digitalized gels were then analyzed with the free software "ImageJ for Mac" (24) to quantify and compare the intensity of the protein bands.

Native-PAGE and Two-dimensional SDS-PAGE—The eluted complex presented in Fig. 3*C* (*panel 1*, *lane E*) has been electrophoresed on a Native 8–16% Tris-HCl PAGE (Bio-Rad) at 4 °C in a Tris/Glycine running buffer for 1 h at 50 V and a further 2 h at 125 V. The native-PAGE was then stained with Coomassie Brillant Blue R-250. The entire lane containing the electrophoresed pseudopilin complexes was then cut off the gel, wrapped in plastic film, and boiled in a water bath for 30 min for complex dissociation. The lane was inserted horizontally into the large well of a 15% SDS-PAGE, together with purified proteins in other wells. After electrophoresis under denaturing conditions, the gel was stained with Coomassie Brillant Blue R-250.

RESULTS

Systematic Analysis for Interactions between the Five Xcp Pseudopilin-soluble Domains—We have analyzed the interaction between the five Xcp pseudopilin soluble domains of *P. aeruginosa* T2SS by using surface plasmon resonance (BIAcore). Three types of immobilization were used: covalent amine coupling to the chip CM5, affinity binding to the chips nickel-nitrilotriacetic acid, and streptavidine. For all of the interactions tested, the K_{diss} values were found in the micromolar range, and for all interactions but one (see below), the association and dissociation rate (k_{on} and k_{off}) were too fast to be calculated, suggesting a transient association. The estimation of the K_{diss} values was carried out by plotting the ΔRU value at steady state level, directly related to the concentration of complex, as a function of the concentration of analyte.

First, we investigated systematic binary interaction between pseudopilins; primary surface plasmon resonance data are presented in supplemental Fig. S1. Each immobilized pseudopilin has been exposed to all of the other pseudopilins, including itself. The interaction between two given pseudopilins has been detected twice, with one or the other partner immobilized (Fig. 1 and supplemental Fig. S1). In all of the cases but one (discussed below), the calculated K_{diss} values are slightly different (two to four times) but in the same order of magnitude.

Binding results were recorded in the presence of immobilized U_H, V_I, W_J, and X_K, whereas immobilized T_G did not show any significant binding (supplemental Fig. S1). The histidine-tagged U_H ($^{his}U_H$) was found to interact only with W_J. The calculated K_{diss} value is 0.72 or 2.85 μM, depending whether $^{his}U_H$ or W_J was immobilized (Fig. 1 and supplemental Fig. S1). V_I interacts with W_J and X_K. The K_{diss} for the couple V_I-W_J is 4.6 or 1.6 μM when V_I or W_J is immobilized, respectively. The K_{diss} value for the couple V_I-X_K is 19.8 and 1.55 μM when V_I or X_K is immobilized, respectively. The significant discrepancy in K_{diss} value (~10-fold difference) observed with the couple V_I-X_K might be ascribed to a partial hindrance of the binding site of V_I, the smallest partner, when immobilized. It should be noted that the orientation of the protein immobilized on chip

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on December 6, 2009

Supplemental Material can be found at:
http://www.jbc.org/content/suppl/2009/10/14/M109.042366.DC1.html

A

BOUND LIGAND	ANALYTE: T_G (12kDa)	U_H (16kDa)	V_I (11kDa)	W_J (24kDa)	X_K (34kDa)
T_G (SA)	-	-	-	-	-
$^{his}U_H$ (NTA)	-	-	-	0.72±0.12	-
V_I (CM5)	-	-	-	4.6±0.2	19.8±0.4
W_J (SA)	-	2.85±0.15	1.6±0.2	-	-
X_K (CM5)	-	-	1.55±0.85	-	-

B

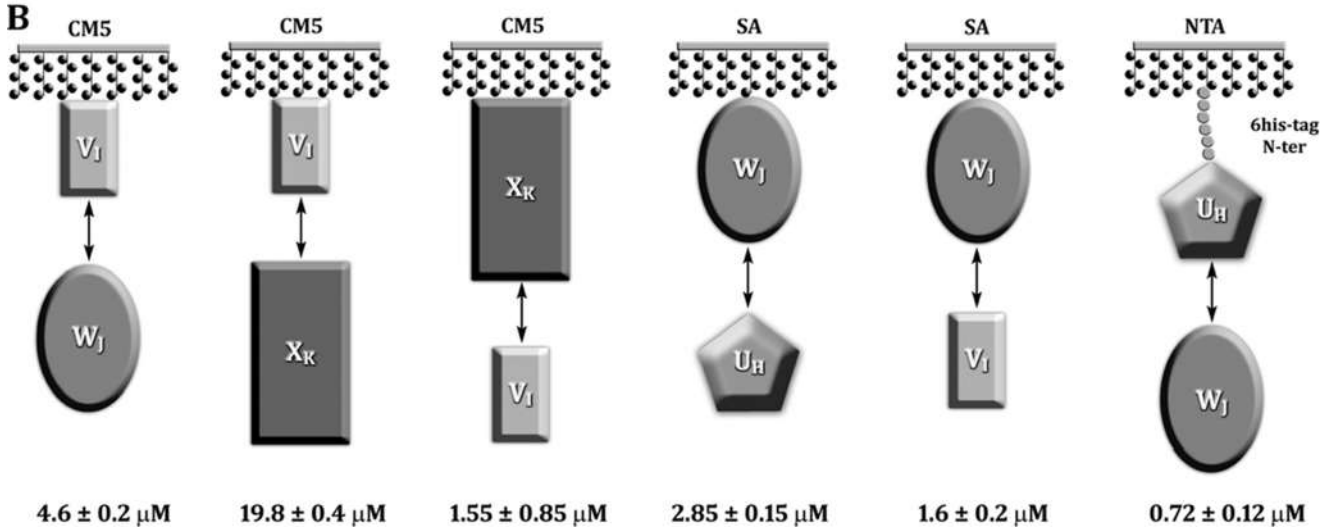


FIGURE 1. **Pseudopilin interaction network using surface plasmon resonance (BIAcore).** *A*, each ligand was tested with the five analytes. The K_{diss} values (μM) for the interaction were detected. In parentheses are the chip used for each ligand and the molecular mass of each analyte. *B*, schemes for all positive interactions, with the K_{diss} values indicated.

CM5 by amine coupling and on chip streptavidine by the interaction streptavidine-biotine is random, because it depends on the distribution of lysines on the protein surface. Moreover, the immobilization itself may reduce the protein mobility and accessibility compared with a protein freely diffusing in solution. As a result, restricted interaction at the binding site may occur with a bigger probability when the immobilized protein is small.

It is important to note that T_G interacts neither with itself nor with any other pseudopilins and that none of the pseudopilins forms homodimers. Moreover, it is tempting and may not be worthless to make a relation between the transitory nature of all the interactions detected, between domains of the pseudopilins, and the ephemeral existence frequently proposed for the type II pseudopilus.

Our systematic approach clearly identified three interactions U_H-W_J, V_I-W_J, and V_I-X_K. We further investigated whether the two partners of a single pseudopilin bind at the same or at two different sites.

Epitope Mapping and Binary and Ternary Interaction of Xcp Pseudopilin-soluble Domains—To determine the position of the binding sites and further elaborate on the pseudopilin complex organization, we exposed V_I to several analytes (Fig. 2): W_J first, followed by a mix of W_J-X_K and W_J-X_K-U_H.

At a concentration of 5 μM, the binding of W_J-X_K mix to V_I is characterized by a larger amplitude compared with the binding of W_J and X_K alone on V_I (Fig. 2, *A* and *B*) and a slower and therefore measurable k_{on} (3×10^3 M^{-1} s^{-1}) and k_{off} (7×10^{-3} s^{-1}); the affinity of the W_J-X_K mix (3 μM) is slightly higher but close to that of W_J alone (4.6 μM) and much higher than for X_K alone (19.8 μM) (Fig. 1). The change in amplitude and binding pattern compared with the one of W_J and X_K alone validate the formation of a complex between V_I, W_J, and X_K. Because we did not find any binary interaction between W_J and X_K independently, we propose that W_J and X_K both bind V_I, but at distinct epitopes (Fig. 2*C*).

To further investigate the interaction network between the pseudopilin soluble domains, we studied the binding of W_J-X_K-U_H ternary mix on V_I covalently bound and compared the

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on December 6, 2009

Supplemental Material can be found at:
http://www.jbc.org/content/suppl/2009/10/14/M109.042366.DC1.html

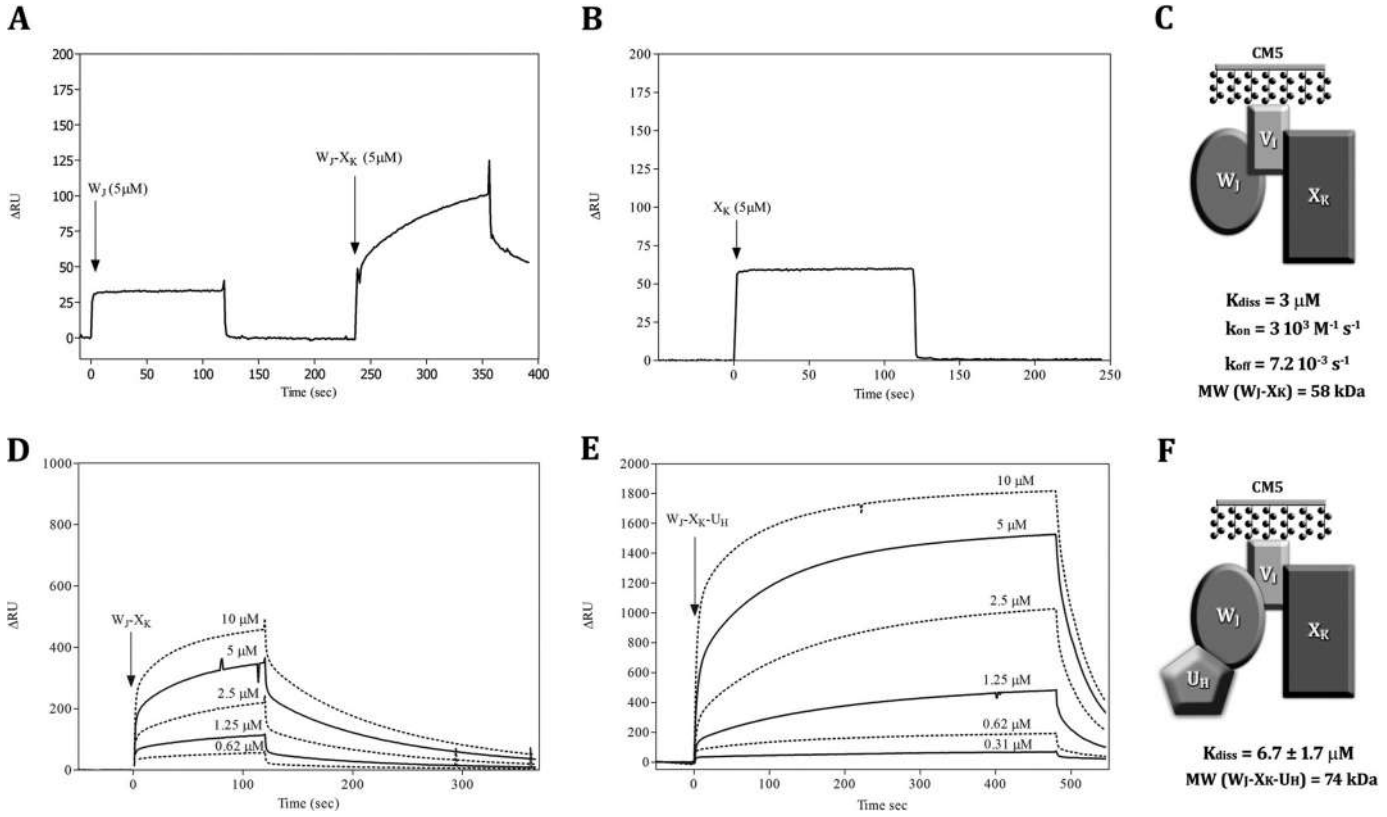


FIGURE 2. **Epitope mapping and binary and ternary interaction of pseudopilin soluble domains using surface plasmon resonance (BIAcore).** *A*, W_J (5 μM) and binary mix W_J-X_K, (5 μM) were passed on V_I bound to a CM5 chip. *B*, binding pattern of X_K alone (20–1.25 μM) on V_I bound to a CM5 chip. *D*, binding pattern of binary mix W_J-X_K (10–0.62 μM) on V_I bound to a CM5 chip. *E*, binding pattern of W_J-X_K-U_H mix (10–0.31 μM) on V_I bound to a CM5 chip. *A*, *B*, *D*, and *E*, we report on the *y* axis the variation of plasmon resonance in arbitrary unit (ΔRU) and the reaction time on *x* axis. *C* and *F*, schemes of the W_J-V_I-X_K and U_H-W_J-V_I-X_K complexes proposed, with K_{diss} of the interaction and k_{on} and k_{off} values when calculable.

results with those found for the W_J-X_K mix on V_I. The purpose of this study is to demonstrate the possible influence of a third component on the binding on V_I. The ternary mix W_J-X_K-U_H binds to V_I and presents a K_{diss} value of 6.7 μM, two times larger than that of W_J-X_K (3 μM); the amplitude also is four to five times larger than that of W_J-X_K (Fig. 2, *D* and *E*). The change in amplitude and binding pattern with the ternary mix compared with the one obtained with binary mixes suggests the formation of a quaternary complex. As previously proposed, the epitopes of W_J and X_K on V_I are distinct (Fig. 2*C*), and U_H only binds W_J (Fig. 1). We therefore propose the existence of a quaternary complex where V_I plays a central role with X_K and W_J, on which U_H binds (Fig. 2*F*).

Characterization of the XcpU$_H$-W$_J$-V$_I$-X$_K$ Pseudopilin Quaternary Complex—To thoroughly provide evidence for the assembly of the quaternary pseudopilin complex suggested by BIAcore experiment, we performed affinity co-purification between all the pseudopilin soluble domains. For these experiments we used both tagged (^{his}N) and untagged (N) pseudopilins. By affinity co-purification (see "Experimental Procedures"), $^{his}W_J$ was able to pull-down U_H (Fig. 3*A*, *panel 1*, *lane E*) in a specific manner because U_H could not bind to the magnetic beads in the absence of $^{his}W_J$ (Fig. 3*A*, *panel 2*, *lane E*), thus confirming the U_H-W_J interaction. Then X_K and V_I were both co-purified with $^{his}W_J$ (Fig. 3*B*, *panel 1*, *lane E*), confirming the existence of a ternary complex between V_I, W_J, and X_K (Fig. 3*B*, *panel 1*). Because X_K could not be co-purified with $^{his}W_J$ in the absence of V_I (Fig. 3*B*, *panel 2*, *lane E*), we confirm by this approach that V_I is the linker connecting W_J to X_K in the ternary complex formed by W_J, V_I, and X_K pseudopilin-soluble domains. This observation validates that W_J and X_K do not interact directly and form a ternary complex via V_I.

Interestingly, U_H added as a fourth partner in the affinity purification assay was co-purified together with the ternary complex $^{his}W_J$-V_I-X_K (Fig. 3*C*, *panel 1*, *lane E*), confirming the identification of the quaternary complex U_H-V_I-W_J-X_K. The integrity of the quaternary complex seems to rely on the presence of V_I because the absence of V_I triggered a massive loss of X_K co-purification with $^{his}W_J$ (Fig. 3*C*, *panel 2*, *lane E*). We showed that the small amount of X_K eluted in the absence of V_I (Fig. 3*C*, *panel 2*, *lane E*) is not bound to $^{his}W_J$ and corresponds to the nonspecific binding of X_K to the column because at least an equal amount is eluted in the absence of $^{his}W_J$ (supplemental Fig. S2, *C* and *D*). We then concluded that X_K associates to the complex through V_I. In contrast, we observed that U_H remains significantly bound to $^{his}W_J$ in absence of V_I (Fig. 3*C*, *panel 2*), which is in agreement with a direct interaction between U_H and $^{his}W_J$ (Fig. 3*A*, *panel 1*). Quantification of the bands corresponding to U_H and X_K in Fig. 3*C* (*panels 1* and *2*) shows that, after subtracting the nonspecific binding for both proteins, X_K is completely lost in the absence of V_I, whereas one-fourth of U_H is still significantly associated to $^{his}W_J$ (supplemental Fig. S2). Thus, U_H can still bind to $^{his}W_J$ in the absence of V_I and X_K, albeit with a decreased affinity, assuming that the affinity of U_H

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on December 6, 2009

Supplemental Material can be found at:
http://www.jbc.org/content/suppl/2009/10/14/M109.042366.DC1.html

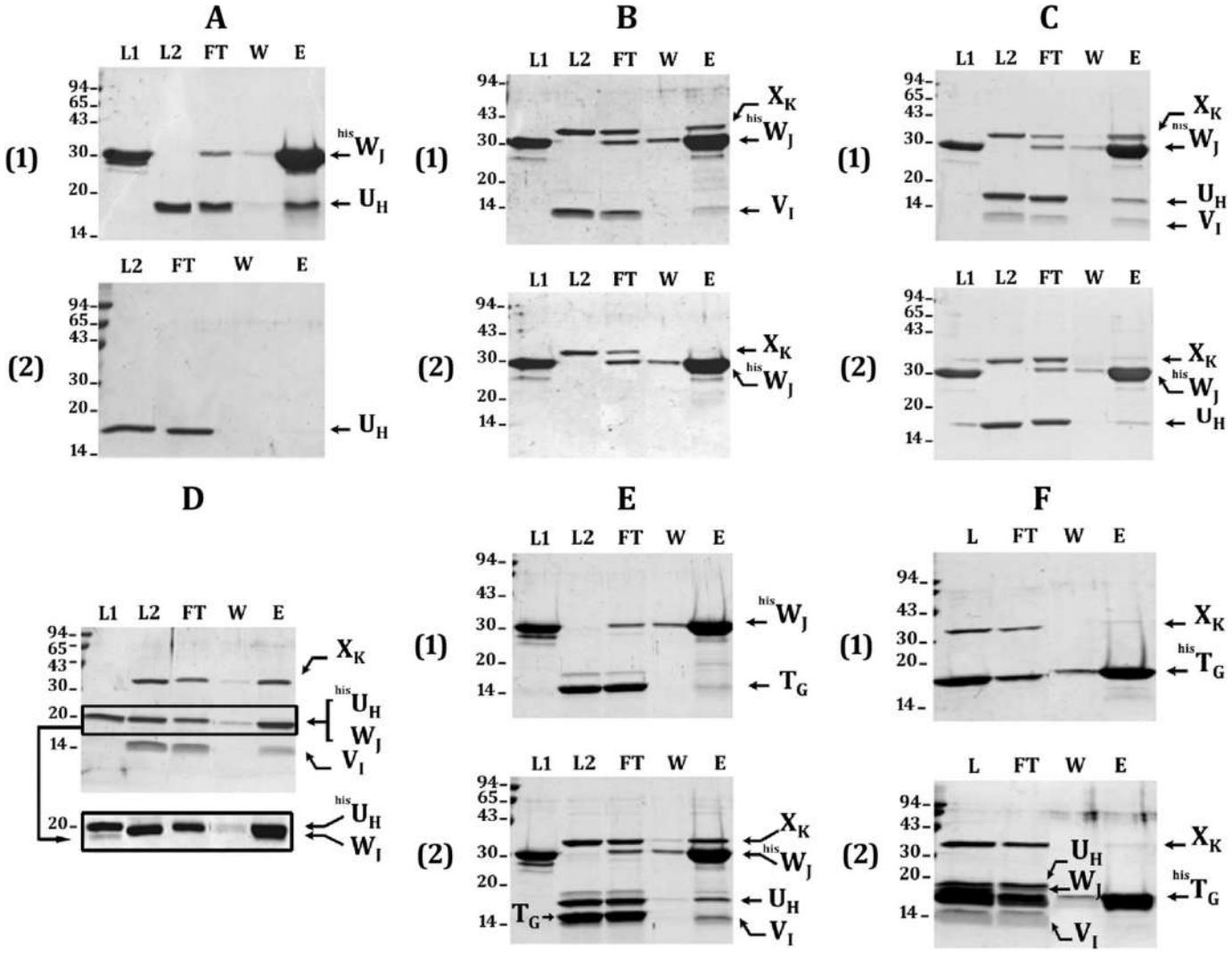


FIGURE 3. **Batch co-purification of pseudopilin-soluble domains on affinity column.** Each of the His_6-tagged protein was mixed with different untagged protein partners to dissect the pseudopilin quaternary complex. W_J-U_H interaction is shown in *A*; the requirements of V_I for the formation of W_J-V_I-X_K ternary and U_H-W_J-V_I-X_K quaternary complexes are presented in *B* and *C*, respectively; *E* and *F* demonstrate that T_G does not integrate the U_H-W_J-V_I-X_K quaternary complex. After affinity co-purification of proteins bound to the Ni^{2+}-NTA-magnetic beads, the collected fractions were analyzed on a 15% SDS-PAGE. After electrophoresis, the gel was stained with Coomassie Blue. *Fractions L1*, *L2*, and *L*, respectively, contain the His_6-tagged protein, the untagged protein partners, or both tagged and untagged proteins. *Fraction FT* contains the flow-through, *fraction W* contains the final wash, and *fraction E* contains the eluate. The positions of molecular mass markers are indicated on the *left side* of each gel (kDa). The positions of the various pseudopilin periplasmic domains are indicated on the *right side* of each gel or lane. In *D*, when the samples were run on a 12% SDS-PAGE for a longer time, the $^{his}U_H$ and W_J bands could be distinguished (surrounded with a frame), but under these conditions, V_I runs out of the gel (not shown). The presence of $^{his}U_H$ and W_J in the doublet band (*lane E*) was confirmed by mass spectrometry. The *faint band* present just below $^{His}W_J$ in the presence or not of other pseudopilins corresponds to a $^{His}W_J$ degradation product, as confirmed by mass spectrometry analysis.

is improved by the presence of V_I and X_K. We are therefore tempted to propose that the W_J-V_I-X_K trimeric complex could be a prerequisite for the proper integration of U_H into the complex. Finally, the comparison between the two co-purification experiments in the presence or absence of U_H (Fig. 3, compare panels 2 in *B* and *C*) shows that X_K does not interact with W_J even in presence of U_H, a result that confirms the central role for V_I in the initiation of the quaternary complex.

To further confirm the formation of the U_H-W_J-V_I-X_K quaternary complex, we tested the co-purification of $^{his}U_H$ together with the three other minor pseudopilin-soluble domain (Fig. 3*D*). The experiment showed that $^{his}U_H$ could co-purify V_I, W_J, and X_K (Fig. 3*D*), confirming the formation of the quaternary complex.

Moreover, we clearly show that the soluble domain of XcpT could not integrate the quaternary complex formed by the minor pseudopilin-soluble domains. We first tested the co-purification of $^{his}W_J$ together with T_G in presence or absence of the three other minor pseudopilins. The results presented in Fig. 3*E* indicate that T_G could not bind $^{his}W_J$ even in presence of V_I, U_H, and X_K. In addition, when using $^{his}T_G$ as bait, none of the minor pseudopilins could be co-purified (Fig. 3*F*). Altogether, the data presented in Fig. 3 (*E* and *F*) indicate that the T_G-soluble domain does not interact with any component of the minor pseudopilin quaternary complex either alone or in complex.

Direct Evidence of the Existence of the Quaternary Complex $Xcp^{his}W_J$-U_H-V_I-X_K—Using affinity co-purification we have clearly shown that the periplasmic domains of the four minor

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on December 6, 2009

Supplemental Material can be found at:
http://www.jbc.org/content/suppl/2009/10/14/M109.042366.DC1.html

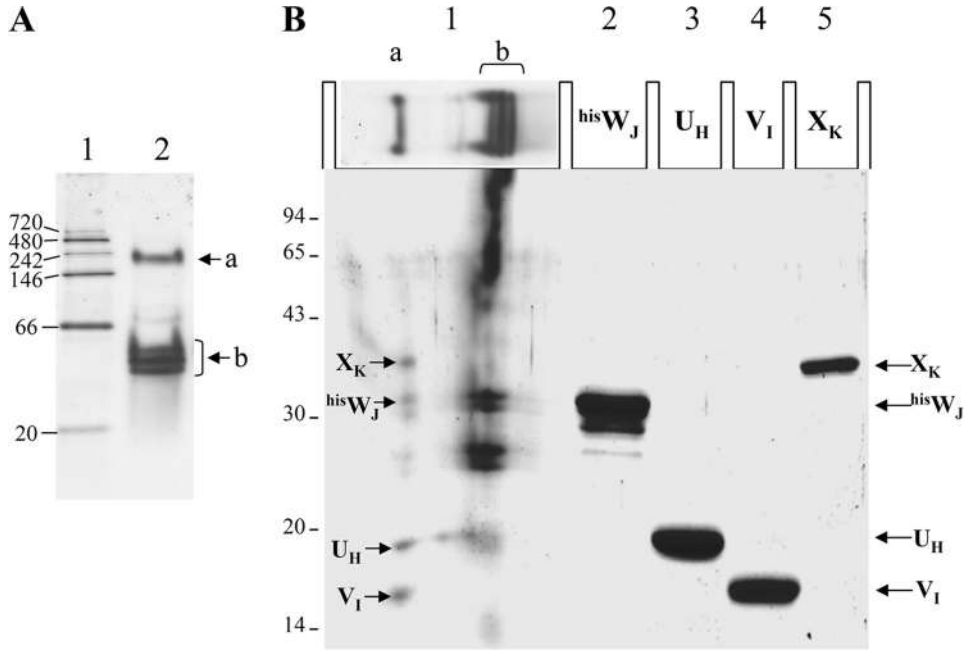


FIGURE 4. **Direct evidence of the quaternary complex Xcp $^{his}W_J$-U_H-V_I-X_K.** *A*, native 8–16% Tris-HCl PAGE (Bio-Rad) showing the migration of a native low molecular mass marker (*lane 1*) and the quaternary complex eluted from the co-purification presented in Fig. 3*C* (*panel 1*, *lane E*). The position of the two major, "a" and "b" native complexes are indicated. *B*, second dimension: 15% SDS-PAGE showing the composition of the complex isolated from the Native-PAGE. *Lane 1* contains the entire *lane 2* from *A* that has been cut off, boiled, and placed horizontally in the slot (see "Experimental Procedures"). *Lanes 2-5* contain purified hisW$_J$, U$_H$, V$_I$, and X$_K$, respectively. The positions of the pseudopilins periplasmic domains are indicated on the *right* and reveal the presence of four of them in the quaternary complex (*a*) and of Xcp^{his}W$_J$and XcpU$_H$ in the binary complex (*b*). Denaturated low molecular mass markers are shown on the *left* of the gel.

Xcp pseudopilins interact together, which proves indirectly the existence of the quaternary complex W_J-U_H-V_I-X_K. To show the physical existence of this quaternary complex, we have subjected the previously eluted complex (Fig. 3*C*, *panel 1*, *lane E*) to native-PAGE. The migration of the eluted quaternary complex on the native-PAGE is presented in Fig. 4*A* (*lane 2*). Interestingly, the complex dissociates in two major bands, a upper band (Fig. 4*A*, *a*) migrating right below the 242-kDa native marker and a lower band (Fig. 4*A*, *b*) migrating below the 66-kDa native marker. To analyze the composition of the two bands, the entire *lane 2* of the native PAGE has been cut off, boiled, and run on a SDS-PAGE (see "Experimental Procedures"). The results, presented in Fig. 4*B*, show that the upper band (*a*) is composed of the four minor pseudopilins, thus revealing their association in a quaternary complex, whereas the lower band (*b*) is composed of the already identified $^{his}W_J/U_H$ pseudopilin binary complex (Fig. 3*A*, *lane E*). We think that the lower band is composed of the excess of the tagged protein ($^{his}W_J$), and the upper band is probably the true stoichiometric quaternary complex.

DISCUSSION

By using a combination of protein-protein interaction approaches, we have investigated the interaction network between the soluble domains of the five pseudopilins involved in the *P. aeruginosa* T2SS. The T2SS piston model previously proposed (25) suggests that the secretion process requires the assembly of a pseudopilus, which pushes the exoprotein out of the cell and through the OM secretin.

The present work together with pseudopilin three-dimensional structures (12, 14, 15, 17) confirm that two distinct complexes contribute to the pseudopilus structure. First, the pseudopilus core is formed by the homomultimerization of the major pseudopilin through interaction between hydrophobic domains. Second, an heteromeric complex contains at least three of the minor pseudopilins (17). During the pseudopilus biogenesis, the assembly of these complementary structures can follow two possible scenarios. In the first, the pseudopilus core forms first, and the minor pilin complex integrates the pseudopilus from its base, thus stopping its elongation. Alternatively, the minor pilin complex forms first, and underneath takes place the assembly of the pseudopilus core. As a result the minor pseudopilin complex will be located at the tip and elongation may stop because of interaction with the OM secretin. Several arguments are in favor of the presence of the minor pseudopilin complex at the tip of the pseudopilus: 1) the requirement of XcpV$_I$ to initiate pseudopilus formation (18); 2) the interaction between XcpW$_J$ and the secretin (20); and 3) the recent publication of the structure of a ternary complex formed by the three pseudopilins GspI$_V$-J$_W$-K$_X$, which has been proposed to be at the tip of the pilus because no pseudopilin could be added upward (17).

In our study, it is important to recall that we used the soluble domains of the pseudopilins to investigate the interaction network. Under those conditions all of the interactions involving the hydrophobic domain are lost, and likely all interactions involving the formation of the core pseudopilus will not be identified by our approach. The observation that the soluble domain of the major pseudopilin of the pseudopilus core, XcpT$_G$, does not interact with any of the other pseudopilins including itself confirmed this assessment.

However, we could show that XcpV$_I$, W$_J$, and X$_K$ do interact and form a ternary complex as previously reported (17). It is worth noting that our BIAcore and co-purification data clearly showed that XcpW$_J$ and XcpX$_K$ do not interact directly but are bridged by XcpV$_I$, on which they bind at distinct sites. This observation further puts forward XcpV$_I$ as a nucleator in the formation of the pseudopilin complex and the subsequent formation of the pseudopilus. This central initiating role of XcpV$_I$ is also in agreement with previous findings indicating that XcpV$_I$ is the only pseudopilin required for the formation of the XcpT$_G$ HPP (9, 18).

An additional new feature that we revealed with our work is that the tip complex might be formed by the four minor pseu-

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on December 6, 2009

Supplemental Material can be found at:
http://www.jbc.org/content/suppl/2009/10/14/M109.042366.DC1.html

dopilins. Indeed we clearly demonstrated that $XcpU_H$ does interact directly with $XcpW_J$ and with $XcpW_J$ only. Significantly, this interaction seems to be more efficient when $XcpW_J$ is already bound onto the V_I-X_K complex. If this is the case, it means that $XcpU_H$ is the last minor pseudopilin to enter the complex and is thus likely to be located at its base.

If $XcpU_H$ is located at the base of the minor pseudopilins complex, it makes sense to suggest that $XcpU_H$ could form the hinge between the tip complex and the core pseudopilus formed by $XcpT_G$. Moreover, concerning the connection between the $XcpT_G$ core pseudopilus and the $XcpV_I$-W_J-X_K tip complex, several additional arguments are favoring a linker position for $XcpU_H$: 1) As indicated, Yanez et *al.* (14) solved the tridimensional structure of the $GspH_U$-soluble domain and suggest by docking experiments to place it at the tip of the $GspG_T$ pseudopilus with its specific conserved crevice facing away from the helix axis; whether $GspH_U$-specific crevice is involved or not in the interaction with $GspJ_W$ remains an open question. 2) Kuo *et al.* (19) have shown a direct interaction between full-length $GspH_U$ and $GspG_T$ pseudopilins.

It is worth noting that we were not able to show an interaction between soluble domains of $XcpU_H$ and $XcpT_G$, which suggests that if an interaction exists, as suggested above, it should be through the hydrophobic domain. Again this is very much in favor of the idea that once $XcpU_H$ integrates the minor pseudopilins complex, it will allow the further elongation of the pseudopilus core by integrating the $XcpT_G$ pseudopilin via its hydrophobic segment.

In the literature many more interactions have been found between pseudopilins (19, 21), and it would be extremely difficult to reconcile in a realistic model all of these observations, such as the formation of homo- or heterodimers between basically all of these pseudopilins. However, among all the interactions reported, it cannot be excluded that some involve rather unspecific contacts between the hydrophobic domains. *In vivo*, the hydrophobic interaction network may be regulated by the proximity of the soluble domains avoiding the addition of subsequent pseudopilins by steric hindrance. From this point of view, the characterization of the interaction network between soluble domains has revealed a relevant and specific network in which only some interactions are allowed, revealing thus the sequence of assembly necessary to obtain an appropriate configuration of the quaternary complex at the tip of the pseudopilus. Because we showed that the $XcpT_G$-soluble domain displays no interaction with other pseudopilin soluble domains, we propose that it may enter the structure through its hydrophobic domain. Once integrated, it will fit best with the addition of subsequent $XcpT_G$ pseudopilins, which will result in pseudopilus growth.

$XcpT_G$ may also access the minor pseudopilin complex through interaction with the hydrophobic domain of a pseudopilin other than $XcpU_H$. In that case the stability of the scaffold may not be optimal, and the pseudopilus growth might be aborted because of instability and collapse of the whole structure. It was for example suggested that direct interaction between $XcpX_K$ and $XcpT_G$ resulted in $XcpT_G$ instability (18). If this was the case, the formation of the tip complex could be a prerequisite for the assembly of a proper pseudopilus structure,

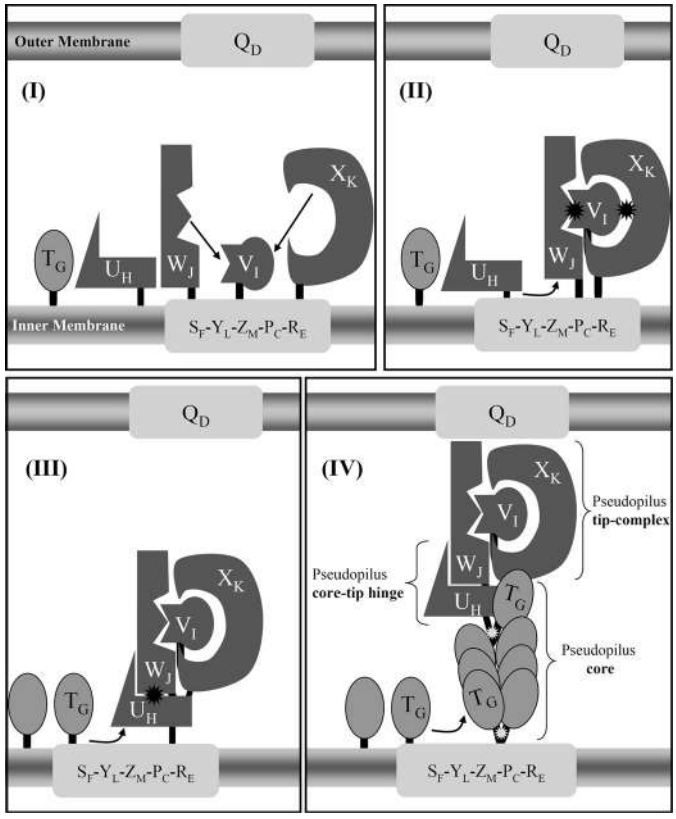


FIGURE 5. **Interaction network among Xcp pseudopilins and model for pseudopilus assembly.** A schematic representation of the Xcp T2SS of *P. aeruginosa* is proposed. The inner membrane plate form, composed of $XcpS_F$, -Y_L, -Z_M, -P_C, and -R_E and the outer membrane secretin $XcpQ_D$ are shown as *light gray rectangles*. The minor pseudopilins, $XcpU_H$, -V_I, -W_J, and -X_K are represented by differently shaped forms (*dark gray*) that illustrate the complementarity of their interaction interfaces. For instance, $XcpV_I$ can interact with both $XcpW_J$ and $XcpX_K$, with two different interaction sites. The *black asterisk* indicates that the interaction involves the periplasmic domains of the pseudopilins. The major pseudopilin $XcpT_G$ is shown as an oval shape (*medium gray*) that can interact with itself during pseudopilus assembly, as well as with $XcpU_H$. The *white asterisk* indicates that these interactions involve the transmembrane domains of the pseudopilins. We proposed the following ordered series of events leading to the assembly of the pseudopilus: *Panel I*, $XcpV_I$ enters first the inner membrane plateform and then recruits both $XcpW_J$ and $XcpX_K$ to form the pseudopilus tip complex. *Panel II*, $XcpU_H$ then enters the ternary complex $XcpV_I$-W_J-X_K via its interaction with $XcpW_J$. *Panel III*, the tip quaternary complex is then able to accommodate the major pseudopilin $XcpT_G$ via a "hydrophobic" interaction with $XcpU_H$. *Panel IV*, further polymerization of $XcpT_G$ pseudopilins triggers pseudopilus growth, with $XcpU_H$ fulfilling a core-tip hinge function between the pseudopilus core and tip.

which retains its functionality to propel protein secretion. This fine tuning in pseudopilus assembly may, however, be overruled when the stoichiometry is totally unbalanced by the massive overproduction of $XcpT_G$, which results in HPP assembly. However, it is worth noting that the HPP structure is then totally unable to support protein secretion appropriately.

In conclusion and as presented in Fig. 5, we propose that XcpV is the central component and initiator of pseudopilus formation. Although it does not directly interact with the $XcpT_G$ core component, it is central to the ordered assembly of a complex, which will be located at the tip of pseudopilus. The assembly of the complex is sequentially monitored by interactions between their soluble domains, which give high specificity and do not allow alternative sequence in the assembly process of a quaternary complex (heterotetramer). Once the complex is

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on December 6, 2009

Supplemental Material can be found at:
http://www.jbc.org/content/suppl/2009/10/14/M109.042366.DC1.html

formed, the last component that is integrated, $XcpU_H$, will allow its hydrophobic domain to interact with the $XcpT_G$ hydrophobic domain. Subsequent interaction could only result in pseudopilus growth through $XcpT_G$ multimerization. The elongation of the pseudopilus might be arrested by contact of the tip complex with the secretin. At this level, the extrusion of the pseudopilus is prevented by the bulky domain of $XcpX_K$, which does not fit the interior of the secretin channel. This arrest may in turn induce retraction of the pseudopilus. If exoproteins are found to locate between the tip complex and the secretin, events of elongation/retraction should result in shots of exoprotein release through the secretin channel, according to the T2SS piston model earlier proposed (25).

Future work is necessary to explore the validity of the pseudopilus model. Protein-protein interaction studies and structural resolution of the different components have provided crucial data in developing further our understanding of this fascinating system. Now that the question on elongation seems to lead to a consensus agreement, the questions around the retraction aspects should be addressed further. In particular, we will address the suggested role of $XcpX_K$ in that process by evaluating the role of its soluble domain both in protein secretion and HPP formation.

Acknowledgments—We are grateful to Hervé Darbon for constant help and support, to Christophe Quetard for useful suggestions on BIAcore experiments, and to Renaud Vincentelli for help in cloning and expression of pseudopilin-soluble domains. We thank Sabrina Lignon and Régine Lebrun from the Plate-forme Protéomique de l'Institut de Microbiologie de la Méditerranée, Marseille Protéomique, CNRS (Marseille, France) for matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry analyses.

REFERENCES

1. Pugsley, A. P. (1993) *Microbiol. Rev.* **57,** 50–108
2. Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M. L., Lazdunski, A., Wu, L. F., and Filloux, A. (2001) *EMBO. J.* **20,** 6735–6741
3. Filloux, A. (2004) *Biochim. Biophys. Acta*. **1694,** 163–179
4. Pelicic, V. (2008) *Mol. Microbiol.* **68,** 827–837
5. Craig, L., and Li, J. (2008) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18,** 267–277
6. Bally, M., Filloux, A., Akrim, M., Ball, G., Lazdunski, A., and Tommassen, J. (1992) *Mol. Microbiol.* **6,** 1121–1131
7. Bleves, S., Voulhoux, R., Michel, G., Lazdunski, A., Tommassen, J., and Filloux, A. (1998) *Mol. Microbiol.* **27,** 31–40
8. Nunn, D. N., and Lory, S. (1993) *J. Bacteriol.* **175,** 4375–4382
9. Vignon, G., Köhler, R., Larquet, E., Giroux, S., Prévost, M. C., Roux, P., and Pugsley, A. P. (2003) *J. Bacteriol.* **185,** 3416–3428
10. Durand, E., Bernadac, A., Ball, G., Lazdunski, A., Sturgis, J. N., and Filloux, A. (2003) *J. Bacteriol.* **185,** 2749–2758
11. Hu, N. T., Leu, W. M., Lee, M. S., Chen, A., Chen, S. C., Song, Y. L., and Chen, L. Y. (2002) *Biochem. J.* **365,** 205–211
12. Köhler, R., Schäfer, K., Müller, S., Vignon, G., Diederichs, K., Philippsen, A., Ringler, P., Pugsley, A. P., Engel, A., and Welte, W. (2004) *Mol. Microbiol.* **54,** 647–664
13. Hansen, J. K., and Forest, K. T. (2006) *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **11,** 192–207
14. Yanez, M. E., Korotkov, K. V., Abendroth, J., and Hol, W. G. (2008) *J. Mol. Biol.* **377,** 91–103
15. Yanez, M. E., Korotkov, K. V., Abendroth, J., and Hol, W. G. (2008) *J. Mol. Biol.* **375,** 471–486
16. Lam, A. Y., Pardon, E., Korotkov, K. V., Hol, W. G., and Steyaert, J. (2009) *J. Struct. Biol.* **166,** 8–15
17. Korotkov, K. V., and Hol, W. G. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15,** 462–468
18. Durand, E., Michel, G., Voulhoux, R., Kürner, J., Bernadac, A., and Filloux, A. (2005) *J. Biol. Chem.* **280,** 31378–31389
19. Kuo, W. W., Kuo, H. W., Cheng, C. C., Lai, H. L., and Chen, L. Y. (2005) *J. Biomed. Sci.* **12,** 587–599
20. Douet, V., Loiseau, L., Barras, F., and Py, B. (2004) *Res. Microbiol.* **155,** 71–75
21. Lu, H. M., Motley, S. T., and Lory, S. (1997) *Mol. Microbiol.* **25,** 247–259
22. Bogomolovas, J., Simon, B., Sattler, M., and Stier, G. (2009) *Protein Expr. Purif.* **64,** 16–23
23. Veesler, D., Blangy, S., Siponen, M., Vincentelli, R., Cambillau, C., and Sciara, G. (2009) *Anal. Biochem.* **388,** 115–121
24. Abramoff, M. D., Magelhaes, P. J., and Ram, S. J. (2004) *Biophotonics Int.* **11,** 39–42
25. Filloux, A., Michel, G., and Bally, M. (1998) *FEMS. Microbiol. Rev.* **22,** 177–198

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on December 6, 2009

I. 2. Caractérisation structurale et fonctionnelle de la pseudopiline mineure $XcpW_J$ (article 2)

Dans le premier article, nous avons démontré l'existence d'un complexe formé par les quatre pseudopilines mineures. L'information structurale apportée par la résolution de la structure du complexe formé par les homologues de $XcpV_I$-W_J-X_K : GspI-J-K d'*E. coli* ETEC confirme l'hypothèse de la localisation de notre complexe quaternaire au sommet du pseudopilus. Afin d'obtenir nos propres informations structurales sur les pseudopilines du SST2 Xcp de *P. aeruginosa*, nous avons entrepris en collaboration avec le Professeur Katrina FOREST de l'Université de Wisconsin-Madison, la détermination par cristallographie aux rayons X de la structure du complexe quaternaire ainsi que celles des deux pseudopilines mineures $XcpW_J$ et $XcpX_K$.

La structure de $XcpW_J$ a été résolue par cristallographie aux rayons X à 1,85Å (code pdb 3NJE) (article 2). Cette structure montre un repliement classique des pilines et des pseudopilines avec une hélice α N-terminale, un domaine variable composé de 5 brins β antiparallèles (β3, β4, β5, β6 et β7) et d'une courte hélice α et enfin d'un domaine C-terminal composé d'un feuillet β à 4 brins antiparallèles (β9, β10, β11, β12) (figure 41).

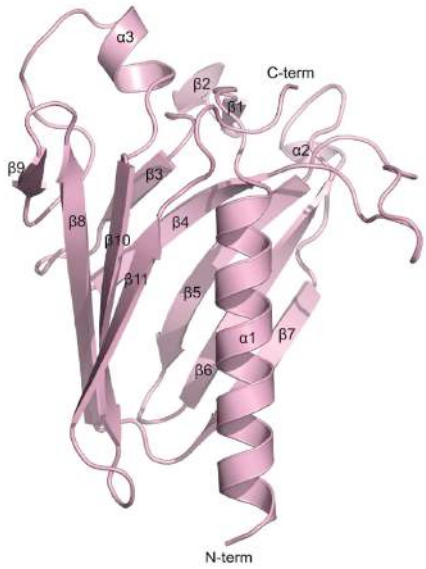


Figure 41 : Structure de la pseudopiline mineure $XcpW_J$ de *P. aeruginosa* (code pdb 3NJE).

La comparaison de la structure de $XcpW_J$ avec celle de son homologue chez *E. coli* ETEC GspJ, montre que les deux structures sont similaires avec un RMSD de 1,2Å. Cependant, une

différence majeure entre $XcpW_J$ et GspJ réside au niveau de leurs domaines variables. Le domaine variable de $XcpW_J$ se caractérise, en plus de GspI, par l'existence de deux courtes hélices α nommées respectivement α2 et α3 qui forment des simples boucles chez GspI.

L'extrémité C-terminale de $XcpW_J$ présente également une extension supplémentaire de 31 résidus riche en proline/glycine par rapport à celle de GspI. Cette extrémité n'apparaît pas dans la structure de $XcpW_J$ due à son caractère désordonné. La superposition de la structure de $XcpW_J$ avec celle de GspI dans le complexe GspI-J-K montre que cette extension C-terminale serait localisée dans la zone de contact entre GspJ et GspK (figure 42). Afin de tester le rôle de cette extension C-terminale dans le processus de sécrétion, nous avons construit deux mutants de $XcpW_J$ délétés des 37 ou 31 résidus C-terminaux appelés $XcpW_J\Delta195$ et $XcpW_J\Delta201$. Ces deux variants ont été produits dans une souche de *P. aeruginosa* délétée du gène *xcpW*$_J$ sauvage. Nous avons alors montré, grâce à un test d'activité, que la délétion de cette extrémité C-terminale n'a aucun effet sur la sécrétion.

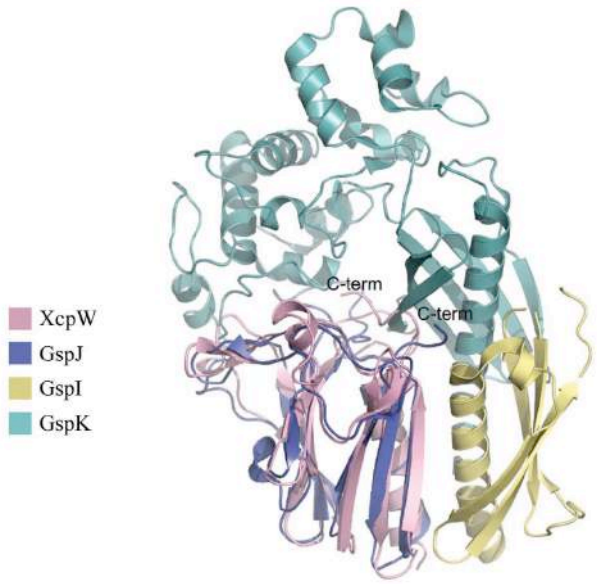


Figure 42 : Superposition de la structure de $XcpW_J$ (violet claire) avec celle de GspJ dans le complexe formé par GspI-J-K (code pdb 3CI0).

Article II

Structure of the minor pseudopilin XcpW from the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion system.

Franz Laura P., Douzi Badreddine, Durand Eric, Dyer David H., Voulhoux Romé *, and Forest Katrina T*.

***Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*.** 2011. 67(Pt 2):124-30.

electronic reprint

Acta Crystallographica Section D
Biological Crystallography
ISSN 0907-4449
Editors: **E. N. Baker and Z. Dauter**

Structure of the minor pseudopilin XcpW from the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion system

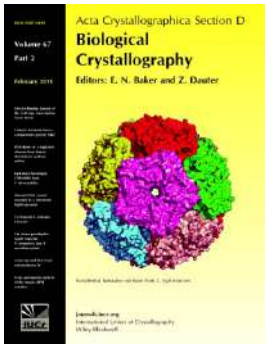
Laura P. Franz, Badreddine Douzi, Eric Durand, David H. Dyer, Romé Voulhoux and Katrina T. Forest

Acta Cryst. (2011). D**67**, 124–130

Copyright © International Union of Crystallography

Author(s) of this paper may load this reprint on their own web site or institutional repository provided that this cover page is retained. Republication of this article or its storage in electronic databases other than as specified above is not permitted without prior permission in writing from the IUCr.

For further information see http://journals.iucr.org/services/authorrights.html



Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography welcomes the submission of papers covering any aspect of structural biology, with a particular emphasis on the structures of biological macromolecules and the methods used to determine them. Reports on new protein structures are particularly encouraged, as are structure–function papers that could include crystallographic binding studies, or structural analysis of mutants or other modified forms of a known protein structure. The key criterion is that such papers should present new insights into biology, chemistry or structure. Papers on crystallographic methods should be oriented towards biological crystallography, and may include new approaches to any aspect of structure determination or analysis.

Crystallography Journals Online is available from **journals.iucr.org**

Acta Crystallographica Section D
Biological Crystallography
ISSN 0907-4449

Structure of the minor pseudopilin XcpW from the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion system

Laura P. Franz,[a] Badreddine Douzi,[b,c] Eric Durand,[d] David H. Dyer,[a] Romé Voulhoux[d]* and Katrina T. Forest[a]*

[a]Department of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI 53706, USA, [b]Architecture et Fonction des Macromolecules Biologiques (AFMB–UMR6098), CNRS and Universités d'Aix-Marseille I and II, 13288 Marseille CEDEX 9, France, [c]Laboratoire des Maladies Transmissibles et Substances Biologiquement Actives (LR99ES27), Faculté de Pharmacie, TU-5000 Monastir, Tunisia, and [d]Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires (LISM–UPR 9027), CNRS, Université de la Méditerranée, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, 13402 Marseille CEDEX 20, France

Correspondence e-mail: voulhoux@ifr88.cnrs-mrs.fr, forest@bact.wisc.edu

Received 6 September 2010
Accepted 11 December 2010

PDB Reference: XcpW, 3nje.

Pseudomonas aeruginosa utilizes the type II secretion machinery to transport virulence factors through the outer membrane into the extracellular space. Five proteins in the type II secretion system share sequence homology with pilin subunits of type IV pili and are called the pseudopilins. The major pseudopilin $XcpT_G$ assembles into an intraperiplasmic pilus and is thought to act in a piston-like manner to push substrates through an outer membrane secretin. The other four minor pseudopilins, $XcpU_H$, $XcpV_I$, $XcpW_J$ and $XcpX_K$, play less well defined roles in pseudopilus formation. It was recently discovered that these four minor pseudopilins form a quaternary complex that is presumed to initiate the formation of the pseudopilus and to localize to its tip. Here, the structure of $XcpW_J$ was refined to 1.85 Å resolution. The structure revealed the type IVa pilin fold with an embellished variable antiparallel β-sheet as also found in the $XcpW_J$ homologue enterotoxigenic *Escherichia coli* $GspJ_W$ and the $XcpU_H$ homologue *Vibrio cholerae* $EpsU_H$. It is proposed that the exposed surface of this sheet may cradle the long N-terminal α1 helix of another pseudopilin. The final 31 amino acids of the $XcpW_J$ structure are instrinsically disordered. Deletion of this unstructured region of $XcpW_J$ did not prevent type II secretion *in vivo*.

1. Introduction

Many Gram-negative bacteria utilize the type II secretion system (T2SS) to secrete virulence factors. *Pseudomonas aeruginosa* uses its T2SS to secrete exotoxin A, phospholipase C, elastase, alkaline phosphatase and other substrates (Filloux, 2004). These exoproteins are translocated across the inner membrane *via* the Sec or twin-arginine translocation pathway followed by export across the outer membrane into the extracellular milieu *via* the T2SS (Pugsley, 1993; Voulhoux *et al.*, 2001).

P. aeruginosa uses 12 gene products, $XcpA_O$ and $XcpP_C$–Z_M, to form the T2SS machinery commonly termed the secreton (Tommassen *et al.*, 1992). Five *xcp* gene products in *P. aeruginosa* contain short N-terminal leader peptides with sequence homology to subunits of type IV pili and are therefore referred to as pseudopilins (Peabody *et al.*, 2003). These are $XcpT_G$, $XcpU_H$, $XcpV_I$, $XcpW_J$ and $XcpX_K$ (where the subscripts reference the T2SS protein names in the non-*Pseudomonas* T2SS; for example, in $XcpW_J$ the J refers to GspJ). This leader sequence on type IV pilins and T2S pseudopilins is removed by the prepilin peptidase $XcpA_O$, which cleaves between a conserved glycine at position −1 and a hydrophobic residue (often phenylalanine) at position +1.

© 2011 International Union of Crystallography
Printed in Singapore – all rights reserved

electronic reprint

$XcpA_O$ is known as PilD in the context of type IV pilus assembly (Nunn & Lory, 1993).

The major pseudopilin $XcpT_G$ is hypothesized to form an intraperiplasmic pilus, which acts as a piston to push substrates through the secretin $XcpQ_D$, the outer membrane pore (Filloux *et al.*, 1998). The energy for this process is generated by an inner membrane platform composed of $XcpR_E$, $XcpS_F$, $XcpY_L$ and $XcpZ_M$ (Filloux, 2004). The four low-abundance or minor pseudopilins $XcpU_H$, $XcpV_I$, $XcpW_J$ and $XcpX_K$ are believed to have accessory roles in T2S pseudopilus formation (Filloux *et al.*, 1998).

All five pseudopilins are essential for secretion, although the precise roles of the minor pseudopilins are still being investigated. The overproduction of $XcpT_G$ leads to a hyperpseudopilus that extends past the outer membrane. In contrast to the requirement for all four minor pseudopilins for T2S, only $XcpV_I$ is mandatory for the formation of the hyperpseudopilus (Durand *et al.*, 2005). The length of the hyperpseudopilus is controlled by the availability of $XcpX_K$ (Durand *et al.*, 2005). It has recently been shown in a systematic protein–protein interaction study that the four *P. aeruginosa* minor pseudopilins $XcpU_H$, $XcpW_J$, $XcpV_I$ and $XcpX_K$ are able to form a quaternary complex that is proposed to be at the tip of the $XcpT_G$-containing pseudopilus (Douzi *et al.*, 2009). Three of the four enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) T2SS homologues were also found to form a complex consisting of the minor pseudopilins $GspI_V$, $GspJ_W$ and $GspK_X$ (Korotkov & Hol, 2008). $GspK_X$ occupies the pinnacle position and is the largest; thus, the length-control function of $XcpX_K$ is possibly a consequence of its hindrance of the growth of the pseudopilus through the limiting opening in the outer membrane secretin (Korotkov & Hol, 2008).

In the present study, we analyzed one of the least well understood of the pseudopilins, $XcpW_J$. We expressed, purified and crystallized $XcpW_J$ and refined its structure to 1.85 Å resolution. The structure highlighted a region of intrinsic disorder that we interrogated by mutational analysis and provided a general testable model for the structural interaction of the T2SS minor pseudopilins with one another and with the major pseudopilin $XcpT_G$.

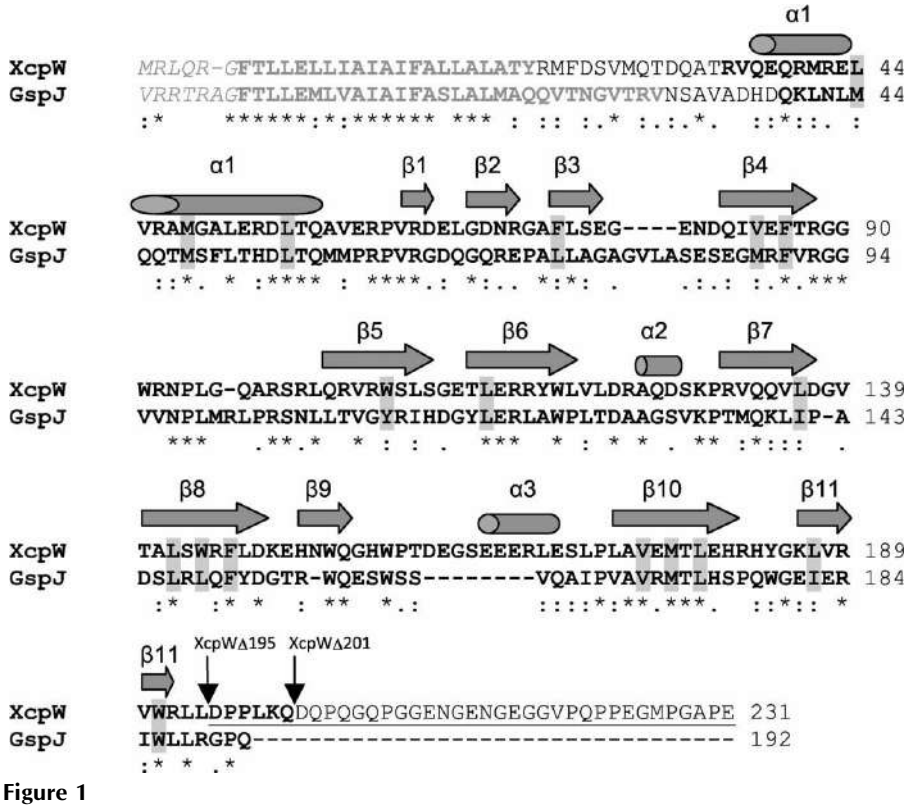


Figure 1
Sequence of *P. aeruginosa* $XcpW_J$. The primary sequence of $XcpW_J$ includes leader-peptide (grey italics) and transmembrane-helix residues that were removed for soluble expression (grey bold), unobserved residues (regular text), amino acids creating the conserved and symmetric hydrophobic core (grey shading), α-helices and β-strands in the $XcpW_J$ structure (cylinders and arrows, respectively) and the starting points for C-terminal deletions (black arrows and underlining). Following convention, numbering begins at the first residue of the mature protein (Phe +1); thus, the highly conserved glycine preceding the cleavage position is Gly −1. The sequence of $GspJ_W$ is 36% identical to that of $XcpW_J$ (asterisks and colons indicate identical and similar residues, respectively).

2. Materials and methods

2.1. Overexpression and purification of *P. aeruginosa* $XcpW_J$

The *xcpW*$_J$ plasmid, pETG-20A-W_J, was constructed by cloning the coding region for the soluble periplasmic domain of $XcpW_J$ (residues 22–231, lacking the N-terminal transmembrane helix; Fig. 1) into the Gateway (Invitrogen) pETG-20A vector as described previously (Douzi *et al.*, 2009). The expressed gene product includes an N-terminal thioredoxin followed by a six-residue histidine tag, nine amino acids encoded by the *att*B1 site, a second histidine tag, a tobacco etch virus (TEV) protease cleavage site and the soluble domain of $XcpW_J$ beginning with Arg22.

For each protein preparation, a fresh transformant of pETG-20A-W_J in *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) pLysS (Promega) was inoculated into 100 ml Luria–Bertani (LB) medium containing 100 mg l^{-1} ampicillin and 34 mg l^{-1} chloramphenicol ($LB^{amp,chl}$). 25 ml aliquots of cultures grown overnight with shaking at 310 K were diluted into 1 l $LB^{amp,chl}$ and shaken at 310 K until the OD_{600} reached 0.4, at which point the temperature was lowered to 291 K. When the OD_{600} reached 0.6, *xcpW* expression was induced with 1 m*M* IPTG and growth continued overnight at 291 K. Cells were harvested by centrifugation at 9000*g* for 20 min at 279 K. The cell pellet was plunged into liquid nitrogen and stored at 193 K. 7 g thawed cell pellet was homogenized in 35 ml 50 m*M* imida-

electronic reprint

zole, 1× phosphate-buffered saline (PBS) and 250 U Benzonase Nuclease (Novagen). Cells were broken by two passes through a French press at 6.9 MPa and clarified by centrifugation at 58 500*g* for 30 min at 283 K. The supernatant was loaded onto a HisTrap FF 5 ml nickel-affinity resin column (Amersham Biosciences) equilibrated with 50 m*M* imidazole in PBS on an ÄKTAprime FPLC system. Following a wash with 30 column volumes, elution occurred during a gradient from 50 to 500 m*M* imidazole in PBS.

TEV protease was added to the purified fusion protein (32 µg ml^{-1} final concentration). During overnight cleavage, the protein was dialyzed into 50 m*M* HEPES pH 7.5 plus 3 m*M* β-mercaptoethanol (BME) at 277 K. The cleaved XcpW$_J$ was then loaded onto a nickel column equilibrated in 50 m*M* HEPES pH 7.5, which bound the (histidine-tagged) TEV protease and uncut protein. Flowthrough fractions that contained cleaved XcpW$_J$ based on SDS–PAGE analysis were concentrated using a 3000 molecular-weight cutoff concentrator (Millipore) and loaded onto a Superdex 75 (Amersham Biosciences) sizing column for further purification. Purified XcpW$_J$ was dialyzed overnight in 25 m*M* Tris pH 7.4. All protein samples were assessed for heterogeneity using dynamic light scattering. The polydispersity was generally around 25%.

2.2. Crystallization conditions

Initial XcpW$_J$ crystals were obtained using a sparse-matrix screen (JCSG, Qiagen). The crystals were grown at room temperature by vapour diffusion using the hanging-drop method (McPherson, 1982). The drops consisted of 1.5 µl protein solution at 17 mg ml^{-1} and 1.5 µl reservoir solution. For optimized crystals, the reservoir solution was 0.1 *M* HEPES pH 7.5, 15 m*M* KCl, 7.5% PEG 8000 and 0.1 *M* ATP (from 1 *M* stock dissolved in 25 m*M* Tris pH 8.0). The crystals grown with the ATP additive were approximately 0.2 mm in size and tear-drop-shaped. The crystals were cryopreserved in mother liquor containing 30% ethylene glycol.

Crystals were harvested for mass-spectrometric analysis in several steps. Firstly, a drop containing needle-like XcpW$_J$ crystals was transferred to a fresh glass cover slip. Mother liquor was slowly wicked from the crystals using absorbant paper. The crystals were resuspended in equilibrated mother liquor from the reservoir and this was also wicked away. The crystals were subsequently washed twice in 25 m*M* Tris–HCl pH 8.0 and then transferred into 25 µl filtered ddH_2O. This sample was analyzed for proteolysis of XcpW$_J$ by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.

2.3. Data collection, processing and refinement

A 1.85 Å resolution native data set was collected on beamline 21-ID-G at the Argonne National Laboratory's Advanced Photon Source (APS) using a MAR 300 CCD detector. The crystals belonged to space group $P2_1$, with two monomers in the asymmetric unit. The diffraction data were integrated, scaled and merged using *HKL*-2000 (Otwinowski & Minor, 1997). The structure was solved by molecular replacement with *Phaser* (McCoy *et al.*, 2007) using GspJ$_W$ (PDB entry 3ci0, chain *J*; Korotkov & Hol, 2008) as a model. The XcpW$_J$ structure was built using *Auto-Rickshaw* (Panjikar *et al.*, 2005) with manual fitting in *Coot* (Emsley & Cowtan, 2004). The large loop region connecting β4 and β5 of XcpW$_J$ could be traced in chain *B* (and was confirmed through the use of omit maps), but could not be fitted in chain *A* owing to poor electron density. The final structure was refined to 1.85 Å resolution using *REFMAC* v.5.5.0072. Translation, libration and screw-rotation displacement (TLS) groups that were defined by the *TLSMD* server (Painter & Merritt, 2006) were also used in the refinement process. The final overall R_{work} and R_{free} were 19.6% and 23.0%, respectively, and the XcpW$_J$ structure has 94.2% of residues in favoured regions of the Ramachandran plot, with no outliers (Table 1).

Structure factors and coordinates have been deposited in the Protein Data Bank with code 3nje.

Table 1
Crystallographic data collection and refinement of XcpW$_J$.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Data collection	
Beamline	APS 21-ID-G
Wavelength (Å)	0.97856
Space group	$P2_1$
Unit-cell parameters (Å, °)	a = 39.7, b = 82.9, c = 57.8, $\alpha = \gamma$ = 90.0, β = 105.4
Resolution (Å)	25.0–1.85 (1.88–1.85)
Unique reflections	30798
Multiplicity	5.2 (5.1)
R_{merge}†	0.054 (0.394)
Completeness (%)	99.8 (99.9)
Average $I/\sigma(I)$	35.6 (3.6)
Refinement	
Molecules per asymmetric unit	2
No. of protein atoms	2871
No. of solvent atoms	193
R_{work}/R_{free}	0.196/0.230 (0.224/0.254)
Wilson B (Å^2)	22.8
Average B overall (Å^2)	19.9
R.m.s.d.	
Bond lengths (Å)	0.010
Bond angles (°)	1.240
Solvent content (%)	45.7
E.s.u.‡ (Å)	0.086
Ramachandran values	
Preferred regions (%)	94.2
Allowed regions (%)	5.8

† $R_{merge} = \sum_{hkl}\sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl)\rangle| / \sum_{hkl}\sum_i I_i(hkl)$. ‡ Standard uncertainty of positional parameters based on maximum likelihood.

2.4. Construction of *xcp*W$_J$ mutants

The *xcpW*$_J$ alleles encoding wild-type XcpW$_J$ (XcpW$_J$wt), XcpW$_J$Δ195 and XcpW$_J$Δ201 (Fig. 1) were generated by PCR using the following oligonucleotides: XcpW$_J$up (5′-ATAGGATCCGCGCCGCGGCGCGCCTCGTCGGTTTCCTCG-3′) and XcpW$_J$down (5′-ATAAAGCTTCGACGCCGTTCTGCCCGCGCCTCATTCCGG-3′) for XcpW$_J$wt, XcpW$_J$up and XcpW$_J$Δ195down (5′-ATAAAGCTTTCAGAGCAGACGCCAGACGCGCACCAGCTTG-3′) for XcpW$_J$Δ195 and XcpW$_J$up and XcpW$_J$Δ201down (5′-ATAAAGCTTTCACTGCTTGAGCGGCGGATCGAGCAGACGC-3′) for

electronic reprint

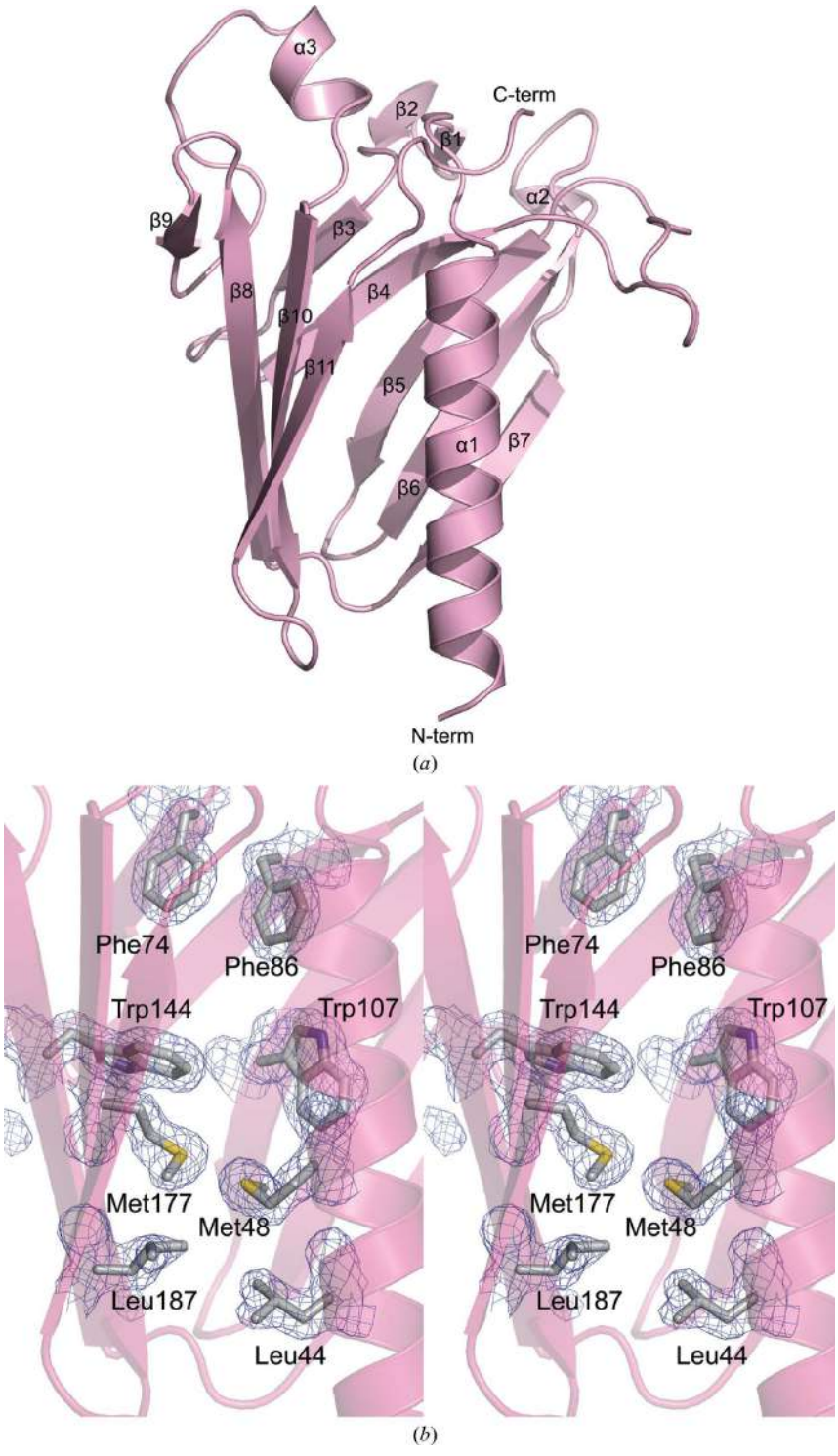


Figure 2
Structural features of XcpW$_J$. (*a*) XcpW$_J$ (ribbon representation with α-helices and β-strands indicated to highlight topology) displays the type IVa pilin fold consisting of a conserved N-terminal α1 packed against the C-terminal antiparallel β-sheet (β9–β8–β10–β11). α1 is flanked on the opposite side by a second antiparallel β-sheet (β3–β4–β5–β6–β7). (*b*) Eight of the 17 residues making up the hydrophobic core are shown in stereoview. Phe74 and Phe86 are two of the three phenylalanine side chains that form the canopy of the hydrophobic core. Trp144 and Trp107 are two of the three residues that create the tryptophan ring in the protein core. Met177, Met48, Leu187 and Leu44 portray the duplication that is seen throughout the hydrophobic core of XcpW$_J$ and GspJ$_W$.

XcpW$_J$Δ201. The resulting DNA fragments were cloned into the pCR2.1 vector (Invitrogen) and sequenced. These fragments were further digested with *Xba*I–*Sac*I restriction enzymes and subcloned into the arabinose-inducible host-range vector pJN105 (Newman & Fuqua, 1999), leading to plasmids pXcpW$_J$, pXcpW$_J$Δ195 and pXcpW$_J$Δ201. Recombinant plasmids were introduced into the wild-type *P. aeruginosa* strain PA01 or its Δ*xcp*W$_J$ derivative using the conjugative properties of pRK2013 (Figurski & Helinski, 1979). Transconjugants were selected on *Pseudomonas* isolation agar (Difco) supplemented with 50 µg ml^{-1} gentamicin (Gm^{50}).

2.5. Analysis of *xcp*W$_J$ mutants

Stable accumulation of the truncated forms of XcpW$_J$ was tested in *P. aeruginosa*. Bacteria were grown at 303 K in TSB liquid medium (Difco) overnight with the addition of 2% L-arabinose (Ara). After overnight growth, the cells were collected and resuspended in SDS–PAGE sample buffer. Protein samples were analyzed as described in Voulhoux *et al.* (2001) on a 15% SDS–polyacrylamide gel (Bio-Rad III) followed by Western blotting using anti-XcpW$_J$ primary antibody (1:5000; Douzi *et al.*, 2009).

Secreted protein profiles were analyzed from *P. aeruginosa* strains grown as described above. Cells and extracellular medium were separated by centrifugation; proteins contained in the supernatants were precipitated by adding trichloroacetic acid [15%(*w*/*v*) final concentration] and incubating for 2 h at 277 K. Samples were subsequently centrifuged (30 min at 15 000*g*), the pellets were washed with 90%(*v*/*v*) acetone, resuspended in SDS–PAGE sample buffer and analyzed as described in Voulhoux *et al.* (2001) on a 12% SDS-polyacrylamide gel stained with Coomassie Blue.

For functional secretion assays, *P. aeruginosa* strains were grown overnight in liquid medium at 310 K. Culture samples were plated on (Gm^{50}, 2% Ara) plates. Protease secretion was tested on TSA (Difco) plates containing 1.5% dried milk, with the zone of clearing indicating the secretion of active protease. For the detection of lipase secretion, lipid agar plates were used. Lipid agar is a minimal medium containing olive oil as the sole carbon source (Kagami *et al.*, 1998).

electronic reprint

3. Results and discussion

3.1. The structure of XcpW$_J$

We have solved and refined the crystal structure of a soluble construct of XcpW$_J$ (Fig. 1), one of the minor pseudopilins in the *P. aeruginosa* T2SS. The electron density for the XcpW$_J$ structure was clearly defined from Arg35 through Trp91 in chain *A* and from Gln37 through Leu102 in chain *B*. Residues Gln103–Gln200 had well defined electron density for both monomers in the asymmetric unit. The remaining 31 residues at the C-terminus of XcpW$_J$ could not be modelled and therefore are not included in the final coordinates. Mass spectrometry of washed crystals indicated that 30 of these C-terminal amino acids (along with eight N-terminal amino acids) had been cleaved during crystallization (data not shown). This sequence contains 50% proline or glycine residues (Fig. 1), which are likely to be the cause of intrinsic disorder in this region and may have contributed to the proteolytic susceptibility (Radivojac *et al.*, 2004).

The XcpW$_J$ structure revealed the typical type IVa pilin fold distinguished by a long N-terminal α-helix that packs against an antiparallel β-sheet (β9–β8–β10–β11; Fig. 2*a*). β9 makes only four nonstandard main-chain hydrogen bonds with β8 main-chain atoms, while β8–β10–β11 form the more canonical conserved sheet. XcpW$_J$ contains a complex domain inserted between these two conserved structural elements consisting of a five-stranded antiparallel β-sheet (β3–β4–β5–β6–β7). Several long excursions between the strands give XcpW$_J$ its distinctive surface shape. Such an insertion in the structurally variable position between α1 and the conserved β-sheet (given the moniker '$\alpha\beta$ loop' in type IVa pilins; Craig *et al.*, 2003) is also seen in the ETEC GspJ$_W$, *V. vulnificus* EpsJ and *V. cholerae* EpsH$_U$ minor pseudopilin structures (Korotkov & Hol, 2008; Yanez *et al.*, 2008*a*,*b*), although the sheet topology differs between J$_W$ and H$_U$ pseudopilins. This region has been called the 'variable sheet' to distinguish it from the 'conserved sheet' seen in every type IV pilin and pseudopilin structure solved to date.

An intriguing feature of the XcpW$_J$ structure is an internally symmetric hydrophobic core (Fig. 2*b*). The residues that make up this symmetry are Leu44 on the N-terminal α-helix and Leu187 on β11, Leu55 on the N-terminal α-helix and Leu179 on β10, Leu114 on β6 and Leu142 on β8, Met48 on the N-terminal α-helix and Met177 on β10, and Val84 on β4 and Val175 on β10. There are also three phenylalanine residues that form a canopy over the hydrophobic core. These are Phe74 on β3, Phe86 on β4 and Phe146 on β8. Along with these hydrophobic residues there are three tryptophan residues in a ring within the core: Trp107 on β5, Trp144 on β8 and Trp191 on β11. These internally symmetric hydrophobic residues are conserved in ETEC GspJ$_W$ (Fig. 1). It has been shown recently that many, if not all, major T2SS pseudopilins rely on calcium for stability, unlike type IVa pilin subunits, which contain disulfide bridges (Korotkov *et al.*, 2009). The well packed interior and lack of metal ions in the XcpW$_J$ and GspJ$_W$ structures lead us to believe these pseudopilins rely completely on their hydrophobic cores for stability.

3.2. Features of the variable sheet

The variable sheet of XcpW$_J$ is framed by small structural elements that create a polar gulley on the surface of the monomer (Fig. 3). 'Overhang 1' is formed by α2, 'overhang 2' is the β1–β2 hairpin, the 'back door' is the α3 helix between β9 and β10 and the 'floor' is the loop between β3 and β4. Three of these are structurally distinct between XcpW$_J$ and GspJ$_W$, which otherwise have very similar folds as evidenced by their r.m.s.d. of 1.2 Å over the 701 most structurally similar atoms (Fig. 3; DeLano, 2002). α2 of XcpW$_J$ is absent in GpsJ$_W$, α3 replaces a loop in GspJ$_W$ and the minimal 'floor' in XcpW$_J$ is a short helix in GspJ$_W$. Nine of the 11 negatively charged residues found in XcpW$_J$ but not GspJ$_W$ (Glu66, Asp69, Glu79, Asp81, Asp137, Asp160, Glu161, Glu165 and Glu169; Fig. 1) are located within the loops that surround the variable sheet. Altering these acidic residues to uncharged residues could define their importance in maintaining the Xcp quaternary complex stability or substrate recognition. In addition to these

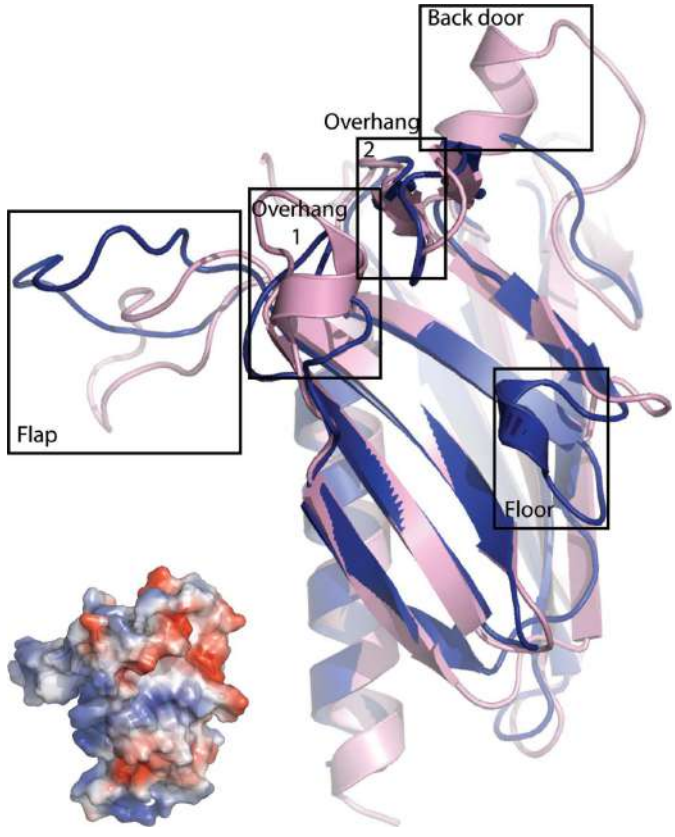


Figure 3
Elements of the variable sheet of XcpW$_J$ and ETEC GspJ$_W$. The strong structural similarity between XcpW$_J$ (pink) and GspJ$_W$ (blue) includes the pilin fold and variable β-sheet. Notable differences between XcpW$_J$ and GspJ$_W$ include α2 (overhang 1), the α3 helix between β9 and β10 in XcpW$_J$ (back door), the small α2 helix in GspJ$_W$ that is lacking between β3 and β4 of the XcpW$_J$ (floor) and the different orientation of the loop between XcpW$_J$ β4 and β5 (flap). The exposed surface of the variable sheet is polar, as seen in the electrostatic potential of XcpW$_J$ estimated within *PyMOL* (DeLano, 2002; insert on lower left in identical orientation to the cartoon, with red negative and blue positive regions ranging from −76 to +76 kT/e).

electronic reprint

structural distinctions around the variable sheet, the large flap between β4 and β5 of $XcpW_J$ is in a different conformation to that in the $GspJ_W$ structure (Fig. 3).

Why does $XcpW_J$ have a variable β-sheet? In every major (pseudo)pilin the conserved β-sheet cradles the long N-terminal α1 helix and the repetition of these two structural elements over tens to hundreds of subunits allows filament formation. We speculate that the variable second sheet in $XcpW_J$ may create a Janus-faced exterior surface for the similar packing of the exposed side of a second pseudopilin α1 helix. This helix could belong to another minor pseudopilin such as $XcpU_H$ or the major pseudopilin $XcpT_G$ itself. In this regard, it is interesting to note that the $XcpU_H$ and $XcpT_G$ major helices are amphipathic, with a charged face that could potentially complement the polar surface of $XcpW_J$ (Fig. 3, inset). By extension, we suggest the same role for the variable sheet predicted for $XcpU_H$ based on its homology to $EpsH_U$ (Yanez *et al.*, 2008*b*). Such packing would interrupt the continuity of the pseudopilus helix and provide a mechanism both for $XcpU_H$–$XcpW_J$ interaction (Douzi *et al.*, 2009) and for the transition from the complex of pseudopilins to the repetitive downward assembly of $XcpT_G$.

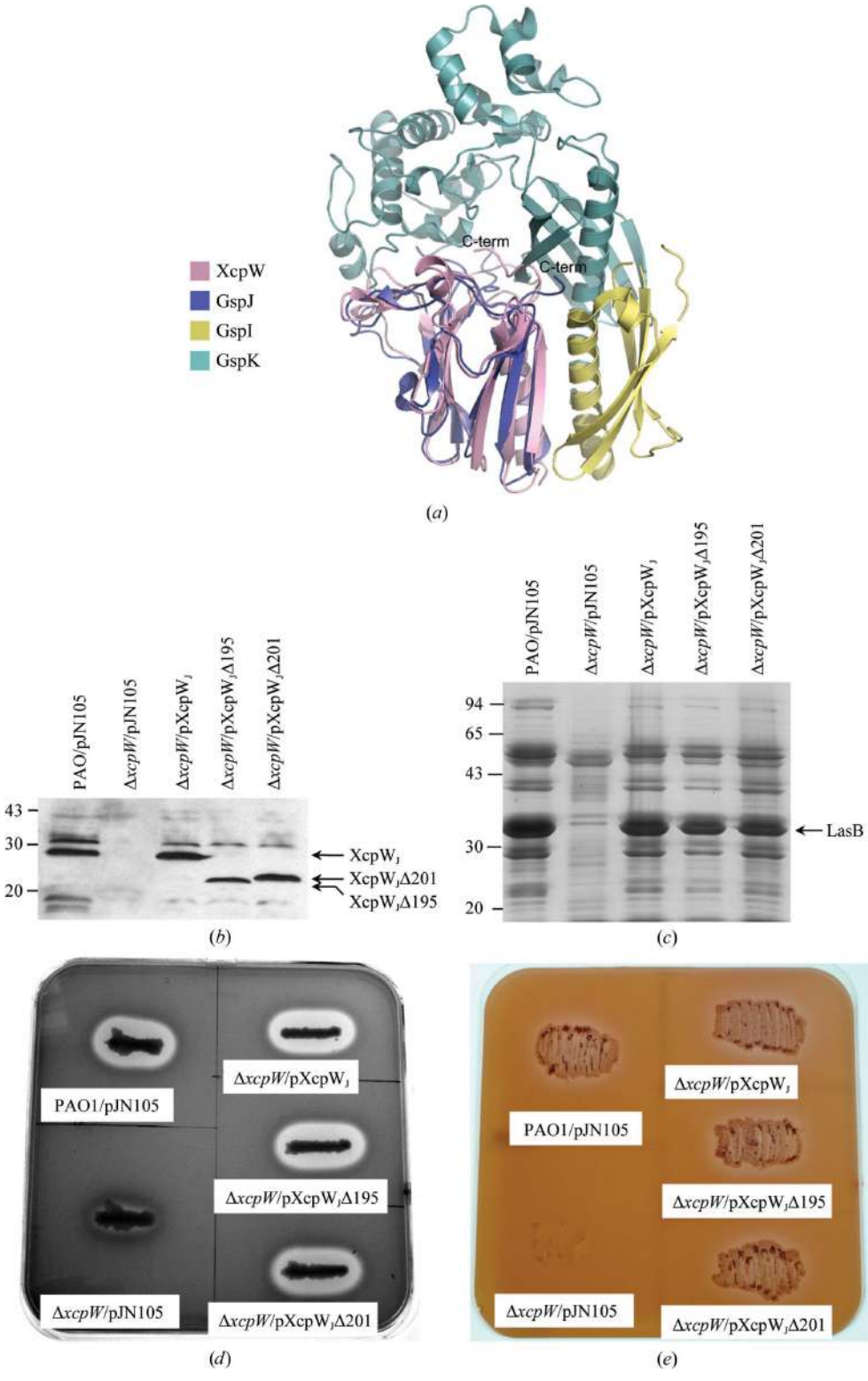


Figure 4
Analysis of the position and function of the C-terminal disordered region. (*a*) Structural alignment of $XcpW_J$ (pink) with the ETEC $GspI_V$ (yellow)–$GspJ_W$ (blue)–$GspK_X$ (cyan) complex suggests the disordered C-terminus of $XcpW_J$ could lie near or in the cleft between $GspJ_W$ and $GspK_X$. (*b*) $XcpW_J\Delta195$ and $XcpW_J\Delta201$ are produced in $\Delta xcpW_J$ when carried on a plasmid and expressed from the arabinose-inducible promoter, as seen in this Western blot using anti-$XcpW_J$ serum against whole cell lysates. (*c*) Complementation of the $\Delta xcpW_J$ mutant by either truncated $xcpW_J$ gene restored protein secretion to the extracellular medium. The major Xcp T2SS-dependent substrate elastase (LasB) is indicated in this Coomassie-stained SDS–polyacrylamide gel of culture supernatants. (*d*) Elastase and (*e*) lipase secretion on skim milk or lipid agar plates, respectively, is restored when the $\Delta xcpW_J$ mutant is complemented by one of the two truncated forms of $XcpW_J$. The halo around the colony on the skim milk plate corresponds to milk degradation owing to elastase activity (*c*). The lipid agar plate contains a minimal medium on which only T2S-proficient strains grow (*d*).

3.3. Functional interrogation of the C-terminal tail

The C-terminal end of $XcpW_J$ features a uniquely long extension among the $GspJ_W$ pseudopilins (Fig. 1). When $XcpW_J$ is

electronic reprint

structurally aligned with $GspJ_W$ in the $GspI_V$–$GspJ_W$–$GspK_X$ ternary complex (Korotkov & Hol, 2008) it appears that the C-terminal extension could lie within the groove between $GspK_X$ and $GspJ_W$ (Fig. 4*a*), suggesting that it might play a role in holding the minor pseudopilin complex together. Since it is difficult to predict the structural organization of this 31-amino-acid intrinsically disordered tail or any interaction that it may make with other minor pseudopilins or T2SS components, we created $XcpW_J$ variants missing 37 or 31 amino acids and tested their functionality *in vivo* (Figs. 4*b*–4*e*). Both truncated forms of $XcpW_J$, $XcpW_J\Delta195$ and $XcpW_J\Delta201$, were produced with their expected molecular weight (Fig. 4*b*). Both restored wild-type secretion profiles when used to complement an *xcp*W_J deletion strain (Fig. 4*c*). In addition, the extracellular activity of two T2SS-dependent substrates, elastase (Fig. 4*d*) and lipase (Fig. 4*e*), is restored with either truncated form of $XcpW_J$. Although we cannot rule out a subtle effect in recognition or chaperoning of a subset of the Xcp secretion substrates, these data uncover no obvious differences between full-length and C-terminally truncated $XcpW_J$. We conclude that the Pro/Gly-rich tail of $XcpW_J$ is not required for functional interaction with the rest of the Xcp secreton.

We can now also further interpret results from experiments on $XpsJ_W$, the $XcpW_J$ homolog from the *Xanthamonus campestris* T2SS. Kuo *et al.* (2005) found that the truncation of up to 14 amino acids from the C-terminus of $XpsJ_W$ had a less than twofold effect on the secretion of amylase from *X. campestris*, but removal of 17 or more amino acids impaired amylase secretion and proper cellular localization of $XpsJ_W$ (Kuo *et al.*, 2005). In light of our findings, it is notable that $XpsJ_W$ has an 11-amino-acid Pro/Gly-rich tail which seems to be dispensable in the amylase-secretion system, whereas the inactive truncations remove part of the last predicted β-strand in the conserved sheet.

Our physiological result that the Pro/Gly tail is not needed for T2S despite the juxtaposition of the tail of $XcpW_J$ with $XcpX_K$ in the structural model (Fig. 4*a*) is well correlated with the observation that the soluble construct of $XcpW_J$ interacts with soluble domains of $XcpU_H$ and $XcpV_I$ but not $XcpX_K$ (Douzi *et al.*, 2009). It may be that the *P. aeruginosa* $XcpW_J$–$XcpX_K$ interaction differs somewhat from that of the crystalline interaction of ETEC $GspJ_W$–$GspK_X$ (Fig. 3*a*; Korotkov *et al.*, 2009). Future mutational work should elucidate which regions of $XcpW_J$ are required for Xcp complex formation. Definitive identification of the disposition of each minor pseudopilin within the T2SS will await the structure determination of the $XcpU_H$–$XcpV_I$–$XcpW_J$–$XcpX_K$ quaternary complex.

This work was funded by the US National Institutes of Health (GM59721) and the French Agence Nationale de la Recherche (ANR-JC07-183230). Use of the Advanced Photon Source was supported by the US Department of Energy, Office of Science, Office of Basic Energy Sciences under Contract No. DE-AC02-06CH11357. Use of the LS-CAT Sector 21 was supported by the Michigan Economic Development Corporation and the Michigan Technology Tri-Corridor for the support of this research program (Grant 085P1000817).

References

Craig, L., Taylor, R. K., Pique, M. E., Adair, B. D., Arvai, A. S., Singh, M., Lloyd, S. J., Shin, D. S., Getzoff, E. D., Yeager, M., Forest, K. T. & Tainer, J. A. (2003). *Mol. Cell*, **11**, 1139–1150.
DeLano, W. L. (2002). *PyMOL.* http://www.pymol.org.
Douzi, B., Durand, E., Bernard, C., Alphonse, S., Cambillau, C., Filloux, A., Tegoni, M. & Voulhoux, R. (2009). *J. Biol. Chem.* **284**, 34580–34589.
Durand, E., Michel, G., Voulhoux, R., Kurner, J., Bernadac, A. & Filloux, A. (2005). *J. Biol. Chem.* **280**, 31378–31389.
Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). *Acta Cryst.* D**60**, 2126–2132.
Figurski, D. H. & Helinski, D. R. (1979). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **76**, 1648–1652.
Filloux, A. (2004). *Biochim. Biophys. Acta*, **1694**, 163–179.
Filloux, A., Michel, G. & Bally, M. (1998). *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 177–198.
Kagami, Y., Ratliff, M., Surber, M., Martinez, A. & Nunn, D. N. (1998). *Mol. Microbiol.* **27**, 221–233.
Korotkov, K. V., Gray, M. D., Kreger, A., Turley, S., Sandkvist, M. & Hol, W. G. (2009). *J. Biol. Chem.* **284**, 25466–25470.
Korotkov, K. V. & Hol, W. G. (2008). *Nature Struct. Mol. Biol.* **15**, 462–468.
Kuo, W.-W., Kuo, H.-W., Cheng, C.-C., Lai, H.-L. & Chen, L.-Y. (2005). *J. Biomed. Sci.* **12**, 587–599.
McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read, R. J. (2007). *J. Appl. Cryst.* **40**, 658–674.
McPherson, A. (1982). *The Preparation and Analysis of Protein Crystals.* New York: Wiley.
Newman, J. R. & Fuqua, C. (1999). *Gene*, **227**, 197–203.
Nunn, D. N. & Lory, S. (1993). *J. Bacteriol.* **175**, 4375–4382.
Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
Painter, J. & Merritt, E. A. (2006). *Acta Cryst.* D**62**, 439–450.
Panjikar, S., Parthasarathy, V., Lamzin, V. S., Weiss, M. S. & Tucker, P. A. (2005). *Acta Cryst.* D**61**, 449–457.
Peabody, C. R., Chung, Y. J., Yen, M.-R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A. P. & Saier, M. H. Jr (2003). *Microbiology*, **149**, 3051–3072.
Pugsley, A. P. (1993). *Microbiol. Rev.* **57**, 50–108.
Radivojac, P., Obradovic, Z., Smith, D. K., Zhu, G., Vucetic, S., Brown, C. J., Lawson, J. D. & Dunker, A. K. (2004). *Protein Sci.* **13**, 71–80.
Tommassen, J., Filloux, A., Bally, M., Murgier, M. & Lazdunski, A. (1992). *FEMS Microbiol. Rev.* **9**, 73–90.
Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M. L., Lazdunski, A., Wu, L.-F. & Filloux, A. (2001). *EMBO J.* **20**, 6735–6741.
Yanez, M. E., Korotkov, K. V., Abendroth, J. & Hol, W. G. (2008*a*). *J. Mol. Biol.* **375**, 471–486.
Yanez, M. E., Korotkov, K. V., Abendroth, J. & Hol, W. G. (2008*b*). *J. Mol. Biol.* **377**, 91–103.

electronic reprint

I. 3. Validation de l'association séquentielle des pseudopilines mineures par RMN

Il est important de noter que dans le premier article, nous avons montré que $XcpW_J$ interagit avec $XcpV_I$ et $XcpU_H$ et non avec $XcpX_K$. Ceci suggère que la formation du complexe quaternaire entre les pseudopilines mineures chez *P. aeruginosa* pourrait être différente de celle observée chez *E. coli* ETEC.

Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé la résonance magnétique nucléaire (RMN) pour étudier et confirmer le réseau séquentiel d'interactions obtenues dans l'article 1. Cette approche très sensible nous a fourni des informations importantes sur l'association séquentielle des pseudopilines au niveau du complexe grâce aux variations des déplacements chimiques ou « *chemical shift perturbation* ».

En plus d'être une technique très intéressante pour la détermination des structures de certaines protéines, la RMN s'avère également être une technique de choix dans les études d'interactions protéine-protéine. La détermination des interactions par RMN est relativement aisée. En effet, il suffit pour cela de marquer une protéine à l'azote ^{15}N, rendant ainsi possible l'enregistrement d'un spectre ^{15}N-HSQC qui permet de visualiser tous les protons amides de la protéine marquée. Une fois ce spectre enregistré, l'ajout de quantités croissantes de partenaire non marqué permet d'enregistrer une nouvelle série de spectres ^{15}N-HSQC. Le partenaire non marqué n'est pas visible sur le spectre, mais s'il interagit avec la protéine marquée ^{15}N, il provoque un changement de l'environnement chimique des protons amides due à l'interaction des deux protéines. Ce changement se traduit par un changement des déplacements chimiques visible au niveau des spectres.

Nous avons ainsi produit $XcpW_J$ marquée à l'azote ^{15}N dont nous avons enregistré des spectres ^{15}N-HSQC en présence de concentrations croissantes de $XcpV_I$, $XcpU_H$ ou de $XcpX_K$. En accord avec les résultats obtenus dans l'article 1, nous avons trouvé que $XcpW_J$ interagit avec $XcpV_I$ et $XcpU_H$, cependant, l'ajout de $XcpX_K$ à $XcpW_J$ marquée ne montre aucun changement dans le spectre ^{15}N-HSQC (figure 43).

Afin d'extraire le maximum d'informations sur la formation du complexe quaternaire, nous avons enregistré les spectres ^{15}N-HSQC de plusieurs combinaisons $XcpW_J$-V_I, $XcpW_J$-V_I-U_H et $XcpW_J$-U_H-V_I-X_K. De cette façon, nous pouvons voir les changements que $XcpW_J$ subit lors de l'association de $XcpU_H$ au complexe formé par $XcpW_J$-V_I et les changements dus à l'association de $XcpX_K$ au complexe formé par $XcpW_J$-V_I-U_H.

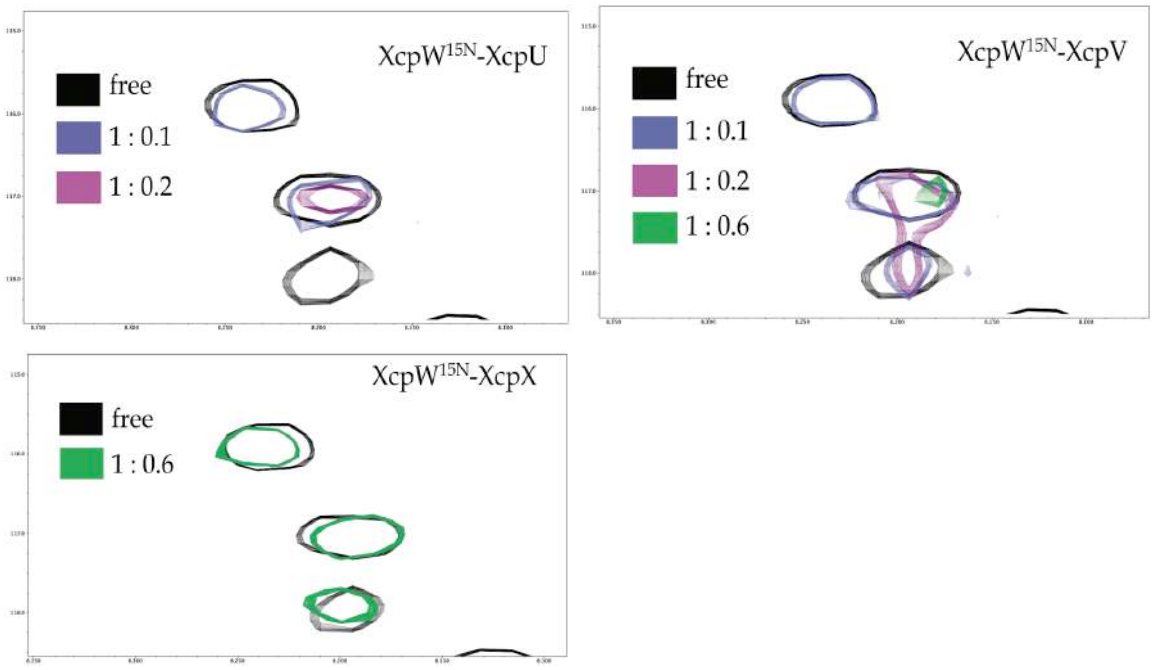


Figure 43 : Spectres ^{15}N-HSQC montrant les variation des déplacements chimiques de XcpW$_J$ marquée au ^{15}N en présence des autres pseudopilines mineures.

Les résultats obtenus ont montré que l'ajout de XcpU$_H$ sur le complexe XcpW$_J$-V$_I$ engendre des changements au niveau du spectre ^{15}N-HSQC. Ceci confirme que l'association de XcpU$_H$ au complexe binaire se fait à travers son interaction avec XcpW$_J$. L'ajout de XcpX$_K$ au complexe formé par XcpW$_J$-V$_I$-U$_H$ ne montre cependant que de très faibles changements du spectre confirmant ainsi l'absence d'interaction directe entre XcpW$_J$ et XcpX$_K$.

L'ensemble des résultats de la titration de XcpW$_J$ marqué au ^{15}N par des concentrations croissantes de pseudopilines mineures XcpU$_H$, XcpV$_I$ et XcpX$_K$, ainsi que les données obtenues dans les deux premiers articles (article 1 et 2), nous suggèrent que le complexe quaternaire identifié chez *P. aeruginosa* serait différent du complexe ternaire formé par GspI-J-K chez *E. coli* ETEC. En effet, dans ce dernier, l'interaction de GspJ-GspK, caractérisée par une interface de l'ordre de 3510Å^2, est absente dans le complexe quaternaire XcpW$_J$-U$_H$-V$_I$-X$_K$. De plus, les résultats RMN montrent clairement que l'ajout de XcpX$_K$ au niveau du complexe ternaire XcpW$_J$-U$_H$-V$_I$ n'engendre pas des changements importants sur ce complexe.

I. 4. Caractérisation biochimique et structurale du complexe quaternaire $XcpU_H$-V_I-W_J-X_K

Au cours de mon travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la caractérisation biochimique et structurale du complexe quaternaire formé par $XcpU_H$-V_I-W_J-X_K. Bien que préliminaires, nos résultats nous permettent de mieux comprendre la façon dont les quatre pseudopilines mineures intègrent le pseudopilus ainsi que le rôle du chacune d'entre elles dans le processus de sécrétion.

I-3-1 Purification du complexe quaternaire :

Afin de purifier le complexe, chacune des pseudopilines mineures a été produite et purifiée séparément. Les rendements obtenus pour chacune des pseudopilines étaient de : 9 mg/L pour $XcpU_H$, 8 mg/L pour $XcpV_I$, 34 mg/L pour $XcpW_J$ et 23 mg/L pour $XcpX_K$. Une fois purifiées, les pseudopilines ont été incubées ensemble à 4°C avec un ratio 1:1:1:1 (0,5mM chacune). Le mélange a été concentré dans 1 ml de tampon et le mélange a été injecté sur une colonne de chromatographie d'exclusion S200. Les pics ont été analysés par SDS-PAGE afin d'isoler le pic qui correspond au complexe quaternaire (figure 44).

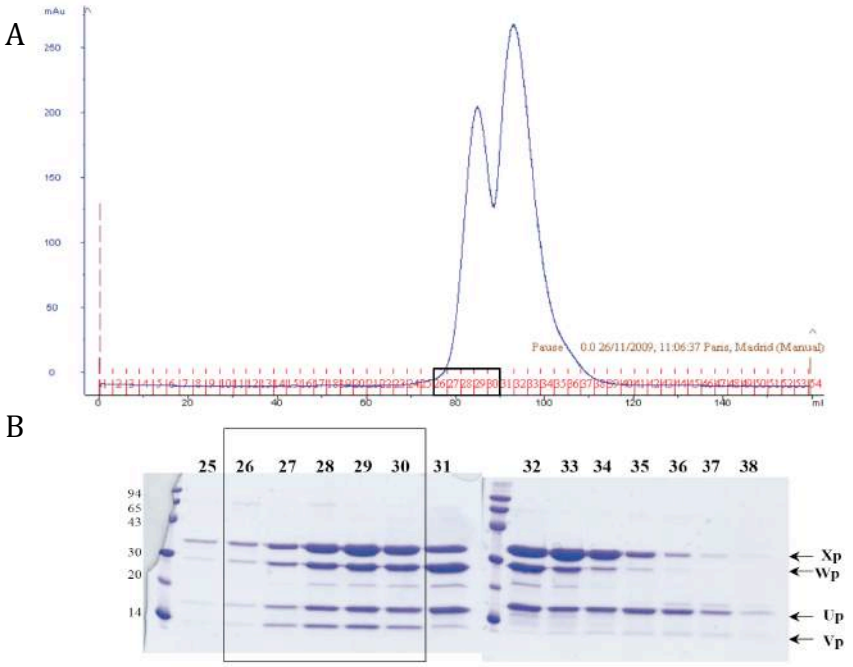
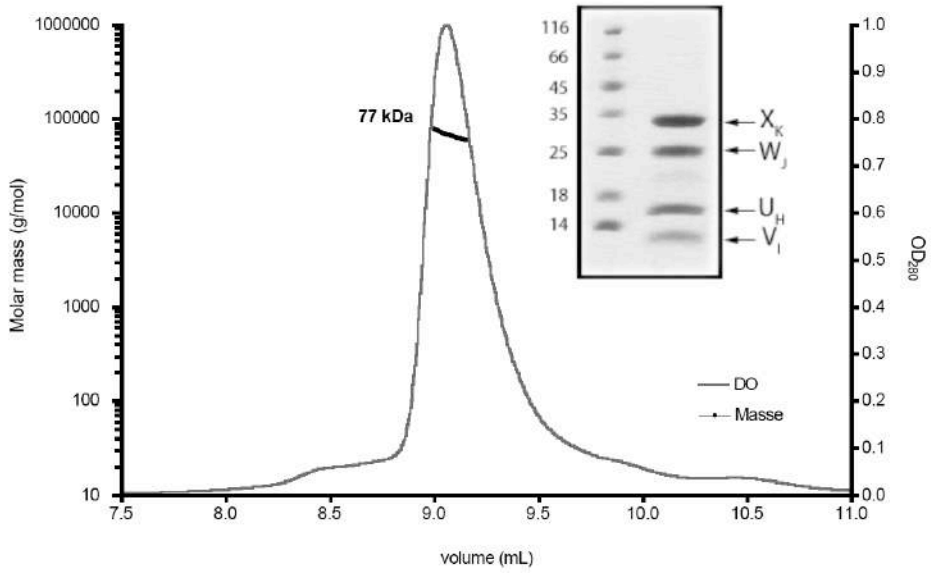


Figure 44 : Purification du complexe formé par $XcpU_H$-V_I-W_J-X_K : (A) Profil de la purification du complexe quaternaire par chromatographie d'exclusion. (B) Les pics obtenus sont analysés par SDS-PAGE. Les fractions 26-30 correspondent au complexe quaternaire.

I-3-2 Détermination de la masse et de la stœchiométrie du complexe :

Nous avons ensuite déterminé la masse et la stœchiométrie des domaines solubles des pseudopilines mineures isolées et celles du complexe quaternaire par la technologie WYATT. Cette approche permet la détermination les rayons hydrodynamiques (Rh), les rayons de giration (Rg) ainsi que la masse moléculaire en solution des différentes espèces séparées par chromatographie d'exclusion. Tous les domaines solubles des pseudopilines mineures ainsi que le complexe donnent un seul pic en sortie de chromatographie d'exclusion (figure 45). La masse calculée du pic correspondant au complexe est de 77kDa alors que la masse théorique est de 85kDa. Ce résultat prouve que le ratio des pseudopilines mineures dans le complexe est bien de 1:1:1:1 (figure 45).



Proteins	Theoretical MW	MW measured by MALS/refractometry/SEC	Stoichiometry	R_h
	Da	Da		nm
$XcpV_I$	11563	14170		
$XcpU_H$	16177	16140		2.1
$XcpW_J$	24169	24370		2.81
$XcpX_K$	34071	34570		
$XcpU_HV_IW_JX_K$	85980	77260	1:1:1:1	4.2

Figure 45 : Calcul de la masse et de la stœchiométrie du complexe quaternaire. En haut, calcul de la masse du complexe quaternaire par la technologie WYATT. Le complexe est purifié par chromatographie d'exclusion. Le pic contenant les 4 pseudopilines mineures est analysé par SDS-PAGE. En bas, le tableau montrant le calcul de la masse des pseudopilines mineures isolées ou bien en complexe.

I-3-3 Caractérisation structurale du complexe :

I-3-3-1 : Cristallogenèse du complexe quaternaire

Dans le cadre de l'étude structural du complexe quaternaire des pseudopilines mineures, j'ai fourni le complexe quaternaire purifié d'une part au Professeur Katrina Forest pour la cristallogenèse et d'autre part au Dr Eric Durand (Post-Doc chez le Dr. Romé Voulhoux) pour une étude SAXS.

Le Professeur Katrina Forest a obtenu, dans deux conditions de cristallisation, des petits cristaux du complexe quaternaire sous forme de bâtonnets de petites tailles qui nécessitent d'être optimisés (figure 46). L'optimisation des conditions de cristallisation et la détermination de la structure du complexe quaternaire seront réalisées dans le laboratoire de Dr Christian Cambillau à partir de septembre 2011.

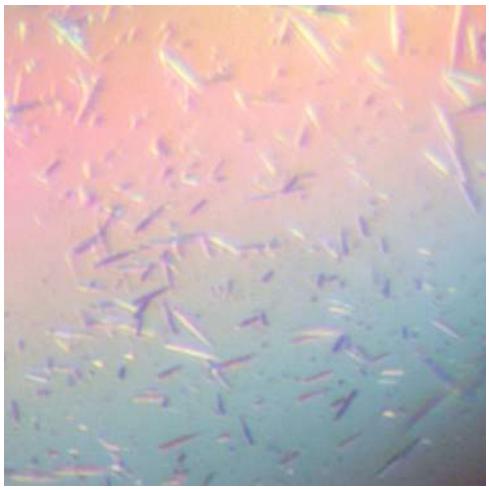


Figure 46 : Cristaux du complexe quaternaire formé par les pseudopilines mineures $XcpU_H$-V_I-W_J-K_K.

I-3-3-2 : Caractérisation structurale du complexe par « *Small-Angle X-ray Scattering* » SAXS

Le Dr. Eric Durand en collaboration avec le Dr. Véronique Receveur (CNRS-Marseille) ont collecté et analysé les données SAXS ce qui a abouti à la détermination d'une enveloppe du complexe formé par les pseudopilines $XcpU_H$-V_I-W_J-X_K (figure 47A).

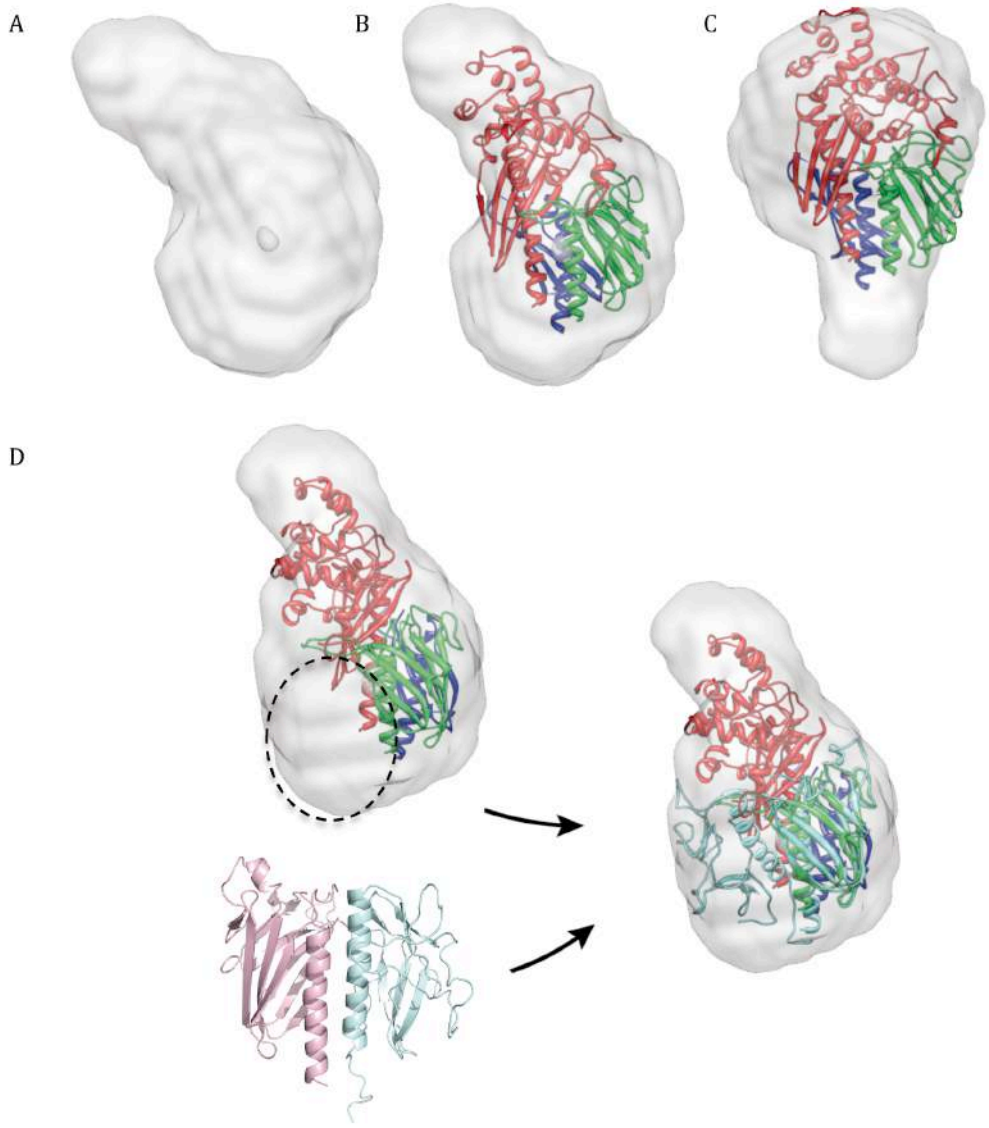


Figure 47 : Analyse des données SAXS du complexe quaternaire $XcpU_H$-V_I-W_J-X_K. Enveloppe du complexe (A). Arrimage moléculaire du complexe GspI-J-K dans l'enveloppe. Le complexe s'oriente de deux façons possibles (B, C). (D) Dans la solution la plus probable (B), $XcpU_H$ s'associe au complexe via son interaction avec $XcpW_J$ (D) en suivant le mode d'assemblage hélicoïdale retrouvé dans le complexe GspI-J-K.

Afin de comparer l'enveloppe du complexe quaternaire à la structure du complexe GspI-J-K, nous avons essayé de « *docker* » ce complexe dans l'enveloppe. Le complexe peut s'orienter de deux façons compatibles avec la forme de l'enveloppe (figure 47 B&C). Afin de distinguer l'orientation la plus probable, nous avons accommodé $XcpU_H$ dans ce complexe en tenant compte de 3 critères : i) $XcpU_H$ ne doit pas franchir le volume de l'enveloppe, ii) $XcpU_H$ ne doit interagir qu'avec $XcpW_J$, et iii) $XcpU_H$ doit intégrer le complexe en respectant la forme hélicoïdale.

La structure de $XcpU_H$ a été modélisée à partir de la structure de EpsH de *V. cholerae* (Yanez *et al.*, 2008a). Les deux protéines présentent 35% d'identité de séquences. Ensuite, nous avons réalisé l'arrimage moléculaire entre le modèle de $XcpU_H$ et $XcpW_J$ sur le serveur HADDOCK en ligne (de Vries and Bonvin; Dominguez *et al.*, 2003). Les résultats obtenus de l'arrimage moléculaire montrent que $XcpU_H$ interagit avec $XcpW_J$ majoritairement au niveau de l'hélice N-terminale (figure 47D).

L'analyse de ces données préliminaires nous montre que l'orientation la plus plausible du complexe dans l'enveloppe est celle où le domaine variable de $XcpX_K$ pointe vers le resserrement de l'enveloppe (figure 47B). Le complexe quaternaire aurait une conformation proche de celle du complexe GspI-J-K avec un assemblage hélicoïdale où les 4 hélices N-terminales des 4 pseudopilines mineures pointent vers l'axe du complexe. De plus, ces données révèlent que le diamètre du complexe quaternaire est plus important que celui de la sécrétine et possède une forme difficile à accommoder dans le vestibule périplasmique (figure 48).

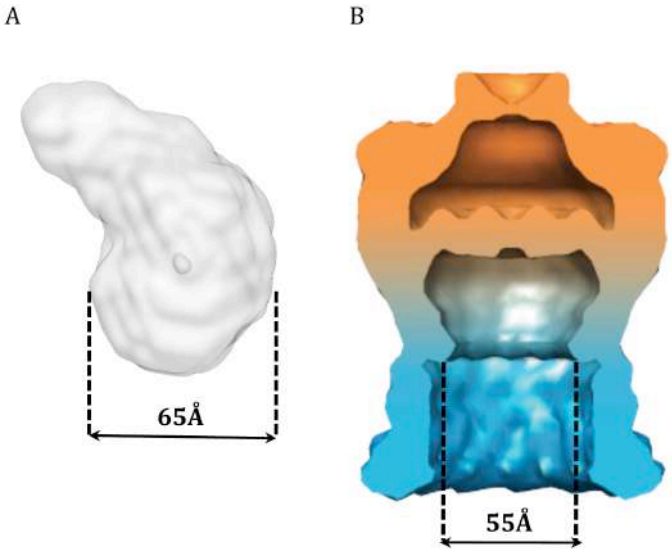


Figure 48 : Comparaison des diamètres de l'enveloppe du complexe quaternaire (A) avec le diamètre de la sécrétine (B).

I. 5. Caractérisation structurale de la pseudopiline majeure XcpT$_G$ (article 3)

Chez *P. aeruginosa*, la surproduction de la pseudopiline majeure XcpT$_G$ conduit à la formation d'un HPP extracellulaire. L'existence d'une telle structure ressemblant au pili de type IV témoigne de la présence, dans les conditions physiologiques, d'un pseudopilus périplasmique qui permet d'expulser les exoprotéines à travers le pore de sécrétion vers le milieu extracellulaire.

La résolution de la structure de XcpT$_G$ par RMN en solution, réalisée dans notre équipe par Dr. Sébastien Alphonse (article 3), a confirmé que cette pseudopiline majeure adopte un repliement α/β caractéristique des pilines. XcpT$_G$ est constituée d'une hélice α N-terminale (résidus 44-68) composée principalement de résidus hydrophobes, d'une région variable (résidus 69-112) relativement peu structurée et d'un feuillet β C-terminal à 3 brins antiparallèles (résidus 113-146) (figure 49A).

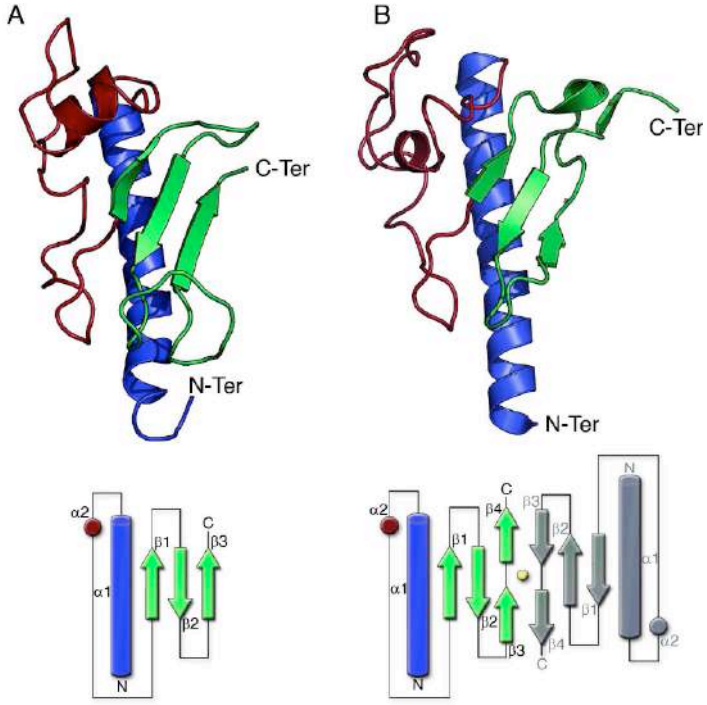


Figure 49: Comparaison de la structure de XcpT$_G$ de *P. aeruginosa* et de PulG de *K. oxytoca* (code pdb 1T92).

La comparaison de la structure de XcpT$_G$ de *P. aeruginosa* avec celle de PulG du SST2 de *K. oxytoca* montre que les deux structures sont très similaires (figure 49 A&B). Cependant, une

différence notable existe au niveau du feuillet C-terminal où PulG possède un quatrième brin β alors que $XcpT_G$ n'on possède que trois (figure 49B).

L'alignement des 10 pseudopilines majeures les plus représentatives du SST2 révèle que la région dite « variable » (généralement très différentes entre les pilines majeures) s'avère être finalement assez conservée. Deux zones très conservées se distinguent tout particulièrement et forment le motif consensus **LP(X)DPWG(XX)Y.** Afin d'étendre nos recherches, nous avons comparé ce motif dans l'ensemble des génomes bactériens séquencés. Les résultats sont sans équivoque, puisque les 145 cibles identifiées sont toutes des pseudopilines du SST2. Nos résultats révèlent donc que le domaine dit « variable » est finalement conservé chez toutes les pseudopilines majeures et qu'il permet aussi de différencier une pseudopiline majeure des pilines majeures ainsi que des pseudopilines mineures.

Durant la soumission de cet article, les structures des domaines solubles des 3 autres pseudopilines majeures GspG du SST2 de *V. cholerae*, *V. vulnificus* et d'*E. coli* EHEC on été résolues par cristallographie aux rayons X (Korotkov *et al.*, 2009a). Ces trois structures sont très similaires entre elles (RMSD < 1Å). Elles présentent un repliement α/β caractéristique des pilines et similaire à celui de PulG et $XcpT_G$. Ces structures sont composées d'une hélice α N-terminale, d'un domaine variable suivi d'un feuillet β C-terminal à 3 brin antiparallèles et une courte hélice α supplémentaire (figure 50).

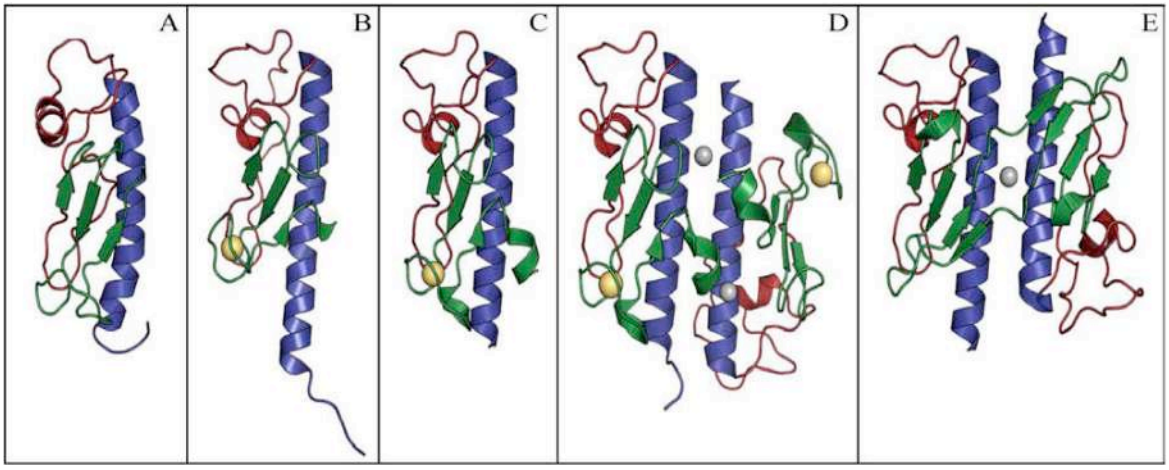


Figure 50 : Comparaison des structures des différents GspG : en (A) Structure de $XcpT_G$ de *P. aeruginosa* (code pdb 2KEP), (B) GspG d'*E. coli* EHEC (code pdb 3G20), (C) EpsG de *V. vulnificus* (code pdb 3GN9), (D) EpsG de *V. cholerae* (code pdb 3FU1), et (E) PulG de *K. oxytoca* (code pdb 1T92).

Il a été montré que la boucle qui connecte les brins β2 et β3 du feuillet C-terminal dans les 3 structures de GspG permet de fixer un atome de calcium qui s'est avéré être un élément essentiel pour la sécrétion par les SST2 des différents correspondants (Korotkov *et al.*, 2009a). D'une façon intéressante, cette boucle présente le même repliement dans la structure de $XcpT_G$. Ceci suggère que la sécrétion chez *P. aeruginosa* peut aussi être dépendante de la présence du calcium.

Article III

Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* XcpT pseudopilin, a major component of the type II secretion system.

Alphonse Sébastien, Durand Eric, Douzi Badreddine, Waegele Brigitte, Darbon Hervé, Filloux Alain, Voulhoux Romé*, Bernard Cédric*.

J Struct Biol. 2010. 169(1):75.

Journal of Structural Biology 169 (2010) 75–80

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Structural Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yjsbi

Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* XcpT pseudopilin, a major component of the type II secretion system

Sébastien Alphonse [a], Eric Durand [b], Badreddine Douzi [a,c], Brigitte Waegele [d,e], Hervé Darbon [a], Alain Filloux [b,f], Romé Voulhoux [b,*], Cédric Bernard [a,*]

[a] *Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques (AFMB), CNRS, Université de Provence et Université de la Méditerranée, UMR6098, Case 932, 163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille cedex 9, France*
[b] *Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires (LISM-UPR 9027), CNRS, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille cedex 20, France*
[c] *Laboratoire des Maladies Transmissibles et Substances Biologiquement Actives (LR99ES27), Faculté de pharmacie, TU-5000 Monastir, Tunisia*
[d] *Institute for Bioinformatics and Systems Biology (MIPS), Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health (GmbH), Ingolstädter Landstraße 1, D-85764 Neuherberg, Germany*
[e] *Technische Universität München, Life and Food Science Center Weihenstephan, Am Forum 1, D-85354 Freising-Weihenstephan, Germany*
[f] *Center for Molecular Microbiology and Infection (CMMI), Division of Cell and Molecular Biology, Imperial College London, London SW7 2AZ, UK*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 May 2009
Received in revised form 27 August 2009
Accepted 4 September 2009
Available online 9 September 2009

Keywords:
NMR
Structure determination
Type II secretion
Pseudopilin

ABSTRACT

The bacterial type II protein secretion (T2S) and type IV piliation (T4P) systems share several common features. In particular, it is well established that the T2S system requires the function of a pilus-like structure, called pseudopilus, which is built upon assembly of pilin-like subunits, called pseudopilins. Pilins and pseudopilins have a hydrophobic N-terminal region, which precedes an extended hydrophilic C-terminal region. In the case of pilins, it was shown that oligomerisation and formation of helical fibers, takes place through interaction between the hydrophobic domains. XcpT, is the most abundant protein of the *Pseudomonas aeruginosa* T2S, and was proposed to be the main component in the pseudopilus. In this study we present the high-resolution NMR structure of the hydrophilic domain of XcpT (XcpTp). XcpTp is lacking the C-terminal disulfide bridged "D" domain found in type IV pilins and likely involved in receptor binding. This is in agreement with the idea that the XcpT-containing pseudopilus is required for protein secretion and not for bacterial attachment. Interestingly, by solving the 3D structure of XcpTp we revealed that the previously called αβ-loop pilin region is in fact highly conserved among major type II pseudopilins and constitutes a specific consensus motif for identifying major pseudopilins, which belong to this family.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Gram-negative bacteria possess various macromolecular nanomachines for the transport of extracellular proteins and the assembly of cell surface appendages. In spite of having significantly different biological function, these nanomachines often share similar components. This is the case between flagella assembly and type III secretion, conjugative F-pili assembly and type IV secretion, or type IV pili (T4P) assembly and type II secretion (T2S) (Economou et al., 2006). Type IV pili are long fimbrial structures present at the cell surface of various Gram-negative bacteria (Craig and Li, 2008; Pelicic, 2008). They are growing from the cytoplasmic membrane by the polymerization of the major pilin subunit PilA, which then extrudes through the outer membrane pore formed by PilQ subunits (Wolfgang et al., 2000). It is worth noting that additional minor pilins are involved in the assembly/stability of the pilus but they are not major components of the pilus fiber itself, namely PilV, -W, -X and FimT and -U in *Pseudomonas aeruginosa* (Mattick, 2002). In the case of type II secretion in *P. aeruginosa*, the nanomachine involved is called the Xcp secretion, which is a multiprotein complex involving at least 12 different proteins called XcpA, XcpP-Z (Filloux, 2004). Among the *P. aeruginosa* Xcp components, five proteins (XcpT-X) have been described as type IV-pilin like protein and consequently called pseudopilins (Bally et al., 1992; Bleves et al., 1998). They are, like PilA, all substrates for the prepilin peptidase XcpA/PilD, which recognizes and cleaves a short leader peptide (~6 amino acids), located at the N-terminus and preceding a hydrophobic domain. Based on this observation, it was proposed that at least some of these pseudopilins could form a pilus-like structure. Interestingly, it was reported earlier that the most abundant of these pseudopilins was XcpT, thus considered as the major

* Corresponding authors. Fax: +33 491 712124 (R. Voulhoux), +33 491 266720 (C. Bernard).
E-mail addresses: voulhoux@ifr88.cnrs-mrs.fr (R. Voulhoux), cedric.bernard@afmb.univ-mrs.fr (C. Bernard).

1047-8477/$ - see front matter © 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jsb.2009.09.003

T2S pseudopilin (Nunn and Lory, 1993). Strikingly, when XcpT was produced at an even much higher level it became assembled by the Xcp secretion into a fibrillar structure visible at the cell surface and likely to be an extra long pseudopilus (Durand et al., 2003). Moreover, none of the other Xcp pseudopilins (XcpU-X) was capable of forming a pseudopilus by simple overproduction (Durand et al., 2005). These observations confirmed that the Xcp secretion is capable to assemble a pilus-like structure and that the main component of this so-called pseudopilus might be XcpT, which will then have a role that is comparable to PilA, the major type IV pilin subunit. Accordingly, XcpT was then considered as the major pseudopilin, whereas XcpU-X are considered as minor pseudopilins, whose role, as for the minor pilins remains to be elucidated. However, whereas PilA structure and assembly is well documented in *P. aeruginosa* (Burrows, 2005; Hansen and Forest, 2006), very little is known for the Xcp counterpart, XcpT. In the present study we are describing the first example where NMR is used to solve the structure of a T2S element and the first structure of a *P. aeruginosa* type II secretion machinery component. Hence, we present the high-resolution solution structure of the hydrophilic domain of the *P. aeruginosa* Xcp type II major pseudopilin, XcpT.

2. Material and methods

2.1. Protein expression and purification

Escherichia coli BL21 cells, transformed with the plasmid pET-$Tp_{25-148NH}$ (Durand et al., 2005) coding for the soluble domain of XcpT (XcpTp), were grown in Luria Broth medium at 30 °C supplemented with ampicillin 50 μg/ml. For the isotope labeling, M9 minimal medium was supplemented with 100% uniformly labeled ^{13}C-glucose (4 g/l) and/or $^{15}NH_4Cl$ (0.5 g/l). When the OD_{600} of the culture reached 0.6 over-expression was induced with 0.1 mM of IPTG and incubation was continued for 13 h. Protein purification was performed following the procedure previously described (Durand et al., 2005) with an additional step of gel filtration on HiLoad 16/60 Superdex 75 (Pharmacia) in buffer: NaPi 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7. Proteins were concentrated using Centricon devices (Millipore) with a 3.5 kDa cut-off size. Final sample concentrations were 0.96 mM for XcpTp, 0.89 mM for ^{15}N labeled XcpTp and 0.93 mM for ^{15}N–^{13}C labeled XcpTp, as evaluated by Bradford colorimetric test.

2.2. NMR spectroscopy

All spectra were recorded at 290 K on a Bruker Avance 600 MHz equipped with a cryo probe except for the 2D NOESY, which was recorded on a Bruker Avance 900 MHz. The sequential assignment was performed by the combined use of HNCA, HN(CO)CA, CBCA (CO)NH, HNCACB, HNCO, HN(CA)CO, HBHACONH, HNHAHB, HCCH-TOCSY, HNHA, 3D ^{15}N-NOESY-HSQC and 3D ^{15}N-TOCSY-HSQC spectra and was obtained according to standard methods (Sattler et al., 1999). All spectra were processed with NMRPipe (Delaglio et al., 1995) and analyzed with NMRView (Johnson and Blevins, 1994). Heteronuclear 15 N{1H}-NOE values were determined using the experiment described previously (Farrow et al., 1994). Chemical shifts have been deposited to the BMRB Data Bank with Accession Number 16164.

2.3. Proton–deuterium exchange

Proton–deuterium exchange experiments were performed by lyophilizing a ^{15}N labeled sample and redissolving it in D_2O, thereby monitoring the intensity decrease of HSQC correlation peaks by recording the following sequential series of ^{15}N-HSQC spectra: 10 spectra with 4, 8, 16 and 32 scans, and 6 spectra with 64 scans for a total recording time of 52 h. Measured intensities were rescaled based on the number of recorded scans and fitted to a single exponential decay. The obtained rates were converted into protection factors using a method previously described (Bai et al., 1995, 1993). Identification of the partner for the hydrogen bond was preformed by preliminary structure visual analysis and a hydrogen bond restraint was then injected as input in the structure calculation.

2.4. Structure calculation

Automatic peak picking of NOE cross peaks on the 3D ^{15}N-NOESY-HSQC and on the 2D NOESY spectra was performed by the ATNOS software (Herrmann et al., 2002). Resulting peaklists were then manually corrected (removal of diagonal peaks and peaks arising from artifacts). NOE correlation peaks resulting from secondary structures and from aromatic side chains were assigned manually and converted in distance restraints with CYANA 2.1 (Herrmann et al., 2002). Remaining NOEs were assigned using the CANDID/NOEASSIGN automatic procedure of CYANA 2.1. Additionally TALOS (Cornilescu et al., 1999) dihedral restraints derived from $^{13}C\alpha$ and $^{13}C\beta$ chemical shift and hydrogen bonds derived from the proton/deuterium exchange analysis were added as structural inputs during the calculation. The calculation consisted of seven cycles of iterative automated NOE assignment and structure calculation of 250 conformers in each cycle. At the end of each CYANA run, unambiguously assigned peaks were converted in distance restraints and used as inputs for the next calculation steps. To keep the same assignment condition, the same NOE calibration parameter, calculated by CYANA during the first run of NOE assignment was used in all other runs of calculation.

The final structure calculations with CYANA were started from 600 conformers and a simulated annealing with 20,000 time steps per conformer was done using the CYANA torsion angle dynamics algorithm (Guntert et al., 1997; Vranken et al., 2005). The 60 best solutions were refined using a short restrained molecular dynamics simulation in explicit solvent (Linge et al., 2003; Nabuurs et al., 2004) in the program XPLOR-NIH (Schwieters et al., 2003). Unambiguous distance and dihedral angle restraints were converted to the X-PLOR format (Brunger et al., 1998) with FormatConverter (Fogh et al., 2002). At the end of the refinement, the 20 lowest energy solutions were selected to form the final ensemble.

The quality of the structure was analyzed with PROCHECK-NMR (Laskowski et al., 1996) and WHATIF (Vriend, 1990) programs. Superposition of the structures was performed using the McLachlan algorithm as implemented in the program ProFit (Martin, A.C.R., http://www.bioinf.org.uk/software/profit/). All structure representations were made with the program PYMOL (DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA. http://www.pymol.org). The atomic coordinates and experimentally derived restraints have been deposited in the Protein Data Bank with Accession Number 2KEP.

2.5. Motif analysis

All 728 bacterial proteomes available in the current PEDANT3 database (Walter et al., 2009) were extracted and scanned for the observed putative conserved sequence patterns. The respective regular expressions were derived from a multiple alignment of nine Gram-negative bacteria (possessing characterized type II secretion systems) covering the conserved α-helix and αβ-loop of major pseudopilins. Sequences showing the pattern LP.{1}DP-WG.{2}Y were extracted and further information attached. This includes cross-references to respective protein entries of RefSeq (Pruitt et al., 2007) and GenBank (Benson et al., 2008), and protein

description as listed in PEDANT3. Where the description listed "hypothetical protein" a NCBI-Blast (Johnson et al., 2008) analysis revealed strong homology to GspG proteins of various bacteria. Additionally all sequences showed conserved domains of the GSPII_G superfamily.

3. Results and discussion

3.1. Resonance assignment and proton/deuterium exchange

The hydrophilic domain of XcpT (XcpTp) was purified and submitted to NMR spectroscopy (see Materials and methods). All backbone amide $^{1}H–^{15}N$ spin pairs of XcpTp were assigned. With exception of the labile side chains protons of lysine and arginine residues, 95% of observable protons were assigned. At the end of the assignment process, 3090 peaks were assigned and converted into 1113 unique distance restraints. QUEEN analysis (Nabuurs et al., 2003) of NOE assignment pinpointed 20 restraints that seemed to be potentially false or inconsistent (typically restraints too unique and or too structurally important, data not shown). However, in depth analysis of these assignments confirmed the validity of the assignment.

Proton/deuterium exchange experiments allowed the identification of 44 protected amide protons. Analysis of intensity decrease of the corresponding correlation in the HSQC spectra led to the determination of 16 protection factors (see supplementary figure S1). The 32 remaining protected protons showed a very slow exchange, excluding a correct fitting in an exponential decay, therefore precluding the calculation of such a protection factor.

3.2. Solution structure of XcpTp

All the data were computed and the statistics for the 20 best structures of XcpTp are presented in Table 1. The solution structure of XcpTp was determined on the basis of 1113 unique restraints divided into 331 intra-residual, 321 sequential, 173 medium-range and 288 long-range restraints. 43 hydrogen bounding restraints and 86 dihedrals restraints were also added as input to the calculation. The pair wise root mean square deviation (RMSD) for the global backbone heavy atoms is 0.78 ± 0.12 Å. These low values of RMSD indicate a well-defined ensemble, as represented by the superposition of the 20 best solution structures (Fig. 1). The Ramachandran analysis display 98.2% of the residues in allowed regions. Heteronuclear NOE values indicate an overall rigidity of the protein, principally for the residues involved in a secondary structure and a high flexibility of the N- and C-terminus of the protein. This fact is confirmed by comparing heteronuclear NOE with the backbone RMSD values (See supplementary figure S2).

The cartoon representation of the XcpTp NMR structure shown in Fig. 2A, clearly revealed that XcpTp is organized following the αβ-fold characteristic of the pilins/pseudopilins structures, with a highly conserved αβ-roll and a αβ-loop region. The αβ-roll is composed of a hydrophobic N-terminal α-helix (α1, residues 44–68) and a three-stranded β-sheet encompassing residues 113–116 (β1), 123–127 (β2) and 143–146 (β3) that form a buried hydrophobic core. The αβ-loop region is less structured, mainly composed of random coiled organization and of only one short α-helix (residues 75–81 for helix α2) that bridges the C-terminal end of the α1 to the first strand of the central anti-parallel β-sheet.

3.3. Comparison of the XcpT and PulG structure

The structure of the soluble domain of PulG, a homologous protein from the type II secretion system of *Klebsiella oxytoca,* was solved in a dimeric state by X ray crystallography (Kohler et al., 2004). As suspected by their sequence similarity (52% identity), XcpTp and PulG display the same conserved αβ-roll fold with a loop connecting the N-terminal α-helix and the β-sheet: the αβ-loop (Fig. 2A and B). Despite the fold similarity, clear differences can be observed between XcpTp and PulG structures. Two of these differences are minor: first the αβ-loop region displays a slightly different orientation of the short α-helix (α2) and second, the loop connecting the second (β2) and the third (β3) strand of the β-sheet is longer in XcpTp. However, the most important difference between XcpTp and PulG involves the C-terminal part of the β-sheet, which is constituted of three β-strands for XcpTp against four for PulG. The crystal structure of the PulG dimer indicated that the C-terminal part of the β-sheet is involved in a domain swapping, the fourth strand of one monomer constituting the last β-strand of the other monomer. Such dimer organization is supposed to arise from a crystallization artifact, as it is not in agreement with a pilus assembly: the N-terminal hydrophobic helices are oriented in an anti-parallel manner in this crystallographic dimer, whereas they are packed in a parallel fashion within the biologically relevant filament. Interestingly the portion that immediately precedes the fourth strand of PulG has exactly the same sequence as the one that contains the last strand of XcpTp (Fig. 2E), for which such a domain swapping was not observed as XcpTp structure was solved as a monomer.

Table 1
Structural statistics for the ensemble of the 20 best structures of the XcpTp.

Pairwise cartesian RMS deviation (Å)	
Global backbone heavy atoms	0.78 ± 0.12
Global all heavy atoms	1.42 ± 0.14
Ordered backbone heavy atoms[a]	0.44 ± 0.06
Ordered all heavy atoms[a]	1.08 ± 0.10
Restraint information[b]	
NOE derived distance restraints	1113
Intra-residual	331
Sequential	321
Medium	173
Long	288
Hydrogen bond	44
Dihedral angle restraints	86
Energies (kcal M^{-1})	
Total	−3470.03 ± 70.7
NOE	48.34 ± 4.50
Cdih	9.37 ± 1.42
Ramachandran quality parameters (%)[c]	
Favored regions	78.3
Allowed regions	19.9
Additionally allowed regions	0.7
Disallowed regions	1.1
Average RMS deviation from experimental restraints	
Distance restraints (Å)	0.028 ± 0.001
Dihedral angle restraints (deg.)	1.028 ± 0.076
Average RMS Z-scores deviation from current reliable structures[d]	
Bond lenghts	0.84
Bond angles	0.81
Omega angle restraints	0.16
Side-chain planarity	0.98
Improper dihedral distribution	0.89
Inside/outside distribution	1.00
Average deviation from current reliable structures[d]	
1st generation packing quality	−3.24
2nd generation packing quality	−1.92
Chi-1/Chi-2 rotamer normality	−3.48
Backbone conformation	−2.78

[a] Residues involved in secondary structure elements: 44–68, 75–82,113–116,123–127,143–146.
[b] No NOE and no dihedral angle restraint was violated by more than 0.5 Å and 5°, respectively.
[c] Values based on PROCHECK analysis.
[d] Values based on WHATIF analysis.

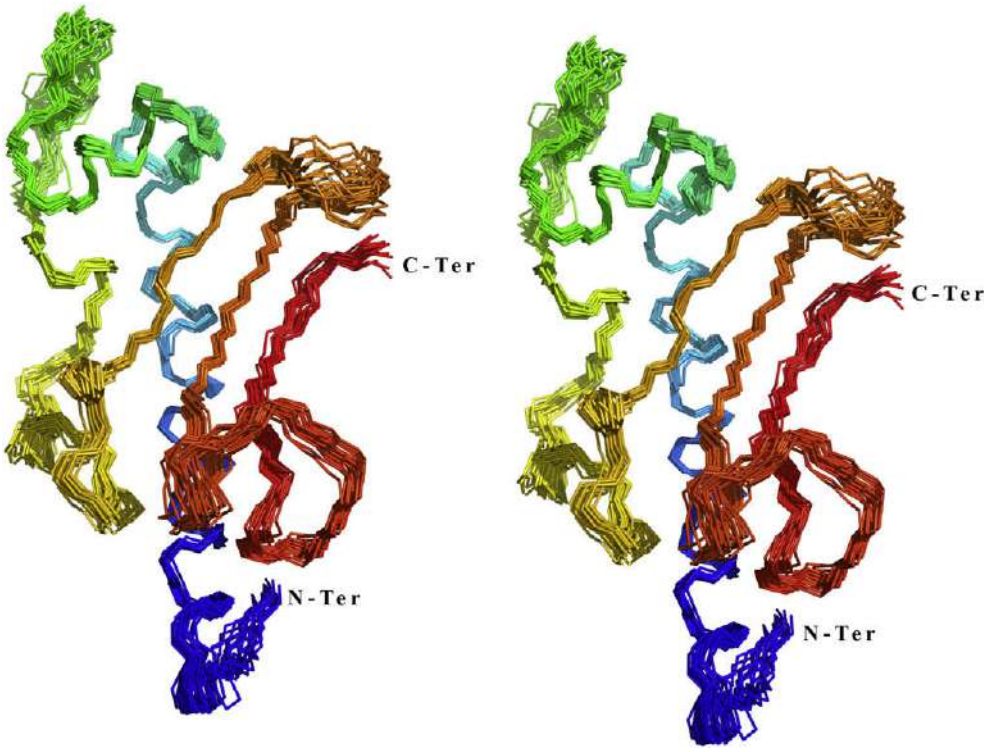


Fig. 1. Stereoview of the superposition of the 20 best models of XcpTp. The polypeptide chain is colored as a gradient from blue (N-terminal) to red (C-terminal).

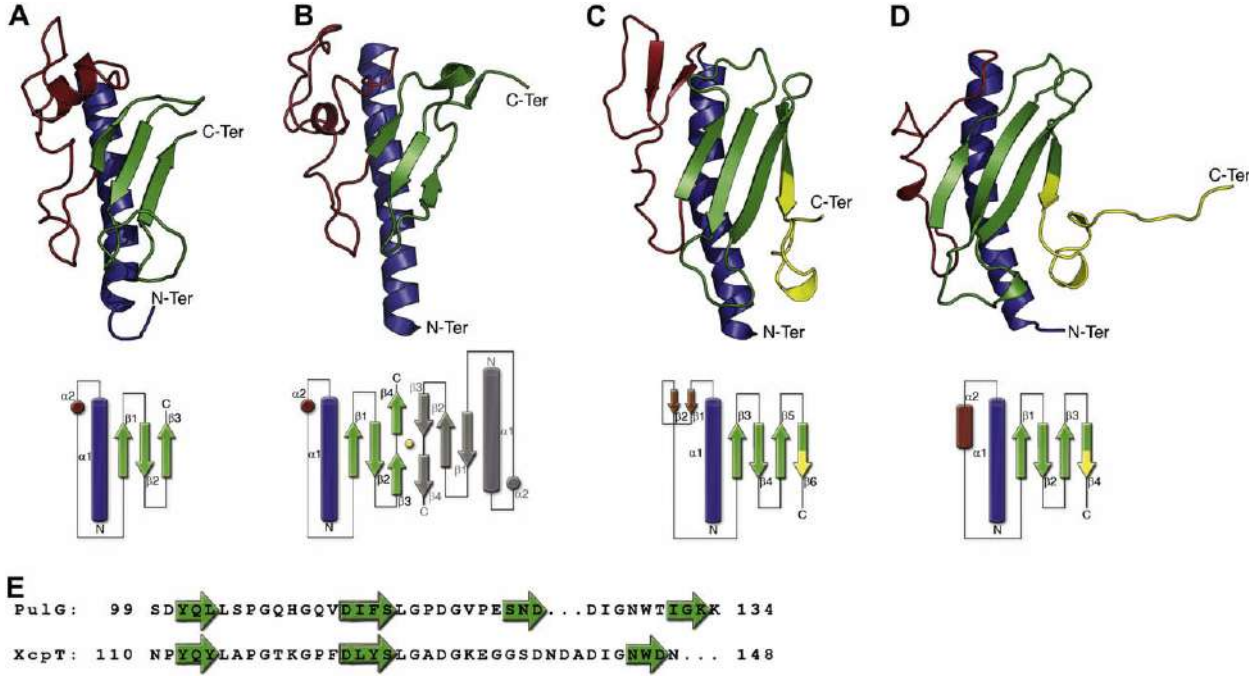


Fig. 2. Comparison of (A) the NMR structure of the soluble domain of XcpT with known structures from (B) the soluble domain of the pseudopilin PulG from *Klebsiella oxytoca* (PDB code 1T92), (C) the soluble domain of the pilin PilA from *P. aeruginosa* strain PAK (PDB code 1OQW) and (D) the soluble domain of the pilin PilA from *P. aeruginosa* strain K122-4 (PDB code 1QVE). To facilitate comparison all the structures are shown in the same orientation. The N-terminal α-helices are represented in blue, β-sheet of the α/β roll in green and the αβ-loop regions are represented in red. In yellow are indicated the D domain of the pilin structures. Topology organization is indicated below each structure. As PulG is organized as a dimer, the topology of the second monomer is indicated in gray and the bound Zinc ion indicated as a yellow dot. (E) sequence alignment of the C-terminal part of PulG and XcpT to highlight the β-sheet organization and sequence conservation.

3.4. Comparison of the XcpTp structure with those of type IV pilins

All the type IV pilins share a common fold with an extended N-terminal α-helix, a four-stranded anti-parallel β-sheet composing the core structure and a variable domain, which is called the αβ-loop (Fig. 2C and D). PulG and XcpTp globally present the same features as pilins, except that XcpTp has only a three-stranded anti-parallel β-sheet. Interestingly, the variability of the αβ-loop region, which

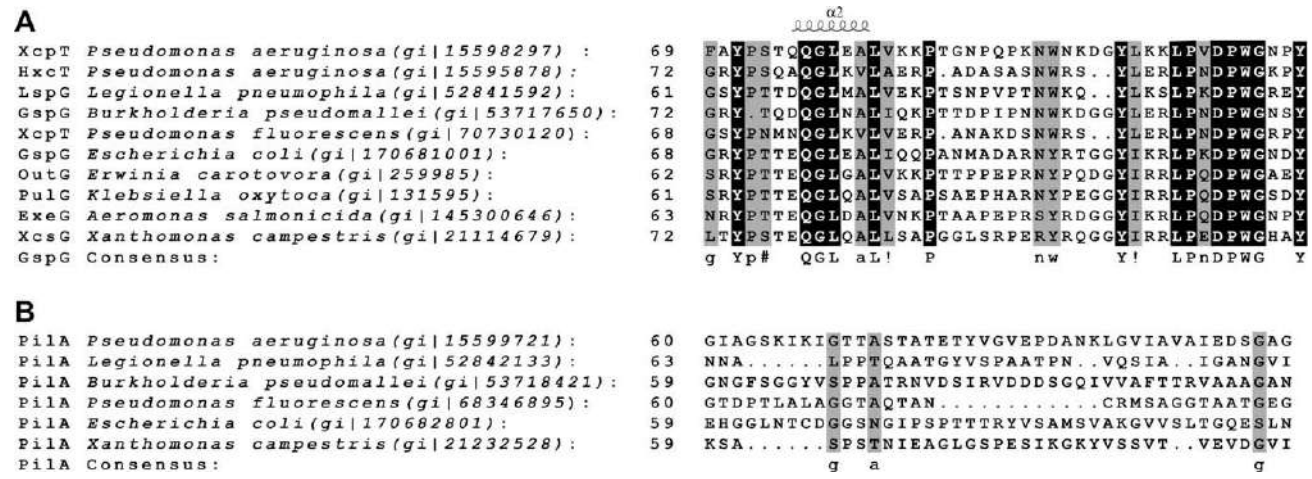


Fig. 3. Sequence alignment of the αβ-loop region of the (A) major pseudopilins and (B) of the major pilins for the same organisms for a set of representative Gram-negative bacteria. Residues strictly conserved are highlighted in black, and residues conserved in more than 50% of the sequences are highlighted in gray. Sequence consensus is indicated below of the sequences, "!" symbol is used for the hydrophobic residues (valine, isoleucine, leucine or methionine) and "#" symbol indicates serine or threonine residues.

is a characteristic in the pilin family, seems to be absent in the pseudopilins XcpTp and PulG. Indeed, in the case of PulG and XcpTp this region seems more conserved particularly because it showed a similar organization in α-helices (α1 and α2) (Fig. 2A and B). We also performed a sequence alignment with the αβ-loop region of major pseudopilins from nine different Gram-negative bacteria possessing a type II secretion system and type IV pili, including *P. aeruginosa* and *P. fluorescens* (de Groot et al., 1994, 1996) (Fig. 3A). We revealed that there is a strong conservation, which essentially concerns the C-terminal part of the αβ-loop, while the central region (composed of a dozen of residues) does not show any sequence conservation. It was possible to determine a consensus motif for the C-terminal parts of the αβ-loop, LP.{1}DPWG.{2}Y, which seems to be characteristic of major pseudopilins. This conservation is remarkable since an alignment of the αβ-loop region of type IV pili subunits present in these same bacterial species did not show any conserved motifs (Fig. 3B). All bacterial proteomes of the current PEDANT3 database release were then scrutinized for the motif LP.{1}DPWG.{2}Y of the C-terminal part of the αβ-loop. Data revealed that this motif is indeed only present in known or annotated major pseudopilins whereas neither minor pseudopilins nor type IV pilins contain this motif (see Supplementary material S3). The identification of these conserved motifs can therefore help to determine whether a new (pseudo)pilin sequence belongs to a type II secretion system or a type IV pilus system. Moreover, when looking at the available structure for the so-called minor pseudopilins (Korotkov and Hol, 2008; Yanez et al., 2008) one can clearly see that they all have the characteristic αβ-roll structure of pilins and pseudopilins. Some minor pseudopilins have a three-stranded β-sheet (EpsH, GspI and GspJ) whereas others have a four-stranded C-terminal β-sheet (GspK). However, the αβ-loop region of these minor pseudopilins is drastically different as compared to major pseudopilins. There also, the use of the conserved motif we identified can allow the discrimination between major and minor pseudopilins. This will be an invaluable tool for genome annotation and for functional genomic analysis.

Electronic supplementary material

The plot of protection factors derived from hydrogen deuterium exchange experiments against the sequence is available as a supplementary figure. (Supplementary figure S1, alphonse_et_al_2009_S1.pdf).

Local root mean square deviation and relative intensities of the heteronuclear 15N{1H}-NOE values (Irel) plotted against the sequence are presented in a supplementary figure. (Supplementary figure S2, alphonse_et_al_2009_S2.pdf).

Detailed results of the motif analysis are available as pdf file. List of the bacterial strains possessing one or several of the 147 proteins containing the major pseudopilin motif LP.{1}DPWG.{2}Y. 728 bacterial proteomes available in the current PEDANT3 database were scrutinized for the motif. PEDANT description, GI Accession Number and RefSeq-ID are indicated for each protein. Where the description listed "hypothetical protein" *a NCBI-Blast analysis revealed strong homology to GspG proteins of various bacteria. (Supplementary material S3, alphonse_et_al_2009_S3.pdf).

Acknowledgments

We would like to thank Hans Wienk from the SON NMR Large Scale Facility of Utrecht (The Netherlands) for technical help. This work was carried out with the financial support of the Agence Nationale de la Recherche, specific program "Jeune Chercheur", ANR-JC07-183230, "Molecular dynamic in type II secretion: the pseudopilus/piston paradigm" and the ERA-NET PathoGenoMics "Pathomics" Grant. Financial support by the Access to Research Infrastructures activity in the 6th Framework Program of the European Community (Contract # RII3-026145, EU-NMR) for conducting the research is gratefully acknowledged. B. Waegele is funded by the ERA-NET PathoGenoMics "Pathomics" Grant and by the BMBF.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jsb.2009.09.003.

References

Bai, Y., Englander, J.J., Mayne, L., Milne, J.S., Englander, S.W., 1995. Thermodynamic parameters from hydrogen exchange measurements. Methods Enzymol. 259, 344–356.

Bai, Y., Milne, J.S., Mayne, L., Englander, S.W., 1993. Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. Proteins 17, 75–86.

Bally, M., Filloux, A., Akrim, M., Ball, G., Lazdunski, A., Tommassen, J., 1992. Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of seven xcp genes and processing of secretory apparatus components by prepilin peptidase. Mol. Microbiol. 6, 1121–1131.

Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Wheeler, D.L., 2008. GenBank. Nucleic Acids Res. 36, D25–30.

Bleves, S., Voulhoux, R., Michel, G., Lazdunski, A., Tommassen, J., Filloux, A., 1998. The secretion apparatus of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of a fifth pseudopilin, XcpX (GspK family). Mol. Microbiol. 27, 31–40.

Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T., Warren, G.L., 1998. Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 54, 905–921.

Burrows, L.L., 2005. Weapons of mass retraction. Mol. Microbiol. 57, 878–888.

Cornilescu, G., Delaglio, F., Bax, A., 1999. Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. J. Biomol. NMR 13, 289–302.

Craig, L., Li, J., 2008. Type IV pili: paradoxes in form and function. Curr. Opin. Struct. Biol. 18, 267–277.

de Groot, A., Heijnen, I., de Cock, H., Filloux, A., Tommassen, J., 1994. Characterization of type IV pilus genes in plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358. J. Bacteriol. 176, 642–650.

de Groot, A., Krijger, J.J., Filloux, A., Tommassen, J., 1996. Characterization of type II protein secretion (xcp) genes in the plant growth-stimulating *Pseudomonas putida*, strain WCS358. Mol. Gen. Genet. 250, 491–504.

Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J., Bax, A., 1995. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. J. Biomol. NMR 6, 277–293.

Durand, E., Bernadac, A., Ball, G., Lazdunski, A., Sturgis, J.N., Filloux, A., 2003. Type II protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the pseudopilus is a multifibrillar and adhesive structure. J. Bacteriol. 185, 2749–2758.

Durand, E., Michel, G., Voulhoux, R., Kurner, J., Bernadac, A., Filloux, A., 2005. XcpX controls biogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* XcpT-containing pseudopilus. J. Biol. Chem. 280, 31378–31389.

Economou, A., Christie, P.J., Fernandez, R.C., Palmer, T., Plano, G.V., Pugsley, A.P., 2006. Secretion by numbers: protein traffic in prokaryotes. Mol. Microbiol. 62, 308–319.

Farrow, N.A., Muhandiram, D.R., Singer, A.U., Pascal, S.M., Kay, C.M., Gish, G., Shoelson, S.E., Pawson, T., Forman-Kay, J.D., Kay, L.E., 1994. Backbone dynamics of a free and a phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by ^{15}N NMR relaxation. Biochemistry 33, 5984–6003.

Filloux, A., 2004. The underlying mechanisms of type II protein secretion. Biochim. Biophys. Acta 1694, 163–179.

Fogh, R., Ionides, J., Ulrich, E., Boucher, W., Vranken, W., Linge, J.P., Habeck, M., Rieping, W., Bhat, T.N., Westbrook, J., Henrick, K., Gilliland, G., Berman, H., Thornton, J., Nilges, M., Markley, J., Laue, E., 2002. The CCPN project: an interim report on a data model for the NMR community. Nat. Struct. Biol. 9, 416–418.

Guntert, P., Mumenthaler, C., Wuthrich, K., 1997. Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. J. Mol. Biol. 273, 283–298.

Hansen, J.K., Forest, K.T., 2006. Type IV pilin structures: insights on shared architecture, fiber assembly, receptor binding and type II secretion. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 11, 192–207.

Herrmann, T., Guntert, P., Wuthrich, K., 2002. Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA. J. Mol. Biol. 319, 209–227.

Johnson, B.A., Blevins, R.A., 1994. NMR view – a computer-program for the visualization and analysis of NMR data. J. Biomol. NMR 4, 603–614.

Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., Madden, T.L., 2008. NCBI BLAST: a better web interface. Nucleic Acids Res. 36, W5–9.

Kohler, R., Schafer, K., Muller, S., Vignon, G., Diederichs, K., Philippsen, A., Ringler, P., Pugsley, A.P., Engel, A., Welte, W., 2004. Structure and assembly of the pseudopilin PulG. Mol. Microbiol. 54, 647–664.

Korotkov, K.V., Hol, W.G., 2008. Structure of the GspK–GspI–GspJ complex from the enterotoxigenic *Escherichia coli* type 2 secretion system. Nat. Struct. Mol. Biol. 15, 462–468.

Laskowski, R.A., Rullmannn, J.A., MacArthur, M.W., Kaptein, R., Thornton, J.M., 1996. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. J. Biomol. NMR 8, 477–486.

Linge, J.P., Williams, M.A., Spronk, C.A., Bonvin, A.M., Nilges, M., 2003. Refinement of protein structures in explicit solvent. Proteins 50, 496–506.

Mattick, J.S., 2002. Type IV pili and twitching motility. Annu. Rev. Microbiol. 56, 289–314.

Nabuurs, S.B., Nederveen, A.J., Vranken, W., Doreleijers, J.F., Bonvin, A.M., Vuister, G.W., Vriend, G., Spronk, C.A., 2004. DRESS: a database of refined solution NMR structures. Proteins 55, 483–486.

Nabuurs, S.B., Spronk, C.A., Krieger, E., Maassen, H., Vriend, G., Vuister, G.W., 2003. Quantitative evaluation of experimental NMR restraints. J. Am. Chem. Soc. 125, 12026–12034.

Nunn, D.N., Lory, S., 1993. Cleavage, methylation, and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* export proteins XcpT, -U, -V, and -W. J. Bacteriol. 175, 4375–4382.

Pelicic, V., 2008. Type IV pili: e pluribus unum? Mol. Microbiol. 68, 827–837.

Pruitt, K.D., Tatusova, T., Maglott, D.R., 2007. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. Nucleic Acids Res. 35, D61–65.

Sattler, M., Schleucher, J., Griesinger, C., 1999. Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. Prog. Nuclear Magnetic Resonance Spectrosc. 34, 93–158.

Schwieters, C.D., Kuszewski, J.J., Tjandra, N., Clore, G.M., 2003. The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package. J. Magn. Reson. 160, 65–73.

Vranken, W.F., Boucher, W., Stevens, T.J., Fogh, R.H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E.L., Markley, J.L., Ionides, J., Laue, E.D., 2005. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. Proteins 59, 687–696.

Vriend, G., 1990. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. J. Mol. Graph. (52–56), 29.

Walter, M.C., Rattei, T., Arnold, R., Guldener, U., Munsterkotter, M., Nenova, K., Kastenmuller, G., Tischler, P., Wolling, A., Volz, A., Pongratz, N., Jost, R., Mewes, H.W., Frishman, D., 2009. PEDANT covers all complete RefSeq genomes. Nucleic Acids Res. 37, D408–411.

Wolfgang, M., van Putten, J.P., Hayes, S.F., Dorward, D., Koomey, M., 2000. Components and dynamics of fiber formation define a ubiquitous biogenesis pathway for bacterial pili. Embo J. 19, 6408–6418.

Yanez, M.E., Korotkov, K.V., Abendroth, J., Hol, W.G., 2008. Structure of the minor pseudopilin EpsH from the Type 2 secretion system of *Vibrio cholerae*. J. Mol. Biol. 377, 91–103.

Chapitre II : Etude du réseau d'interaction entre les domaines périplasmiques des composants du sécréton Xcp et ses substrats :

vers une meilleure compréhension du mode de fonctionnement du sécréton (article 4)

Chez *P. aeruginosa*, le système de sécrétion de type II permet la libération, dans le milieu extracellulaire, de nombreuses exoprotéines dont l'élastase LasB et la lipase LipA. Les protéines secrétées par le sécréton Xcp traversent la membrane cytoplasmique par le système Sec ou Tat. Une fois replié, l'intermédiaire périplasmique est recruté puis transporté par le sécréton afin qu'il soit libéré dans le milieu extracellulaire. Le signal de sécrétion qui permet au sécréton de sélectionner spécifiquement les exoprotéines à secréter des autres protéines périplasmiques n'est toujours pas connu. Plusieurs travaux suggèrent cependant que ce signal soit de nature conformationnelle étant donné l'importance du repliement tridimensionnel dans la sécrétion et l'absence de motif linéaire au niveau des différents substrats.

Dans cette seconde partie de mes travaux de thèse, nous avons étendu l'étude *in vitro* systématique des interactions protéine-protéine à l'ensemble des domaines périplasmiques des composants du sécréton ainsi qu'aux substrats sécrétés. Pour cela, nous avons utilisé les techniques de BIAcore et de « *pull down* » qui se sont avérées très efficaces dans la caractérisation des réseaux d'interactions entre les pseudopilines (chapitre 1). Dans un premier temps, nous avons disséqué l'interaction entre les domaines périplasmiques de la sécrétine et de la protéine trans-périplasmique $XcpP_C$. Nous avons ainsi tenté d'identifier le ou les domaines impliqués dans cette interaction en testant différentes constructions de la sécrétine. Les résultats indiquent un rôle clé du domaine N3 puisque sa présence est nécessaire à l'interaction de la sécrétine avec $XcpP_C$, que ce soit pas BIAcore ou par « *pull-down* ». Ces résultats suggèrent donc que l'interaction de $XcpP_C$ avec la sécrétine se situe au voisinage de la membrane externe. Nos résultats ont montré également que la stœchiométrie du complexe $XcpP_C$-$XcpQ_D$ est de 1 :1. Ainsi, en tenant compte des études de microscopie électronique indiquant que le pore de sécrétion est formé par l'assemblage de 12 monomères de sécrétine, nous avons alors proposé que 12 $XcpP_C$ recouvrent la quasi-totalité de la partie périplasmique du sécréton.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'interaction des différents domaines périplasmiques des composants du sécréton Xcp avec les exoprotéines. Trois substrats du SST2 de *P. aeruginosa* ont été testés : l'élastase LasB et la lipase LipA du système

Xcp ainsi que la phosphatase alcaline LapA du système Hxc. Nous avons ainsi montré par BIAcore l'existence d'interactions spécifiques entre les 2 substrats Xcp et les composants périplasmiques du sécréton : la protéine trans-périplasmique $XcpP_C$, les domaines N0-N1 de la sécrétine et enfin le sommet du pseudopilus constitué des 4 pseudopilines mineures. La spécificité de ces interactions a été confirmé par l'absence d'interactions entre ces 3 composants et le substrat du SST2 Hxc : LapA. Toutes les interactions trouvées sont caractérisées par des K_{diss} de l'ordre du μM ce qui montre l'aspect transitoire de l'interaction entre le substrat et les composants du sécréton. Ces résultats sont en accord avec le processus de sécrétion durant lequel le substrat transite par le sécréton pour être finalement libéré.

En tenant compte de la position périphérique de $XcpP_C$, nous suggérons qu'elle joue le rôle de recruteur de la machinerie. Une fois reconnus par $XcpP_C$, les substrats seraient transférés au vestibule périplasmique du pore de sécrétion à travers leurs interactions avec les domaines N0-N1. Ensuite, nous proposons que le pseudopilus interagisse par son sommet avec les substrats localisés dans le vestibule afin de les expulser vers le milieu extracellulaire.

Ainsi, dans ce travail, grâce à la mise en évidence de nouvelles interactions entre le substrat et plusieurs composants périplasmiques du sécréton, nous proposons pour la première fois un modèle sur cheminement du substrat au cours du processus de sécrétion du SST2.

Article IV

Deciphering the Xcp *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion machinery through multiple interactions with substrates.

Douzi Badreddine, Ball Genevieve, Cambillau Christian, Tegoni Mariella *, and Voulhoux Romé *.

Soumis à ***J Biol Chem***.

Deciphering the Xcp *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion machinery through multiple interactions with substrates*

Badreddine Douzi[1,2], Geneviève Ball[1], Christian Cambillau[2], Mariella Tegoni[2] And Romé Voulhoux[1]

[1]From Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires (LISM-UPR9027), CNRS, Université de la Méditerranée, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille cedex 20, France
[2]Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques (AFMB-UMR6098), CNRS, Université de Provence et Université de la Méditerranée, Case 932, 163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille cedex 9, France.

*Running Title: Interaction network inside the T2SS

To whom correspondance should addressed: Romé Voulhoux, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires (LISM-UPR 9027), CNRS, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille cedex 20, France; Tel +33 4 91 16 41 26; Fax +33 4 91 71 21 24; E. mail: voulhoux@ifr88.cnrs-mrs.fr. Mariella Tegoni, Architecture et Fonction des Macromolecules Biologiques (AFMB-UMR6098), CNRS and Universités d'Aix-Marseille I and II, 13288 Marseille cedex 9, France; Tel: + 33 4 91 82 55 92; Fax: +33 4 91 26 67 20; Email : mariella.tegoni@afmb.univ-mrs.fr

Keywords: Type II secretion system, pseudopilins, secretin, exoproteins, interactome

Background: The type II secretion machinery secretes large toxins across the bacterial envelope.
Results: We identified multiple interactions between secreted exoproteins and components of the machinery.
Conclusion: We propose a model for substrate recognition and transport during the secretion process.
Significance: Our data shed lights on the operating mode of the type II secretion pathway and provide new potential targets for drug development.

SUMMARY

The type II secretion system (T2SS) enables Gram-negative bacteria to secrete exoproteins into the extracellular milieu. We performed biophysical and biochemical experiments to identify systematic interactions between *Pseudomonas aeruginosa* Xcp T2SS components and their substrates. We observed that three Xcp components: $XcpP_C$, the secretin $XcpQ_D$ and the pseudopilus tip directly and specifically interact with secreted exoproteins. We established that $XcpP_C$, in addition to its interaction with the substrate, likely shields the entire periplasmic portion of the secreton. It can therefore be considered as the recruiter of the machinery. Moreover, the direct interaction observed between the substrate and the pseudopilus-tip validates the piston model hypothesis, in which the pseudopilus pushes the substrate through the secretin pore during the secretion process. All together, our results allowed us to propose a model of the different consecutive steps followed by the substrate during the type II secretion process.

INTRODUCTION

Gram-negative bacteria have evolved different sophisticated secretory machines specialized for the secretion of specific categories of exoproteins (1). The type II secretion pathway is widely used by many Gram-negative bacteria for the secretion of major virulence factors in plants and animals (2). In this two-step secretion process, proteins are synthesized with a cleavable N-terminal signal sequence that enables their transport across the cytoplasmic membrane by the Sec or Tat general export machinery (3). After acquisition of their folds in the periplasm, type II secretion-dependent proteins are specifically recognized and loaded by a large macromolecular machine, the secreton, for their final release into the external milieu. The secreton spans the entire bacterial envelope and consists of at least 12 different Gsp proteins that are organized in three sub-complexes depending on their cellular localizations and mutual interactions (4).

The $GspE_R$, F_S, L_Y and M_L proteins (see Experimental Procedures) form the inner membrane (IM) platform, where the $GspE_R$ traffic ATPase provides energy for the system (5-8). The second sub-complex is called the pseudopilus, which is analogous to the pilus structure found in the type IV piliation system. The pseudopilus consists of five pseudopilins, all of which are subjected to maturation by the prepilin peptidase $GspO_A$, which is also involved in the maturation of the type IV pilins. The pseudopilus is formed by the helical assembly of the major pseudopilin $GspG_T$ (9) and it has a quaternary complex of the four minor pseudopilins at its tip (10,11). This structural similarity to the type IV piliation system suggests that the pseudopilus might also assemble on the IM platform in a pilus-like structure to push the substrate like a piston through the third sub-complex of the secreton, the secretin $GspD_Q$ (10-14).

Secretins form large, homo-multimeric pores in the outer membrane (OM). They are components of various secretion or assembly machines involved in the transport of large structures (15). Each secretin monomer has two domains: the conserved C-terminal domain forms the pore in the OM, and the N-terminal domain, which differs between transport systems and forms an extension of the pore cavity in the periplasm. The N-terminal domains of T2SS-secretins consist of four structurally independent sub-domains named N0 to N3 from the N to the C-terminus. Recently, Reichow *et al.* (12) have reported direct interactions between $GspD_Q$ and the substrate and between $GspD_Q$ and the pseudopilus. This important finding agrees with the secreton model, in which the pseudopilus interacts with the secretin containing the substrate, to push it through the pore. However, no evidence has been reported in the literature for a direct interaction between the pseudopilus and the substrate.

In different representations of the secreton, the connection between the IM platform and the OM secretin is mediated by $GspC_P$. This component is inserted into the IM platform by its N-terminal transmembrane helix and is connected to the secretin by its periplasmic domain on the other side (16,17).

T2SSs are prevalent among Gram-negative bacteria and are highly specific for their respective substrates. In *Pseudomonas aeruginosa*, two T2SSs co-exist, Xcp and Hxc, and each secretes a specific set of substrates (18).

In contrast to other secretory machines, such as type I, type III and type IV secretion systems, no secretion recognition signals have yet been identified for type II secretion. However, several studies have indicated the involvement of several non-adjacent regions in substrate recognition, thus suggesting the existence of a conformational secretion signal (19,20).

Notably, no interactions between substrates and secreton components other than the secretin have been so far reported. In this work we aimed at understanding two critical steps of the type II secretion process, the initial substrate recognition and its release after import inside the machinery. To do this we set up a systematic protein/protein interaction study between secreted substrates and different periplasmic components of the T2SS secreton. The multiple interactions identified made it possible to propose a model of substrate recruitment and transport during the type II secretion process.

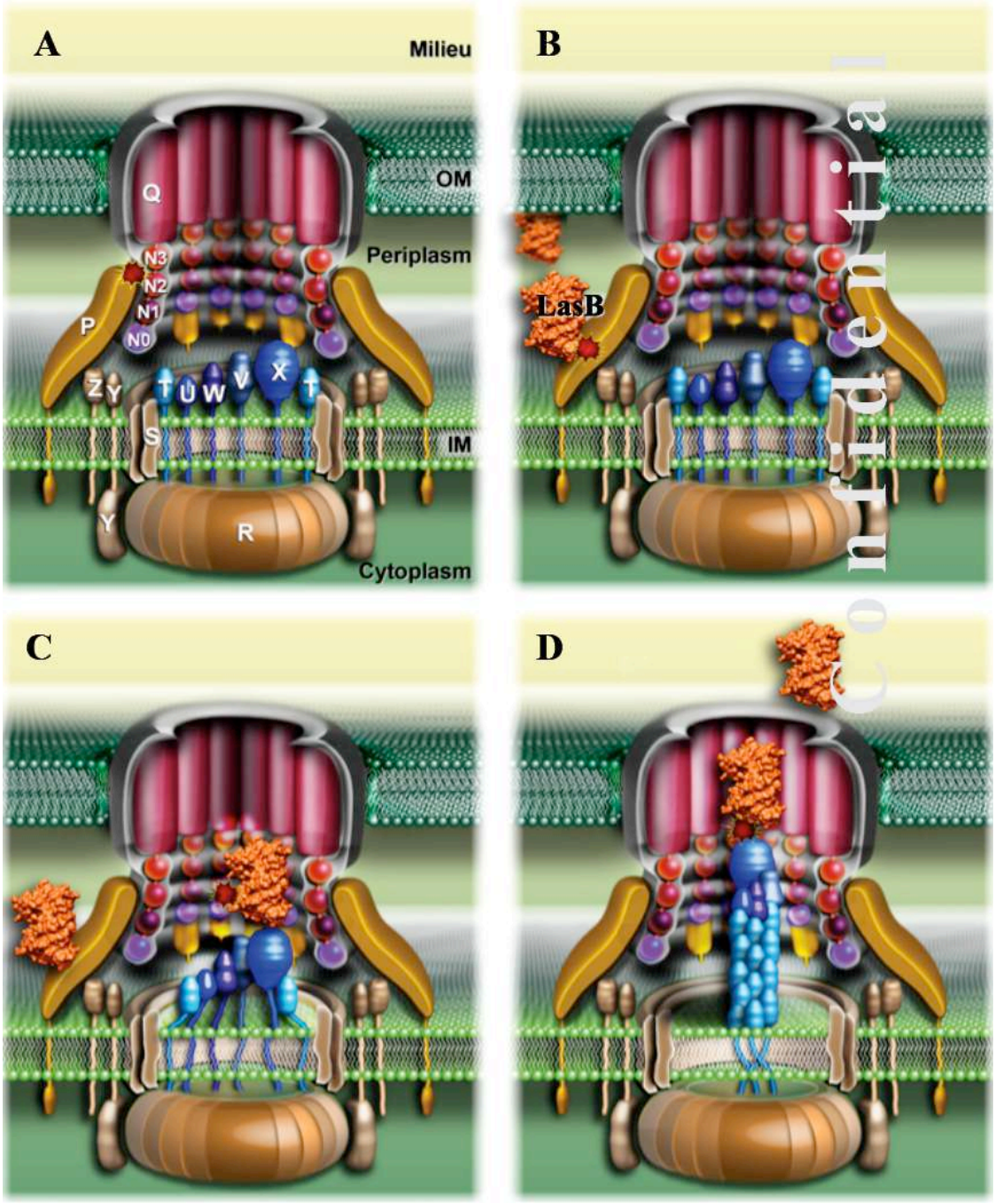


Fig. 1. Schematic three-dimensional model of the *P. aeruginosa* Xcp secreton showing substrate recognition and transport during the type II secretion process. The schematic representation of the *P. aeruginosa* Xcp secreton is presented in panel A. All Xcp components (labeled following Xcp nomenclature only) are represented according to their cellular localization, topology and multimerization state. Panels B, C and D illustrate the different consecutive steps followed by the substrate for its recruitment, transport and release by the secreton during the type II secretion process (see Discussion for details). The interactions identified in this study are represented by red asterisks.

		Analyte											
		Peri-P_C	Peri-Q_D			Pp body	Pp tip					Substrates (Xcp T2SS)	
		P_C	N^{0123}	N^{012}	N^{01}	T_G	$U_HW_JV_IX_K$	U_H	V_I	W_J	X_K	LasB	LipA
Bound ligand	$^{his}P_C$	-	3.6	-	-	-	-	-	-	-	-	3.6	6.8
	LasB (Xcp T2SS)	2.0	12.5	21.6	27.8	-	0.9	12.5	24.6	-	12.7	ND	ND
	LapA (Hxc T2SS)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND

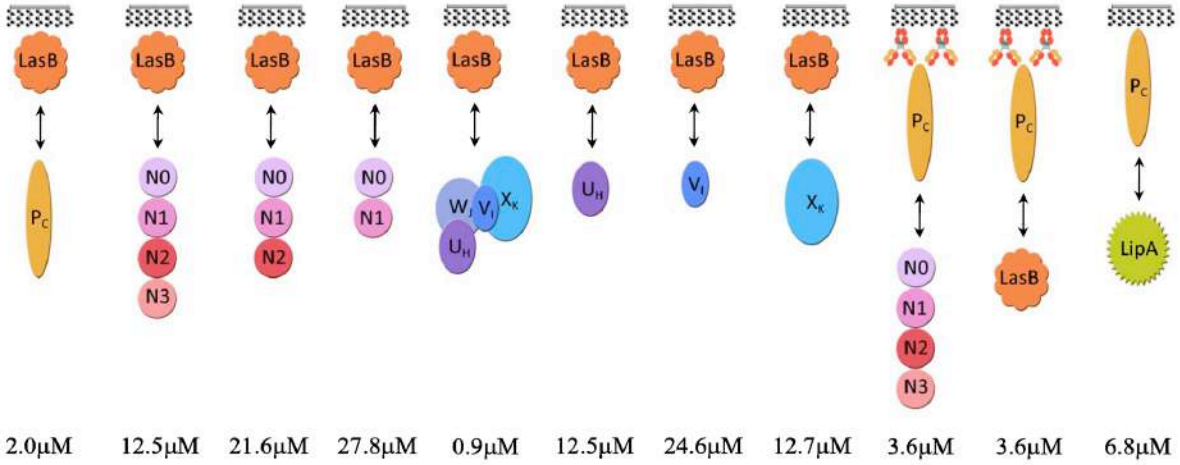


Fig. 2. Interaction network between the periplasmic domains of the *P. aeruginosa* Xcp secreton and substrates by SPR. Ligand and analytes are indicated following the code used in the text. Positive interactions are indicated by black boxes, in which the Kdiss values (µM) of the interactions are indicated. Grey boxes with (-) indicate that no interaction was detected. The schemes for all positive interactions are represented below the table and follow the color code used in Figure 1. Pp: Pseudopilus; ND: not determined.

RESULTS

$XcpP_C$ is the peripheral periplasmic element of the secreton. $XcpP_C$ is a central constituent of the Xcp T2SS. This IM protein possesses a large periplasmic domain, which directly interacts with the OM component of the machinery, the secretin $XcpQ_D$ (16,17) (Fig. 1A). To identify secretin domains as well as other secreton components that interact with the periplasmic part of $XcpP_C$, we systematically assayed *in vitro* interactions between the periplasmic soluble domains of $XcpP_C$ (P_C) and various periplasmic domains of secreton components. To this end, three variants of secretin soluble domains (Q_D) and the five pseudopilin soluble domains (T_G, U_H, V_I, W_J and X_K) were engineered, produced and purified in the mM range (see Experimental Procedures). Then, using two complementary techniques, affinity chromatography and Surface Plasmon Resonance (SPR), we systematically tested *in vitro* protein/protein interactions using a C-terminal His-tagged P_C ($^{his}P_C$). As expected, we confirmed the interaction between P_C and Q_D (Figs. 2, 3A and 3B). Moreover, to more precisely identify the Q_D sub-domains involved in this interaction, we constructed and tested two other truncated versions lacking N3 (Q_D-N^{012}) and the N3-N2 sub-domain(s) (Q_D-N^{01}), in addition to the peri-

$XcpQ_D$-N^{0123} (Q_D or Q_D-N^{0123}). Both SPR and pull-down experiments indicated that the N3 sub-domain of Q_D was necessary for the interaction with P_C because Q_D-N^{012} lost its capacity to bind P_C (Figs. 2, 3C and 3D). This result suggests that P_C covers the whole periplasmic space: at one end, $XcpP_C$ is anchored into the IM, and at the other end, it interacts with N3, the closest OM secretin periplasmic sub-domain (Fig. 1A) (15). Further experiments indicate that purified P_C and Q_D are monomeric in solution and interact in a 1:1 ratio (Fig. S2). Based on recent cryo-electron microscopy data revealing an internal diameter of the dodecameric periplasmic secretin cavity of 55 Å (12), the binding of 12 P_C inside the Q_D cavity is structurally not feasible; therefore, it could only take place on the external face of the secretin pore. Consequently, we propose that 12 P_C subunits form a dodecameric coat around the periplasmic portion of the secreton (See model, Fig. 1A).

Interestingly, we could not detect any interactions between P_C and the pseudopilin soluble domains, either individually or as assembled in the quaternary pseudopilus tip complex, in either SPR or pull-down experiments (Figs. 2 and 3E). The absence of any interaction between P_C and the pseudopilus components indicates that P_C is physically separated from the pseudopilus. This result is in agreement with the secreton model, which presents the pseudopilus inside the secretin cavity (Fig. 1A) (15).

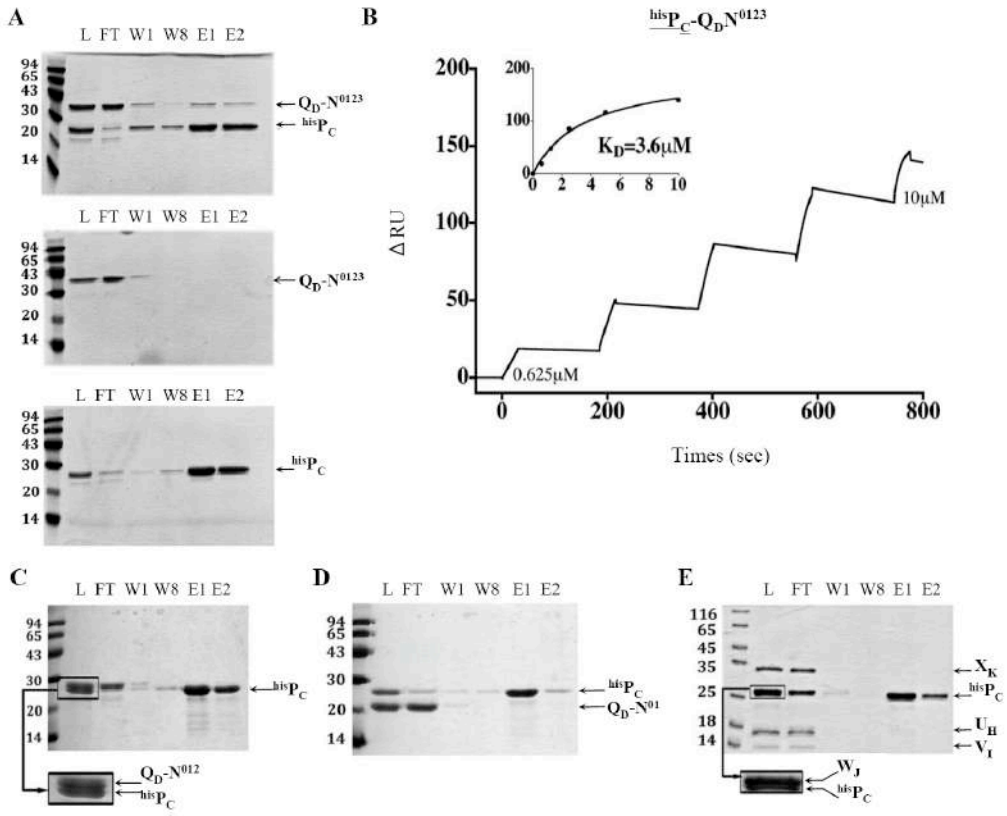


Fig. 3. P_C-Q_D interaction identified by affinity chromatography and SPR experiments. Batch co-purification of P_C and Q_D presented panel A were performed on affinity columns. $^{his}P_C$ and Q_D-N^{0123} were mixed (upper panel) or loaded individually (lower panels) on a SDS-PAGE. Fraction L, FT, W and E respectively contains loaded protein, the flow-through, the washes and the eluates. The positions of the molecular mass markers are indicated on the left side of each gel (kDa). The SPR "sensorgram" of the positive interaction found between $^{his}P_C$ (bound ligand, underlined) and Q_D-N^{0123} (analyte) is presented panels B (see Experimental Procedures for details). Panels C, D and E respectively present batch co-purification experiments of $^{his}P_C$ and Q_D-N^{012}; $^{his}P_C$ and Q_D-N^{01} and $^{his}P_C$ and minor pseudopilin soluble domains U_H, V_I, W_J and X_K on affinity column.

Xcp substrates first interact with XcpP$_C$- Elastase LasB is the most abundant protein secreted by the *P. aeruginosa* Xcp T2SS. The interaction between LasB and P$_C$ was analyzed by SPR. LasB was covalently immobilized on a CM5 chip, and SPR experiments revealed a specific interaction between LasB and P$_C$ (Figs. 1B, 2 and 4A). This newly described direct interaction between a substrate and one component of the secreton was confirmed by the reciprocal SPR experiment, in which ^{his}P$_C$ was fixed to an anti-penta-His antibody covalently linked to a CM5 chip. Purified LasB was passed over ^{his}P$_C$ and showed a significant affinity for it (Figs. 2 and 4B). The physiological relevance of such a P$_C$/substrate interaction during type II secretion is strengthened based on the positive interaction between P$_C$ and a second Xcp substrate, the lipase LipA (Figs. 2 and 4C). Furthermore, no interaction could be detected between P$_C$ and the alkaline phosphatase LapA, an exoprotein specifically secreted by the second *P. aeruginosa* T2SS system, Hxc (Fig. 2). This important result, which confirms the specificity of the interactions between P$_C$ and Xcp-T2SS substrates, also validates the physiological relevance of our *in vitro* results.
Considering that XcpP$_C$ forms the external wall of the periplasmic portion of the secreton, we propose that it is the first component of the secreton to bind the substrate, and therefore, that XcpP$_C$ is the recruiter of the system (Fig. 1B).

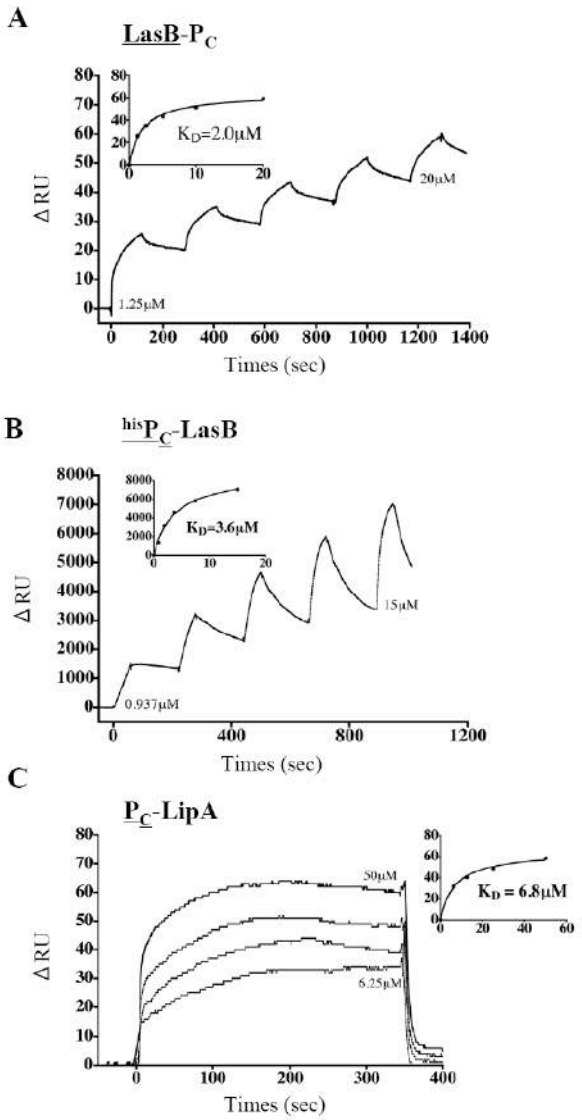


Fig. 4. P$_C$-substrates interactions identified by SPR. The SPR "sensorgrams" of the positive interactions found between LasB and P$_C$, ^{his}P$_C$ and LasB and ^{his}P$_C$ and LipA are presented in panels A, B, and C, respectively (see Experimental Procedures for details). For each interaction experiment, the bound ligand is underlined.

LasB binds the N0N1 secretin sub-domains- Once recruited by $XcpP_C$ the substrate is probably imported inside the machinery where it should interact with several secreton components. One of these components is likely the partner of $XcpP_C$: the periplasmic soluble domain of the secretin. Using LasB covalently linked to a CM5 chip, we employed SPR to analyze the interactions between substrate and the four different periplasmic sub-domains of the OM secretin. We passed Q_D-N^{0123}, Q_D-N^{012} and Q_D-N^{01} over LasB and found similar affinities for the three Q_D sub-domains, indicating that the LasB interacting domain on Q_D belongs to the two N0N1 sub-domains (Figs. 1C, 2 and 5). This result, together with the previous identified interaction of P_C/Q_D with the N3 sub-domain, indicates that two different interaction sites exist on Q_D: one for P_C and another for LasB (Fig. 1A and 1C). Moreover and in line with the substrate specificity, no interaction was detected between secretin sub-domains and the Hxc-T2SS substrate LapA (Fig. 2).

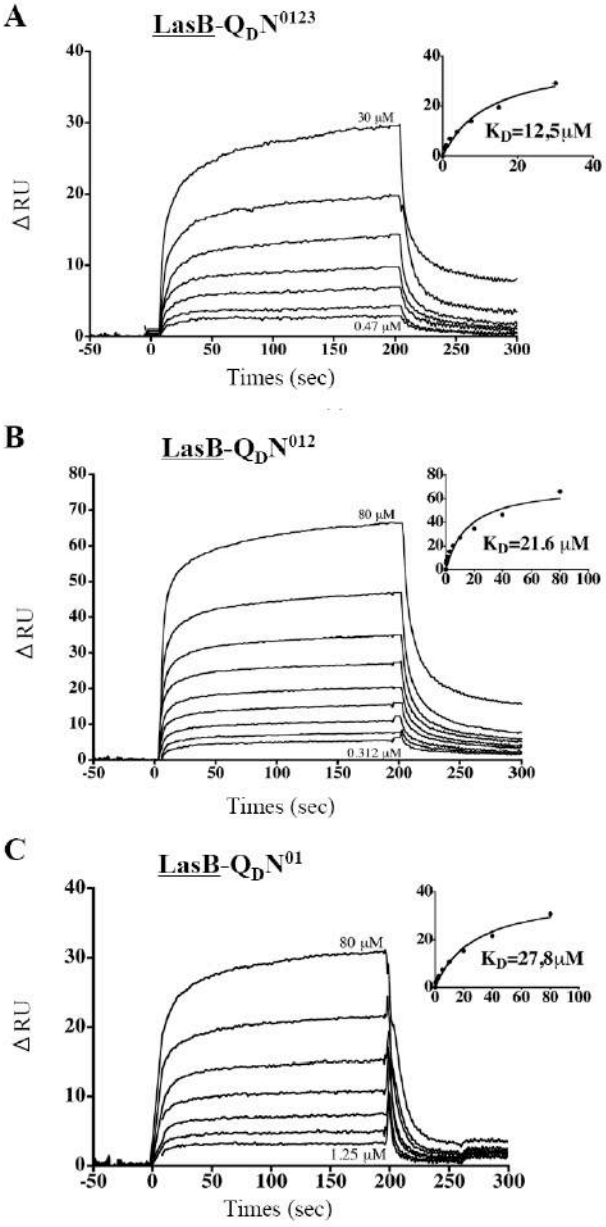


Fig. 5. LasB-Q_D interactions identified by SPR. The SPR "sensorgrams" of the positive interactions found between LasB (bound ligand, underlined) and Q_D-N^{0123}, Q_D-N^{012} and Q_D-N^{01} are presented in panels A, B, and C, respectively (see Experimental Procedures for details).

LasB interacts with the pseudopilus tip- Interaction with the secretin does not explain how the substrate could be release by the machinery. It could be hypothesized that interaction with the secretin presents the substrate for expulsion by the growing pseudopilus. Using LasB immobilized on a CM5 chip, we measured its affinity for the five pseudopilins, either in a complex or individually. Our data revealed a direct interaction between the substrate and the quaternary complex of minor pseudopilins located at the tip of the pseudopilus (Figs. 1D, 2 and 6). Individual interactions between pseudopilins and LasB indicated that three of the four minor pseudopilin soluble domains, U_H, V_I and X_K, interacted with the substrate, whereas W_J did not show any significant binding (Figs. 2 and 6). Together with the recent SPR-identified interaction between the pseudopilus tip and the periplasmic domain of the secretin (12), our findings validate the piston model, in which the substrate, located in the secretin vestibule, is expelled out of the cell by the growing pseudopilus through the secretin pore.

Interestingly, no interaction was established between the substrate and the major pseudopilin soluble domain, T_G (Fig. 2), suggesting that only the tip, and not the pseudopilus body, binds the substrate during the secretion process. This finding is in agreement with previous findings indicating that major pseudopilins could be exchanged among T2SSs without affecting their substrate specificity (23). Noteworthy, no binding of any Xcp pseudopilins was observed when LapA was immobilized on the chip (Fig. 2).

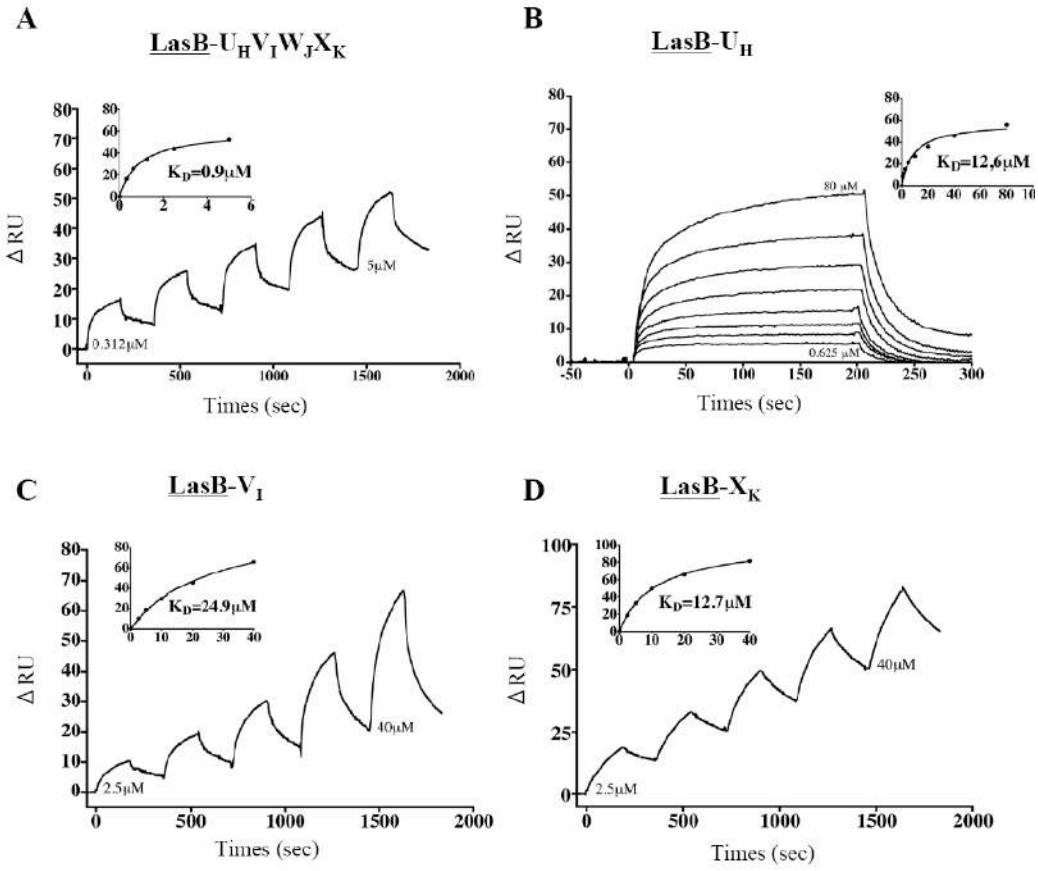


Fig. 6. LasB-pseudopilins interactions identified by SPR. The SPR "sensorgrams" of the positive interactions found between LasB (bound ligand, underlined) and the U_H-V_I-W_J-X_K complex, U_H, V_I and X_K are presented in panels A, B, C and D respectively (see Experimental Procedures for details).

DISCUSSION

In the actual representation of the T2SS, the OM secretin is linked to the IM platform via its interaction with $GspC_P$, and the pseudopilus acts as a piston to push the substrate out through the secretin pore (4,15,24-28). This model, and more particularly the substrate recognition and transport mechanism, was very speculative since no interactions between the substrates and the components of the T2SS other than the secretin have been reported. In this study, we used SPR to identify several unprecedented specific interactions between secreted substrates and secreton components in the *P. aeruginosa* Xcp T2SS. For all of the substrate/secreton interactions tested the estimated K_{diss} values were found in the micromolar range (Fig. 2). Such weak interactions suggest a transient stay of the substrate in the secreton during the secretion process.

All together, our results allowed us to propose a sequential model for substrate recognition and secretion by the T2SS (Fig. 1). In this model, we show that $XcpP_C$ bridges the inner and outer membrane elements of the machinery and probably envelopes the whole periplasmic part of the secreton (Fig. 1A). Thanks to the multiple specific interactions found between secreted substrates and secreton components, we propose that the exported exoproteins: i) are initially recruited in the periplasm by the $XcpP_C$ (Fig. 1B), ii) move into the periplasmic vestibule of the secretin (Fig. 1C) and iii) are further pushed through the pore by the pseudopilus elongating from the IM platform (Fig. 1D). Finally, iv) the pseudopilus retracts, allowing the positioning of a new substrate in the secretin vestibule for the next secretion cycle.

Two independent studies (16,17) have shown that $GspC_P$ interacts with $GspD_Q$. Although none of these studies exclude the involvement of the $GspD_Q$ N3 sub-domain, they clearly show that other $GspD_Q$ sub-domains interact with $GspC_P$. In our case, Q_D-N^{012} is incapable of binding P_C, whereas it is capable of binding substrates. This discrepancy could be due to subtle mechanistic differences between T2SSs, reflected by the low homology among $GspC_P$ components. On the $GspC_P$ side, Korotkov et al. (16) and Login et al. (17) agreed that $GspC_P$ bound $GspD_Q$ through one specific domain, the Homology Region (HR) (29). Notably, the $XcpP_C$ HR is not involved in substrate binding, according to Gerard-Vincent et al. (29), who showed that an $XcpP_C$ variant harboring the HR of the *E. chrisanthemi* $OutC_P$ homolog was still able to secrete LasB from *P. aeruginosa*. In the same study, it was shown that an $XcpP_C$ variant containing the *Erwinia* $OutC_P$ TMHR located just upstream of the HR was non-functional, thus suggesting that specific substrate recognition by $GspC_P$ might implicate the TMHR. Interestingly, the TMHR is located right after the $XcpP_C$ trans-membrane domain. We therefore suggest that newly periplasmic exported substrates might enter the secreton from its periplasmic base because they successively interact with $XcpP_C$ and N0N1 secretin sub-domains located in the vicinity of the inner membrane.

The specific direct interactions identified between folded exoproteins and the five Xcp components provide important information about machinery/substrate recognition. Our findings indeed suggest that the secretion signal is located on the fully active native protein, and not on an intermediate state of folding or on a dedicated periplasmic chaperone, notably the elastase propeptide and the lipase foldase (4). Our data also confirm the conformational nature of the secretion signal, because there are no common linear motifs on the thirteen mature Xcp secreted proteins. Future studies will try to identify the LasB and LipA motif(s) specifically involved in their recruitment by $XcpP_C$ and subsequent interactions with the secretin and the pseudopilus.

In our secretion model, stoechiometric data presented figure S1 indicates that 12 molecules of $XcpP_C$ surround the periplasmic portion of the secreton through twelve P_C/Q_D heterodimeric interactions (Fig. 1A). This organization suggests that the secreton component

initially contacted by the secreted proteins is $XcpP_C$. We found support for this hypothesis by identifying a direct interaction between $XcpP_C$ and two secreted proteins. Such a function for $XcpP_C$ in substrate recruitment and substrate specificity are in agreement with the low level of conservation among $GspC_P$ homologs in type II secretion machineries.

In our model, we propose that, after recruitment by $XcpP_C$, the substrate first enters into the secretin vestibule in a position that allows it to be subsequently pushed by the pseudopilus growing from the IM platform. Notably, the binding of substrate to the pseudopilus prior to the secretin is unlikely because substrate has been visualized inside the secretin vestibule in the absence of the pseudopilus (30).

In conclusion, we identified in this study subtle, specific and likely transitory interactions between T2SS-secreted exoproteins and the transport machinery. Collectively, our results provide an improved understanding of two important steps of the secretion process: substrate recognition and transport by the machinery. We propose an improved model of the type II secretion process, opening new routes for academic investigation and for antimicrobial targeting utilizing organic disruptors (31).

FOOTNOTES

This work was supported by "3D-Pilus" Young Researcher ANR Grant ANR-JC07-183230.
We thank Christophe Quétard (GE Healthcare) for his careful advices on SPR experiments, Sawsan Amara for assistance in lipase activity assays, Sophie Bleves, Alain Filloux and Tâm Mignot for important and valuable discussions and Yves-Michel Cully for figure 1 preparation.

REFERENCES

1. Economou, A., Christie, P. J., Fernandez, R. C., Palmer, T., Plano, G. V., and Pugsley, A. P. (2006) *Mol Microbiol* **62**(2), 308-319
2. Cianciotto, N. P. (2005) *Trends Microbiol* **13**(12), 581-588
3. Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M. L., Lazdunski, A., Wu, L. F., and Filloux, A. (2001) *Embo J* **20**(23), 6735-6741
4. Filloux, A. (2004) *Biochim Biophys Acta* **1694**(1-3), 163-179
5. Patrick, M., Korotkov, K. V., Hol, W. G., and Sandkvist, M. (2011) *J Biol Chem* **286**(12), 10378-10386
6. Py, B., Loiseau, L., and Barras, F. (2001) *EMBO Rep* **2**(3), 244-248
7. Chen, Y., Shiue, S. J., Huang, C. W., Chang, J. L., Chien, Y. L., Hu, N. T., and Chan, N. L. (2005) *J Biol Chem* **280**(51), 42356-42363
8. Abendroth, J., Bagdasarian, M., Sandkvist, M., and Hol, W. G. (2004) *J Mol Biol* **344**(3), 619-633
9. Campos, M., Nilges, M., Cisneros, D. A., and Francetic, O. (2010) *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(29), 13081-13086
10. Douzi, B., Durand, E., Bernard, C., Alphonse, S., Cambillau, C., Filloux, A., Tegoni, M., and Voulhoux, R. (2009) *J Biol Chem* **284**(50), 34580-34589
11. Korotkov, K. V., and Hol, W. G. (2008) *Nat Struct Mol Biol* **15**(5), 462-468
12. Reichow, S. L., Korotkov, K. V., Hol, W. G., and Gonen, T. (2010) *Nat Struct Mol Biol* **17**(10), 1226-1232
13. Sauvonnet, N., Gounon, P., and Pugsley, A. P. (2000) *J Bacteriol* **182**(3), 848-854
14. Hu, N. T., Leu, W. M., Lee, M. S., Chen, A., Chen, S. C., Song, Y. L., and Chen, L. Y. (2002) *Biochem J* **365**(Pt 1), 205-211
15. Korotkov, K. V., Gonen, T., and Hol, W. G. (2011) *Trends Biochem Sci* **36**(8):433-43
16. Korotkov, K. V., Krumm, B., Bagdasarian, M., and Hol, W. G. (2006) *J Mol Biol* **363**(2), 311-321
17. Login, F. H., Fries, M., Wang, X., Pickersgill, R. W., and Shevchik, V. E. (2011) *Mol Microbiol* **76**(4), 944-955
18. Ball, G., Durand, E., Lazdunski, A., and Filloux, A. (2002) *Mol Microbiol* **43**(2), 475-485
19. Voulhoux, R., Taupiac, M. P., Czjzek, M., Beaumelle, B., and Filloux, A. (2000) *J Bacteriol* **182**(14), 4051-4058
20. Sauvonnet, N., and Pugsley, A. P. (1996) *Mol Microbiol* **22**(1), 1-7
21. Stuer, W., Jaeger, K. E., and Winkler, U. K. (1986) *J Bacteriol* **168**(3), 1070-1074
22. Rich, R. L., Hoth, L. R., Geoghegan, K. F., Brown, T. A., LeMotte, P. K., Simons, S. P., Hensley, P., and Myszka, D. G. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(13), 8562-8567
23. Vignon, G., Kohler, R., Larquet, E., Giroux, S., Prevost, M. C., Roux, P., and Pugsley, A. P. (2003) *J Bacteriol* **185**(11), 3416-3428

24. Filloux, A., Michel, G., and Bally, M. (1998) *FEMS Microbiol Rev* **22**(3), 177-198
25. Nunn, D. (1999) *Trends Cell Biol* **9**(10), 402-408
26. Sandkvist, M. (2001) *Mol Microbiol* **40**(2), 271-283
27. Johnson, T. L., Abendroth, J., Hol, W. G., and Sandkvist, M. (2006) *FEMS Microbiol Lett* **255**(2), 175-186
28. Cianciotto, N. P. (2009) *Future Microbiol* **4**(7), 797-805
29. Gerard-Vincent, M., Robert, V., Ball, G., Bleves, S., Michel, G. P., Lazdunski, A., and Filloux, A. (2002) *Mol Microbiol* **44**(6), 1651-1665
30. Reichow, S. L., Korotkov, K. V., Gonen, M., Sun, J., Delarosa, J. R., Hol, W. G., and Gonen, T. (2011) *Channels (Austin)* **5**(3),
31. Shahian, T., Lee, G. M., Lazic, A., Arnold, L. A., Velusamy, P., Roels, C. M., Guy, R. K., and Craik, C. S. (2009) *Nat Chem Biol* **5**(9), 640-646

Supplemental Experimental Procedures

Cloning, expression and purification of untagged P_C, Q_D-N^{0123}, Q_D-N^{012} and Q_D-N^{01}. The DNA sequence encoding non tagged P_C (starting at the Arginine 57 to Aspartate 235), Q_D-N^{0123} (starting at the Glutamate 35 to Alanine 335), Q_D-N^{012} (starting at the Glutamate 35 to Proline 275) and Q_D-N^{01}) (starting at the Glutamate 35 to Histidine 208) was cloned into the Gateway pETG-20a expression vector leading respectively to plasmid pETG-20a-P_C, pETG-20a-Q_D-N^{0123}, pETG-20a-Q_D-N^{012} and pETG-20a- Q_D-N^{01}; a his6-tag encoding DNA and the sequence encoding for a TEV protease cleavage site were inserted in frame between the *attB1* and the sequence encoding P_C and Q_D-N^{0123}, Q_D-N^{012} and Q_D-N^{01} (see table S1 for vectors and plasmids list). Primers (P_C, Q_D-N^{0123}, Q_D-N^{012} and Q_D-N^{01}-Forward and P_C, Q_D-N^{0123}, Q_D-N^{012} and Q_D-N^{01}-Reverse) used for amplification are shown in table S2. *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen) cells were transformed with pETG-20a-P_C, pETG-20a-Q_D-N^{0123}, pETG-20a-Q_D-N^{012} and pETG-20a- Q_D-N^{01}. Precultures grown on Luria Broth at 37°C were used to start the culture (OD_{600}= 0.4) at 37 °C in TB medium. At OD_{600}=0.8 the temperature was decreased to 25°C and the cells were cultivated for 18 hours. Ampicillin 100 µg/ml and Cloramphenicol 35 µg/ml were present continuously during expression. The purification of P_C, Q_D-N^{0123}, Q_D-N^{012} and Q_D-N^{01} started by a cell lysis step performed at 4°C. Cells were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mg/ml lysozyme, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)), submitted to three freeze-thawing cycles and sonicated after the addition of DNase at 20 µg/ml and $MgCl_2$ at 20 mM. Pellet and soluble fractions were separated by centrifugation for 30 min at 16099 g. Soluble fractions containing P_C, Q_D-N^{0123}, Q_D-N^{012} and Q_D-N^{01} were: 1) dialyzed against 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0, 2) loaded on a Nickel (HisTrap™ FF crude Column 1.6 × 2.5 cm (5 ml)) on ÄKTA Express (Amersham Biosciences) pre-equilibrated in 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, pH 8.0, 3) eluted by washing with 50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8.0 in the presence of 250 mM Imidazole, 4) desalted on HiPrep 26/10 Desalting column (SephadexTM G-25, Amersham Biosciences), 5) cleaved by the TEV protease 1mg/ml (4°C, 18 hours), 6) loaded on a Nickel column pre-equilibrated in 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, pH 8.0, which selectively retard both the TEV and the fusion protein which are still his6-tagged. The untagged proteins (P_C, Q_D-N^{0123}, Q_D-N^{012} and Q_D-N^{01}) were collected in the flow-through and concentrated on Centricon, cutoff 3 kDa. After concentration, the proteins were purified on a Sephadex G75 equilibrated in 50 mM Phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.

Cloning, expression and purification of the his6-tagged P_C ($^{His}P_C$). The DNA sequence encoding for his6-tagged periplasmic domain of XcpP_C ($^{his}P_C$) was cloned into the Gateway pDEST-17 expression vector leading to plasmid pDEST-17-$^{his}P_C$ (see table S1 for vectors and plasmids list). *E. coli* BL21 (DE3) pLys S (Invitrogen) cells were transformed with pDEST-17-$^{his}P_C$. Precultures grown on Luria Broth at 37°C were used to start the culture (OD_{600}= 0.4) at 37 °C in TB medium. At OD_{600}=0.8 the temperature was decreased to 25°C and the cells were let grow for 18 hours. Ampicillin 100 µg/ml and Cloramphenicol 35 µg/ml were present continuously during expression. The purification of $^{his}P_C$ started by a cell lysis step performed at 4°C. Cells were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mg/ml lysozyme, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)), submitted to three freeze-thawing cycles and sonicated after the addition of DNase at 20 µg/ml and $MgCl_2$ at 20 mM. Pellet and soluble fraction were separated by centrifugation for 30 min at 16099 g. Soluble fractions containing $^{his}P_C$ were: 1) dialyzed against 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0, 2) loaded on a Nickel (HisTrap™ FF crude Column 1.6 × 2.5 cm (5 ml)) on ÄKTA Express (Amersham Biosciences) pre-equilibrated in 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, pH 8.0, 3) eluted by washing with 50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8.0 in the presence of 250 mM Imidazole, 4) The his6-tagged $^{his}P_C$ in the eluted fractions were concentrated on Centricon, cutoff 3 kDa and passed through a Sephadex G75 equilibrated in 50 mM Phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.
The final concentration of the proteins was calculated on the value of OD_{280nm}, by using the following extinction coefficients found by ProtParam (P_C 19355 $(mg/ml)^{-1}$, Q_D-N^{0123} 34582 $(mg/ml)^{-1}$, Q_D-N^{012} 25809 $(mg/ml)^{-1}$ and Q_D-N^{01} 18676 $(mg/ml)^{-1}$, $^{his}P_C$ 22729 $(mg/ml)^{-1}$. Yields were 8, 7, 8, 15, 20 mg/L for P_C, Q_D-N^{0123}, Q_D-N^{012}, Q_D-N^{01}, $^{his}P_C$, respectively evaluated by NanoDrop (Thermo Scientific).

Mass and stoechiometry calculation of XcpP-XcpQ complex. We characterized the mass of each soluble domain of $^{his}P_C$ and Q_D using the combination of UV spectrophotometry, MALS and refractometry, coupled on line with an analytical SEC column and we determined the hydrodynamic radii using an online QELS. UV, MALS, QELS and refractometry measurements were achieved with a Photo Diode Array 2996 (Waters), a MiniDawn Treos (Wyatt technology), a DynaPro (Wyatt technology) and an Optilab rEX (Wyatt technology), respectively. Mass and hydrodynamic radius calculations were performed the with ASTRA software (Wyatt Technology) using a *dn/dc* value of 0.185 mL/g. The column used was a 15 mL KW-804 (Shodex) with at 0.25 mL min^{-1} flow, on an Alliance HPLC 2695 system (Waters). The buffer was Tris 50 mM pH 7.5, 150 mM NaCl. 50 µL (KW-804) of each protein sample at 5 mg/mL in Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.5 were injected in each experiment. To estimate the stoechiometry of the complex P_C-Q_D ^{his}Pc and Q_D were copurified using Nikel affinity. Elution fractions were concentrated on Centricon with a 30 kDa cutoff and passed through a Sephadex 75 16/60 (GE Healthcare) equilibrated in 50 mM Phosphate, 150 mM NaCl, pH 7. The Sephadex G75 was calibrated using the Gel Filtration Calibration Kit LMW (GE Healthcare). The Ribonuclease A (13.7 kDa), Ovalbumin (43 kDa) and Conalbumin (75 kDa) were used as standard proteins to estimate the molecular weight of the P_C-Q_D complex.

Batch co-purification (pull-down) of $^{his}P_C$ and Q_D-N^{0123}, Q_D-N^{012}, Q_D-N^{01} and quaternary complex U_H-V_I-W_J-X_K periplasmic domains. We used the $^{his}P_C$ periplasmic domain as bait. All experiments were performed at 4°C. In reaction mixture 1 (RM1), $^{his}P_C$ was incubated in 1 ml of Equilibration Buffer (EqB) (50 mM TrisHCl/pH 8; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazole) with 200 µl of 5% Ni-NTA magnetic bead solution (Qiagen) pre-equilibrated in EqB. In reaction mixture 2 (RM2), the untagged partners were incubated in 1 ml of EqB. Both RM1 and RM2 were placed on a rotary shaker and gently mixed for 1 hour. RM1 was placed on a magnet for 1 min to collect the magnetic beads. The flow-through (FT) was discarded, and the magnetic-beads were rinsed twice with 500 µl of EqB (W1 and W2), including a 1 min mix on the rotary shaker and a 1 min recovery on the magnet after each wash. Then, RM2 was mixed with the ^{his}N-coated magnetic beads from RM1 and gently mixed on the rotary shaker for 1 hour. After a 1 min catch on the magnet, the flow-through (FT) was discarded, and the magnetic beads were washed with 500 µl of wash buffer (WB) (50 mM TrisHCl/pH 8, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole) height times (W1-W8), including a 1 min mix on the rotary shaker and a 1 min catch on the magnet for each wash. Proteins specifically bound to the magnetic beads were then eluted with 100 µl of elution buffer (EB) (50 mM TrisHCl/pH 8; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazole) two times (E1-E2), including a 1 min mix on the rotary shaker, a spin at 8734 x g to pellet the beads and a 1 min catch on the magnet for each elution. To analyze each fraction, 18 µl of each protein sample was mixed with 6 µl of 4X SDS-loading buffer. The 24 µl samples were boiled for 10 min and then loaded and run on a 15% SDS-PAGE gel as described in (1). After electrophoresis, gels were stained with Coomassie Blue. For the co-purification experiment, we used 100 µg of $^{his}P_C$, 95 µg of Q_D-N^{0123}, Q_D-N^{012} and Q_D-N^{01} and 90 µg of the U_H-V_I-W_J-X_K quaternary complex.

Conclusions & Perspectives

Conclusions & Perspectives

Les bactéries à Gram-négatif ont développées des machineries de sécrétion sophistiqués qui permettent le transport des protéines dans le milieu extracellulaire afin d'assurer leur survis dans différents écosystèmes. Au cours des 30 dernières années, ces machineries de sécrétions ont été le sujet de nombreuses études dans le but de disséquer leurs modes de fonctionnement. Dans notre laboratoire de recherche, *P. aeruginosa* a été choisie dès 1984 comme un modèle de choix pour l'étude des systèmes de sécrétion puisqu'elle abrite 5 des 6 systèmes de sécrétion identifiés à nos jours. Parmi ces machineries, le SST2 est un des systèmes les plus complexes. De plus, il est largement impliqué dans la pathogénicité de *P. aeruginosa* parce qu'il sécrète dans l'environnement extracellulaire un arsenal de toxines et d'enzymes dégradatives. Dans la voie de sécrétion de type II, les exoprotéines franchissent la membrane cytoplasmique grâce aux systèmes Sec et Tat. Une fois dans le périplasme, ces exoprotéines sont spécifiquement reconnues par un large complexe protéique membranaire appelé le sécréton Xcp qui permet ensuite leur expulsion vers le milieu extracellulaire.

Dans le premier chapitre des résultats de ma thèse, nous avons étudié sur un plan structural et biochimique les pseudopilines du sécréton Xcp de *P. aeruginosa*. La détermination de la structure du domaine soluble de la pseudopiline majeure $XcpT_G$ nous a révélé que cette protéine partage le repliement « classique » des pilines et pseudopilines majeures. En effet, elle est constituée d'une hélice α N-terminale hydrophobe, suivie d'un domaine variable peu structuré et d'un feuillet β C-terminal. Ce résultat suggère que le pseudopilus du sécréton Xcp partage un mode d'assemblage similaire à celui des pili du SPT4 basé sur l'association des pilines majeures via leurs hélices α N-terminales formant ainsi une longue fibre hélicoïdale. Cette hypothèse est fortement soutenue par i) la formation d'un HPP extracellulaire lors de la surproduction de $XcpT_G$ chez *P. aeruginosa* (Durand *et al.*, 2003), ii) les études structurales du pseudopilus de *K. oxytoca* qui ont confirmé la ressemblance du mode d'assemblage entre le pilus et le pseudopilus (Campos *et al.*, 2010b).

En plus de la pseudopiline majeure $XcpT_G$, le sécréton Xcp contient également les quatre pseudopilines mineures $XcpU_H$, $XcpV_I$, $XcpW_J$ et $XcpX_K$. Ces pseudopilines mineures sont supposées intégrer le pseudopilus puisqu'elles présentent le même repliement que les pilines/pseudopilines et interviennent dans la régulation du pseudopilus (Durand *et al.*, 2005; Korotkov and Hol, 2008). L'insertion des pseudopilines mineures dans le pseudopilus a été confortée par les études structurales qui ont montré que, parmi les 4 pseudopilines mineures du

sécréton Gsp d'*E. coli* ETEC, GspI-J-K forment un complexe ternaire situé au sommet du pseudopilus (Korotkov and Hol, 2008). Dans ce complexe ternaire, les pseudopilines s'associent par leurs extrémités N-terminales ce qui est en accord avec le mode d'assemblage hélicoïdal du pseudopilus. Nos travaux ont mis en évidence par des approches biophysiques (BIAcore) et biochimiques (*pull-down*), l'existence d'un complexe quaternaire entre les pseudopilines mineures $XcpU_H$-V_I-W_J-X_K du sécréton Xcp de *P. aeruginosa* (figure 51B). L'intégration de la quatrième pseudopiline mineure $XcpU_H$, absente dans le complexe GspI-J-K, au sommet du pseudopilus renforce l'idée de l'implication de toutes les pseudopilines mineures dans la biogenèse du pseudopilus. Nous proposons alors que $XcpU_H$ joue le rôle de charnière reliant le sommet du pseudopilus formé par le complexe quaternaire au squelette du pseudopilus composé de l'oligomérisation de $XcpT_G$. Ainsi, $XcpU_H$ interagit à travers son domaine soluble avec $XcpW_J$ du complexe ternaire formé par $XcpV_I$-W_J-X_K. Ce complexe quaternaire recrute le corps du pseudopilus à travers l'interaction entre $XcpU_H$ et $XcpT_G$ par leurs domaines hydrophobes. Par conséquent, nous proposons que l'assemblage du pseudopilus commence en premier lieu par la formation du complexe quaternaire, ensuite, la pseudopiline majeure $XcpT_G$ est intégrée à sa base via son interaction avec $XcpU_H$. Les additions successives de $XcpT_G$ à la base du pseudopilus conduisent à l'élongation du pseudopilus en direction de la sécrétine qui forme le pore de sécrétion.

Parmi les perspectives de ce projet, nous envisageons de déterminer la structure du complexe quaternaire par cristallographie aux rayons X. La détermination de cette structure à haute résolution nous permettrait de vérifier si le mode d'assemblage des pseudopilines mineures du SST2 Xcp est le même que celui déterminé pour le SST2 Gsp d'*E. coli* ETEC. En particulier, il serait intéressant de voir si l'interface de 3500Å² entre GspJ-GspK existe aussi entre $XcpW_J$ et $XcpX_K$ dans la structure cristalline. Si cela était le cas, il faudrait essayer de comprendre pourquoi nous ne l'avons pas trouvé dans nos études d'interactome. A ce jour, aucune évidence directe, ne démontre le recrutement de $XcpT_G$ par $XcpU_H$. Nous pourrions pour cela étudier par « *pull-down* » si le complexe quaternaire composé des domaines solubles de $XcpV_I$-W_J-X_K et de la protéine entière $XcpU_H$ a la capacité de recruter $XcpT_G$.

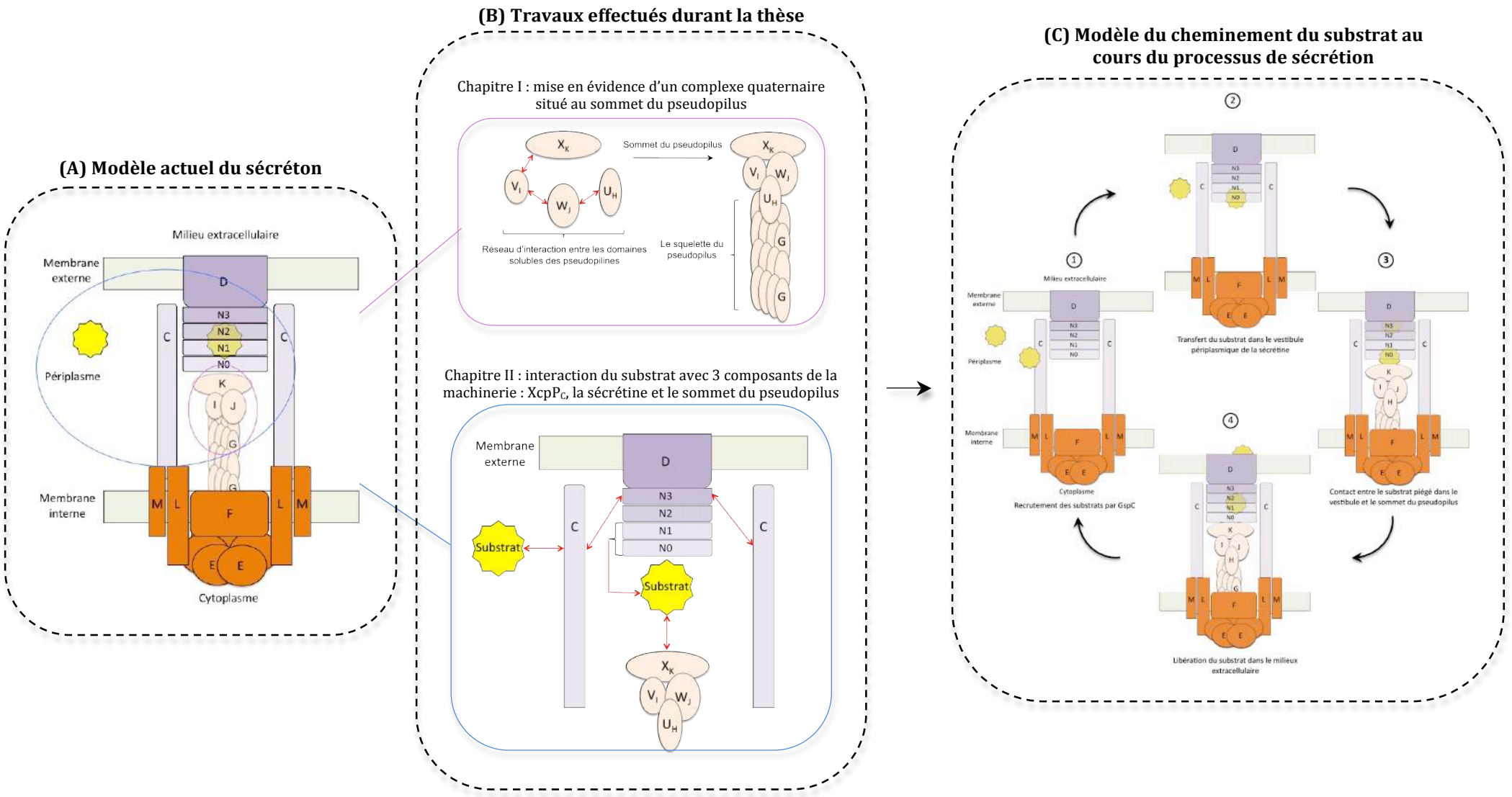


Figure 51 : Apport des travaux de thèse sur la compréhension du modèle de fonctionnement du sécréton

L'utilisation du BIAcore ayant été un succès pour révéler l'existence d'un complexe quaternaire entre les pseudopilines mineures du sécréton Xcp (premier chapitre des résultats), nous avons alors décidé de poursuivre l'étude de l'interactome du SST2 Xcp par cette technique. Ainsi, dans le deuxième chapitre, nous avons révélé de multiples interactions entre les exoprotéines et les domaines périplasmiques des composants du sécréton Xcp. Nous avons ainsi montré que les exoprotéines du sécréton Xcp interagissent spécifiquement avec 3 composants de la machinerie : la protéine $XcpP_C$ qui relie le pore de sécrétion à la plateforme de membrane interne, le domaine « N » de la sécrétine et le sommet du pseudopilus formé par les 4 pseudopilines mineures. Ces interactions directes entre les substrats et des composants du SST2 qui n'avaient encore jamais été décrites, nous ont permis de proposer un modèle de fonctionnement séquentiel du sécréton durant lequel les substrats seraient reconnus et recrutés par $XcpP_C$. Nous proposons en effet que $XcpP_C$ soit la première protéine du sécréton à rencontrer le substrat puisqu'elle forme une enveloppe qui entoure le vestibule périplasmique du pore de sécrétion. Une fois reconnues par $XcpP_C$, les exoprotéines sont présentées à la sécrétine au niveau des sous-domaines N0 et N1 du vestibule périplasmique. Ce processus de reconnaissance des exoprotéines permet de déclencher l'assemblage du pseudopilus par la plateforme de membrane interne qui assure entre autre l'énergisation da la machinerie. Enfin, les exoprotéines piégées dans le vestibule périplasmique sont reconnues en dernier lieu par le sommet du pseudopilus formé par le complexe quaternaire. Cette reconnaissance par le pseudopilus permet la libération des substrats du vestibule périplasmique et leur expulsion par le pseudopilus à travers le pore de sécrétion (figure 51B).

Les données apportées par nos travaux nous ont permis d'intégrer dans le modèle actuel du sécréton des étapes clés de reconnaissance des exoprotéines durant le processus de sécrétion (figure 51 A&C). En effet, dans le modèle proposé, le pore de sécrétion est connecté à plateforme de membrane interne via l'interaction de la sécrétine avec $XcpP_C$. Le pseudopilus formé à partir de la plateforme de membrane interne agit comme un piston et permet l'expulsion des exoprotéines à travers le pore de sécrétion. Cependant, aucune interaction entre les substrats et les autres composants de la machinerie, exeptée celle avec la sécrétine, n'est décrite dans ce modèle.

Nos résultats d'iteractome « *in vitro* » doivent êtres définitivement validés par des approches « *in vivo* ». Ainsi, nous envisageons d'appliquer à notre modèle, la technique de pontage chimique utilisé avec succès par Gray et al (Gray *et al.*, 2011) pour démontrer l'interaction entre GspG-GspL ce qui nous permettrait de confirmer nos interactions. Une autre

approche consiste à co-purifier par « *pull-down* » les différents substrats Xcp contenus dans un surnageant de milieu de culture en utilisant comme appât le domaine périplasmique de $XcpP_C$ avec une étiquette 6-histidine. Cela permettrait d'une part de valider l'interaction des substrats avec $XcpP_C$ et d'autre part d'identifier éventuellement de nouveaux substrats.

Dans l'ensemble, nos travaux nous permettent d'une part de mieux comprendre sur le plan fondamental le fonctionnement de cette machinerie de transport dont la complexité est due à son implication dans le transport de protéines périplasmiques repliées, un challenge très difficile à relever par la bactérie qui doit également préserver l'intégrité de son enveloppe. Nos résultats fournissent également de nouvelles pistes pour le développement d'antibactériens qui cibleraient par exemple les interactions des substrats avec les composants de la machinerie.

Annexes

Article V

The assembly mode of the pseudopilus: a hallmark to distinguish a novel secretion system subtype.

Durand Eric, Alphonse Sébastien, Brochier-Armanet Cécile, Ball Geneviève, Douzi Badreddine, Filloux Alain, Bernard Cédric, Voulhoux Romé*.

J Biol Chem. 2011. 286(27):24407-16.

Supplemental Material can be found at:
http://www.jbc.org/content/suppl/2011/05/17/M111.234278.DC1.html

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 286, NO. 27, pp. 24407–24416, July 8, 2011
© 2011 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

The Assembly Mode of the Pseudopilus

A HALLMARK TO DISTINGUISH A NOVEL SECRETION SYSTEM SUBTYPE[*S]

Received for publication, February 24, 2011, and in revised form, May 1, 2011 Published, JBC Papers in Press, May 17, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.234278

Eric Durand[‡], Sébastien Alphonse[§1], Céline Brochier-Armanet[¶], Geneviève Ball[‡], Badreddine Douzi[‡§], Alain Filloux[‖2], Cédric Bernard[§1,3], and Romé Voulhoux[‡4]

From the [‡]Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires (LISM-UPR9027), CNRS, Université de la Méditerranée, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France, the [§]Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques (AFMB-UMR6098), CNRS, Université de Provence et Université de la Méditerranée, Case 932, 163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille Cedex 9, France, the [¶]Laboratoire de Chimie Bactérienne (LCB-UPR9043), CNRS, Université de Provence (Aix-Marseille I), Institut de Microbiologie de la Méditerranée, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France, and the [‖]Centre for Molecular Microbiology and Infection (CMMI), Division of Cell and Molecular Biology, Imperial College London, London SW7 2AZ, United Kingdom

In Gram-negative bacteria, type II secretion systems assemble a piston-like structure, called pseudopilus, which expels exoproteins out of the cell. The pseudopilus is constituted by a major pseudopilin that when overproduced multimerizes into a long cell surface structure named hyper-pseudopilus. *Pseudomonas aeruginosa* possesses two type II secretion systems, Xcp and Hxc. Although major pseudopilins are exchangeable among type II secretion systems, we show that XcpT and HxcT are not. We demonstrate that HxcT does not form a hyper-pseudopilus and is different in amino acid sequence and multimerization properties. Using structure-based mutagenesis, we observe that five mutations are sufficient to revert HxcT into a functional XcpT-like protein, which also becomes capable of forming a hyper-pseudopilus. Phylogenetic and experimental analysis showed that the whole Hxc system was acquired by *P. aeruginosa* PAO1 and other *Pseudomonas* species through horizontal gene transfer. We thus identified a new type II secretion subfamily, of which the *P. aeruginosa* Hxc system is the archetype. This finding demonstrates how similar bacterial machineries evolve toward distinct mechanisms that may contribute specific functions.

At least six distinct pathways have been identified in Gram-negative bacteria for the secretion of a diverse pool of extracellular proteins (1). Among them, the type II secretion pathway is a two-step process in which exoproteins are initially exported through the cytoplasmic membrane by either the Sec or Tat translocons (2). Translocation across the outer membrane is then performed by the type II secretion system (T2SS),[5] also called secreton. In our model organism, the gammaproteobacterium, *Pseudomonas aeruginosa*, the secreton is a multiprotein complex involving at least 12 different proteins called XcpA, XcpP–Z (3). In the current model of Xcp secreton assembly, three subcomplexes are defined: the inner membrane platform (XcpRSYZ), required to provide energy during the secretion process; the secretin XcpQ, forming a pore in the outer membrane through which the substrate is transported and further expelled by the third subcomplex of the system called pseudopilus in analogy with the type IV pilus assembly system (4). Five Xcp components (XcpT–X) are, like the major type IV pilin, PilA, all substrates for the prepilin peptidase XcpA/PilD (5, 6). They have consequently been called pseudopilins. The three-dimensional structure of all pseudopilins characterized so far displays the typical $\alpha\beta$ fold found in the pilin/pseudopilin family (7–11). XcpT, which is the most abundant pseudopilin (12), is the only pseudopilin able to assemble into a pilus-like structure. We called this structure hyper-pseudopilus (HPP) because it is only observable under conditions of XcpT overproduction (13–15). These observations strongly suggest that the Xcp secreton contains a pilus-like structure and that the main component of this so-called pseudopilus is XcpT. XcpT is then considered as the major pseudopilin, whereas the four other pseudopilins, XcpU–X are called minor pseudopilins.

Due to their high specificity for a given organism and a set of substrates, components of the diverse T2SSs found in Gram-negative bacteria are hardly exchangeable (4). Interestingly, the major pseudopilin, generally called GspG in Gram-negative bacteria, appears much less specific because homologs of GspG from six different T2SSs, including the *P. aeruginosa* Xcp system, are fully functional in the *Klebsiella oxytoca* Pul T2SS lacking its major pseudopilin PulG (15). This observation suggests that in type II secretion, substrate- or species-specificity is not related to the major pseudopilin, which therefore probably assembles a pseudopilus exchangeable between most T2SSs.

In addition to the typical Xcp T2SS, the PAO1 *P. aeruginosa* strain possesses a second T2SS, referred to as Hxc system (for homolog to Xcp) (16). Whereas more than a dozen exoproteins utilize the Xcp T2SS for their secretion, the Hxc T2SS is dedicated to the secretion of one single protein, the low molecular mass alkaline phosphatase LapA (16, 17). We have previously

* This work was supported by 3D-Pilus Young Researcher Grant ANR-JC 07-183230 (to E. D.).
[S] The on-line version of this article (available at http://www.jbc.org) contains supplemental Figs. S1–S3, Tables S1–S4, and additional references.
[1] Present address: Dept. of Chemistry, City College of the City University of New York, New York, NY 10031.
[2] Supported by the Royal Society.
[3] Present address: Dept. of Chemistry, City University of New York Graduate Center and Institute for Macromolecular Assemblies, New York, NY 10031.
[4] To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-4-91-16-41-26; Fax: 33-4-91-71-21-24; E-mail: voulhoux@ifr88.cnrs-mrs.fr.
[5] The abbreviations used are: T2SS, type II secretion system; HPP, hyper-pseudopilus; IMF, immunofluorescence; ML, maximum likelihood.

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on August 25, 2011

observed in complementation assays the nonredundancy of the two machineries and more particularly that HxcT, which is 60% identical to XcpT, is unable to compensate for the lack of XcpT for Xcp secretion in *P. aeruginosa* (16). Based on other studies (15), such incompatibility between two major pseudopilins is unexpected, especially between two T2SSs belonging to the same organism.

We show with the present study that, in addition to its inability to compensate for the lack of XcpT, HxcT pseudopilins are also unable to assemble into an HPP even when overproduced. Interestingly, these two phenotypes are restored when using an HxcT variant in which 9 residues have been replaced with corresponding residues in XcpT and other compatible major pseudopilins. Because those key residues are different in HxcT, our data clearly indicate that the second Hxc T2SS of *P. aeruginosa* is unable to assemble a HPP, which suggests different pseudopilus architecture. We concluded that such differences in the Xcp and Hxc systems probably result in subtle modification of the type II secretion process and highlight the existence of two T2SS subtypes that we propose to name T2aSS and T2bSS for Xcp- and Hxc-type systems, respectively. Interestingly, such HxcT-specific amino acids are found in phylogenetically related GspG proteins, revealing a larger distribution of this alternative T2bSS.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial Strains and Growth Conditions—All bacterial strains, vectors, and plasmids used in this study are listed in supplemental Tables S3 and S4. *Escherichia coli* strains were grown at 37 °C in Luria broth. *P. aeruginosa* strains were grown at 30 °C in proteose peptone medium supplemented with glucose 0.4% (w/v). When required, media were supplemented with the following antibiotics at the indicated concentrations: for *E. coli*, 50 μg/ml ampicillin, 30 μg/ml kanamycin, and 15 μg/ml gentamycin; and for *P. aeruginosa*, 150 μg/ml carbenicillin and 50 μg/ml gentamycin. The *E. coli* TG1 strain was used to propagate all plasmids. Plasmids were introduced into *P. aeruginosa* by triparental mating by use of the conjugative properties of pRK2013. The *P. aeruginosa* strains used were PAO1 and its derivatives Δ*xcpT* (in-frame deletion of the *xcpT* gene in PAO1) and Δ*xcpT*Δ*hxcT* (in-frame deletions of the *xcpT* and *hxcT* genes in PAO1). *P. aeruginosa* transconjugants were selected on *Pseudomonas* isolation agar supplemented with antibiotics.

Construction of the P. aeruginosa Mutant—The deletion of the *hxcT* gene in Δ*xcpT*, leading to the Δ*xcpT*Δ*hxcT* strain, was constructed as described previously (16). Briefly, 500-bp sections upstream (*hxcV*′) and downstream (*hxcX*′) of the *hxcT* gene were PCR-amplified using the primers *hxcT*up1 (5′-AGCGCGGGGTCGTCGGTGCCTCGACG-3′) and *hxcT*up2 (5′-CTCAGAGCTCATCTCGACACTCCTCGG-3′) for *hxcV*′ and *hxcT*dw1 (5′-GTCGAGATAGCTCTAGCGCGCCAT-3′) and *hxcT*dw2 (5′-GAAGTCTCGCGGCCGCTTCGAAGCCT-3′) for *hxcX*′. The oligonucleotides were designed for amplifying fragments with overlapping 3′ and 5′ ends. Both fragments were ligated by performing an overlapping PCR, using hxcTup1 and hxcTdw2 in a second run of PCR with a mix of the two fragments as the matrix. The resulting PCR product was cloned into the pCR2.1 vector (TA cloning kit; Invitrogen). A 1,000-bp BamHI/ApaI DNA fragment was then subcloned into the suicide pKNG101 vector. The resulting construct (pKNG-Δ*hxcT*) was transferred to *P. aeruginosa* by mobilization with the pRK2013. The strain in which the chromosomal integration occurred was selected on *Pseudomonas* isolation agar plates containing 2,000 μg of streptomycin/ml. Excision of the plasmid, resulting in the deletion of the chromosomal target gene, was performed after selection on Luria broth plates containing 5% sucrose. Clones that became sucrose-resistant and streptomycin-sensitive were confirmed to contain the *hxcT* gene deletion by PCR analysis.

Site-directed Mutagenesis of HxcT and Cloning of HxcT Variants—The pCR2.1 vector carrying the *hxcT* gene (pCR2.1-hxcTwt) (16) was used as DNA template to generate all the *hxcT* mutant alleles (supplemental Table S1). We used the QuikChange PCR-based targeted mutagenesis approach with a pair of specific primers (supplemental Table S2) carrying both the desired mutations and the *Pfu*-Turbo (Stratagene) *Taq* polymerase to amplify the entire pCR-*hxcT* plasmid. The mutation in the *hxcT* gene was confirmed by DNA sequencing (GATC biotech). For expression in *P. aeruginosa* we used two types of broad host range vectors: the pMMB190 and the pJN105. Each *hxcT* allele from pCR2.1 was cut out using the BamHI/EcoRV restriction sites and subcloned into the BamHI/SmaI sites of the pMMB190 (supplemental Table S3). For the subcloning into the pJN105, XbaI/SacI restriction sites were used for all the *hxcT* alleles (supplemental Table S3). To generate the C-terminal His_6-tagged form of each *hxcT* mutant allele, we designed a single pair of primers, HxcTh6-F2 (BamHI: 5′-ATTGATCCGAATCGAACCATCCGAGGAGTTCGAGATGATTCGT-3′) and HxcTh6-R2 (HindIII: 5′-ATTGATCCGAATCGAACCATCCGAGGAGTTCGAGATGATTCGT-3′), for amplifying the *hxcT* alleles and flanking at the same time a C-terminal His_6 DNA-encoding sequence. The PCR products were then cloned into the pCR2.1 by TA-cloning (Invitrogen) and the DNA sequence checked by sequencing. Each allele was subcloned into the pMMB190 vector using the BamHI/HindIII restriction sites (supplemental Table S3).

The HxcT homolog from *Pseudomonas fluorescens* (HxcT*Pf*) was PCR-amplified using the primers HxcTpf5-F1 (5′-ATAGAATTCGCTTGTTTGCGCAGGGCTTGCATGGGCCGCTCG-3′) and HxcTpf5-R1 (5′-ATAGAATTCCGACCGGCCCTATAGTTGCCAGGAGCCGATATC-3′) from the genomic DNA of the *P. fluorescens* strain Pf-5. Each primer contained an EcoRI restriction site. The resulting PCR product was then digested by EcoRI and subcloned into the pMMB190.

Immunofluorescence (IMF) Microscopy—P. aeruginosa strains were grown overnight at 37 °C on a Luria broth plate supplemented with 250 μg of carbenicillin/ml and 2 mM of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside. We used the same protocol as described before (18) to prepare glass slides for IMF observation. The primary mouse antibody directed against the His_6 tag (Roche Applied Science) was used at a 1:500 dilution, and the secondary fluorescein/anti-mouse (Vector Laboratories) conjugate was used at a 1:400 dilution. Samples were observed on a Zeiss Axio microscope.

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on August 25, 2011

Secretion Assays—Protease secretion by *P. aeruginosa* was tested after the organism was plated on tryptic soy agar (Difco) plates containing 1.5% skim milk. Elastase secretion was analyzed on tryptic soy agar plates containing 1.0% elastine. For the detection of lipase secretion, lipid agar plates were used. Lipid agar is a minimal medium containing olive oil as the sole carbon source (19). For liquid secretion assays, bacterial strains were grown for 24 h at 30 °C with aeration in proteose peptone medium (Difco) containing 0.4% glucose, 50 μg gentamycin/ml, and 0.5% L-arabinose (inducer of the pBAD). Cells and supernatants were separated by centrifugation; proteins contained in the supernatants were precipitated by adding trichloroacetic acid (TCA, 15% final concentration) and incubation for 2 h at 4 °C. Samples were subsequently centrifuged, and the pellets were washed with acetone and resuspended in SDS-PAGE sample buffer (2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.1 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.02% bromphenol blue). The samples were heated for 7 min at 95 °C before electrophoresis. The proteins contained in the supernatant of 1.0 A_{600} unit equivalent of bacterial cell culture were loaded and separated on SDS gels containing 12% acrylamide. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue.

Purification of Pseudopilin-soluble Domains and Chemical Cross-linking—The His_6-tagged periplasmic soluble domain of XcpT (XcpTp) was purified as described by Durand *et al.* (18). The untagged periplasmic soluble domain of HxcT (HxcTp) was purified following the protocol used for the minor pseudopilins by Douzi *et al.* (20). Purified proteins were then used for chemical cross-linking. Each protein (0.6 mM) was mixed in phosphate-buffered saline (PBS×1) supplemented with 10 mM $ZnSO_4$ in a total volume of 50 μl. After 30 min of preincubation at room temperature 1% of freshly prepared paraformaldehyde was added to the mix. Incubation was continued during 20 min, after which the reaction was blocked by adding 4-fold concentrated SDS-PAGE sample buffer. 20 μl of each mix was directly analyzed on a 15% SDS-PAGE. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue.

Two-dimensional SDS-PAGE—Each sample was run on two consecutive 15% SDS-PAGEs as follows: after boiling cell samples were electrophoresed on the first gel. Then the entire band was cut out and run without further boiling perpendicular on the second gel. After running, the gel was immunoblotted and revealed with the anti-XcpT (laboratory collection) or anti-HxcT (antipeptide generated by Thermo Fisher scientist) as described in Viarre *et al.* (17).

Phylogenetic Reconstruction—We built a first dataset containing a subset of 99 pilins and major pseudopilins (dataset D1) representative of major pilins and pseudopilins. Then we built a second dataset with the 145 type II major pseudopilins identified in Alphonse *et al.* (7) (dataset D2). One of these sequences was highly divergent and was thus removed from the analysis. A survey of the 1,269 complete prokaryotic genomes available at the NCBI using BlastP (21) (default parameters, except the max_target sequences that was fixed to 1,000) allows the identification of 397 homologs of *P. aeruginosa* PAO1 HxcT and XcpT. The corresponding protein sequences were gathered in a third dataset (D3). Each dataset was aligned using mafft (22) version 6.833 (default parameters). The resulting alignments were visually inspected using the alignment editor (ed) from the MUST package (23) and manually refined when necessary. Regions where the alignment was doubtful were removed prior to phylogenetic analyses. Maximum likelihood phylogenetic trees were inferred using PhyML and the JTT (Jones, Taylor, Thornton) model for dataset D2. For the alignments D1 and D3 we used the Le and Gascuel (LG) model and a gamma distribution (four discrete categories, an estimated alpha parameter) and an estimated proportion of invariable sites, to take into account the heterogeneity of evolutionary rates among sites. The branch robustness of the resulting trees was estimated using the nonparametric bootstrap procedure implemented in PhyML (100 replicates of the original dataset) and the same parameters as for the tree reconstruction.

Logo Construction—Based on the tree inferred from the dataset D3 we have inferred the logo corresponding to major clades using the Phylo_mLogo tool (23).

RESULTS

HxcT Is an Atypical Major Pseudopilin (HxcT Overproduction Does Not Lead to HPP Formation)—As reported previously, the *P. aeruginosa* Xcp and Hxc machineries are involved in the secretion of exoproteins in a system-specific manner. In a *P. aeruginosa* PAO1 mutant strain deleted for *xcpT* and *hxcT* genes (referred to as Δ*xcpT*Δ*hxcT* strain), the introduction of a plasmid carrying either the *xcpT* or *hxcT* genes specifically restores Xcp-dependent (LasB, PmpA, aminopeptidase) or Hxc-dependent (LapA) secretion (Fig. 1*A*, compare *lanes 1*, *3*, and *4*). The functional complementation of the Xcp-dependent secretion was tested by three different phenotypic plate assays. In the wild-type PAO1 strain (Fig. 1*B*, *first row*), proficient Xcp-dependent secretion is observed by the formation of a halo around the bacterial colony on a skimmed milk plate due to the activity of several proteases including PmpA and LasB, bacterial growth on lipid agar plate is due to the lipase activity of LipA, and formation of a halo on elastin plate is due to the elastolytic activity of LasB. In contrast, in the *xcpT* mutant strain (Fig. 1*B*, *second row*) none of these phenotypes could be observed, indicating the absence of Xcp-dependent secretion of lipase and proteases. Introduction of a plasmid carrying the *xcpT* gene (Fig. 1*B*, *third row*) restores the Xcp-dependent secretion proficiency of the Δ*xcpT* strain whereas the introduction of a plasmid carrying the *hxcT* gene had no effect (Fig. 1*B*, *fourth row*). This observation confirmed that the HxcT major pseudopilin cannot replace the XcpT function in the Xcp secreton. Moreover, we used His-tagged forms of XcpT ($XcpT^H$) and HxcT ($HxcT^H$) and combined IMF microscopy to demonstrate that HxcT (Fig. 1*C*, *right*) is unable to assemble into a HPP in the conditions where XcpT does (Fig. 1*C*, *center*). Note that the overproduction of HxcT is similar to XcpT in the IMF experiment (data not shown). Our data clearly confirm that HxcT is an atypical major pseudopilin in the T2SS. Indeed, in addition to its inability to replace XcpT for Xcp-dependent secretion, it is also unable to assemble into an HPP when overproduced.

HxcT Reversion by Structure-based Sequential Mutagenesis—Heterologous complementation studies have shown that the major pseudopilins XcpT from *Pseudomonas alcaligenes* and *Pseudomonas putida* could replace XcpT from *P. aeruginosa*

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on August 25, 2011

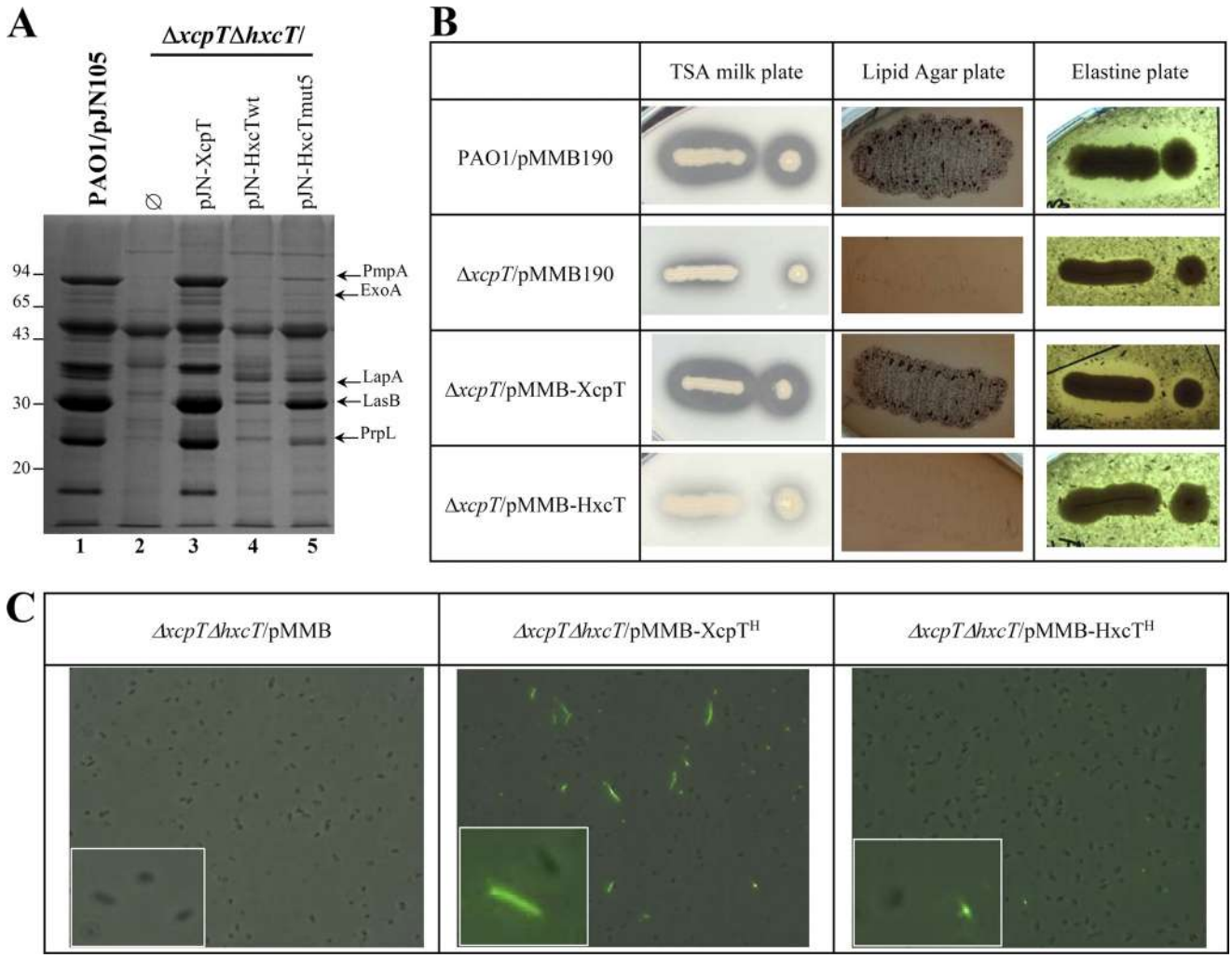


FIGURE 1. **HxcT and XcpT are not interexchangeable.** *A*, 12% SDS-PAGE stained with Coomassie Brilliant Blue of supernatant fractions. Molecular mass markers are indicated on the *left* side of the gel. Some of the Xcp- (PmpA, ExoA, LasB, and PrpL) and the Hxc- (LapA) dependent substrates are indicated by *arrows* on the *right* side. *B*, phenotypical plate assays revealing Xcp-dependent secretion and activities of substrates. Proteolytic activity is shown by a *halo* around the colony on a skimmed milk plate (*second column*). Secretion of the lipase LipA is revealed by the growth of *P. aeruginosa* strains on a lipid agar plate (*third column*). Elastase LasB activity is shown by a clear *halo* around the bacterial colony on elastine plate (*fourth column*). The name of the *P. aeruginosa* strains and plasmids is indicated in the *first column*. *C*, IMF microscopy revealing HPP assembly by *P. aeruginosa* strains grown on plate (see "Experimental Procedures"). HPPs are visible as fluorescent filaments labeled by the anti-His antibody. *Insets* show detailed views of a part of each panel.

for T2SS-dependent secretion of exoenzymes (24, 25). However, XcpT cannot replace HxcT for LapA secretion in *P. aeruginosa* (Fig. 1*A*, *lane 3*). Importantly, heterologous complementation studies performed in *K. oxytoca* have shown that the major pseudopilins, XcpT from *P. aeruginosa*, GspG from *E. coli*, OutG from *Erwinia chrysanthemi*, EpsG from *Vibrio cholerae*, OutG from *Erwinia carotovora*, and ExeG from *Aeromonas hydrophila* could replace PulG from *K. oxytoca* in T2SS-dependent HPP assembly and secretion of exoenzyme (15). To understand the functional difference observed between XcpT and HxcT major pseudopilins, we compared the amino acid sequence of HxcT with the sequences of a set of compatible and HPP-forming major pseudopilins (Fig. 2*A*). The alignment revealed nine significant and remarkable differences between the HxcT sequence and the consensus sequence of the compatible major pseudopilins (Fig. 2*A*). In XcpT, the corresponding residues are Gln^{23}, Asp^{48}, Glu^{65}, Lys^{69}, Lys^{78}, Lys^{87}, Asn^{96}, Glu^{120}, and Asp^{126}. These nine residues were mapped on the tri-dimensional structure of XcpT (Fig. 2*B*) and replaced in the pseudopilus context. To do so, the structure of XcpT (7) was positioned in the *Neisseria gonorrhoeae* type IV pilus filament (Protein Data Bank ID code 2HIL; data not shown) (26). To allocate each identified residues, a possible role in HPP formation and/or Xcp-dependent secretion, we gradually reintroduced in HxcT the nine corresponding residues found in XcpT. The reconstruction was performed by sequentially introducing each one of the nine substitutions in HxcT. The order by which the substitutions were introduced was driven by the predicted importance of these residues in the pseudopilus assembly. More precisely, in our reconstituted pseudopilus, the N-terminal part of the α-helix of major pseudopilins is nearly parallel to the fiber axis in the center of the filament creating the hydrophobic core crucial for pseudopilus assembly. Therefore, residues located in this α-helix and residues found at the interface between two neighboring XcpT and therefore possibly involved in intersubunit interaction were the first selected for the "gradual" directed mutagenesis. Moreover, mutation n1 was chosen first because it is located in the N-terminal α-helix which has a

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on August 25, 2011

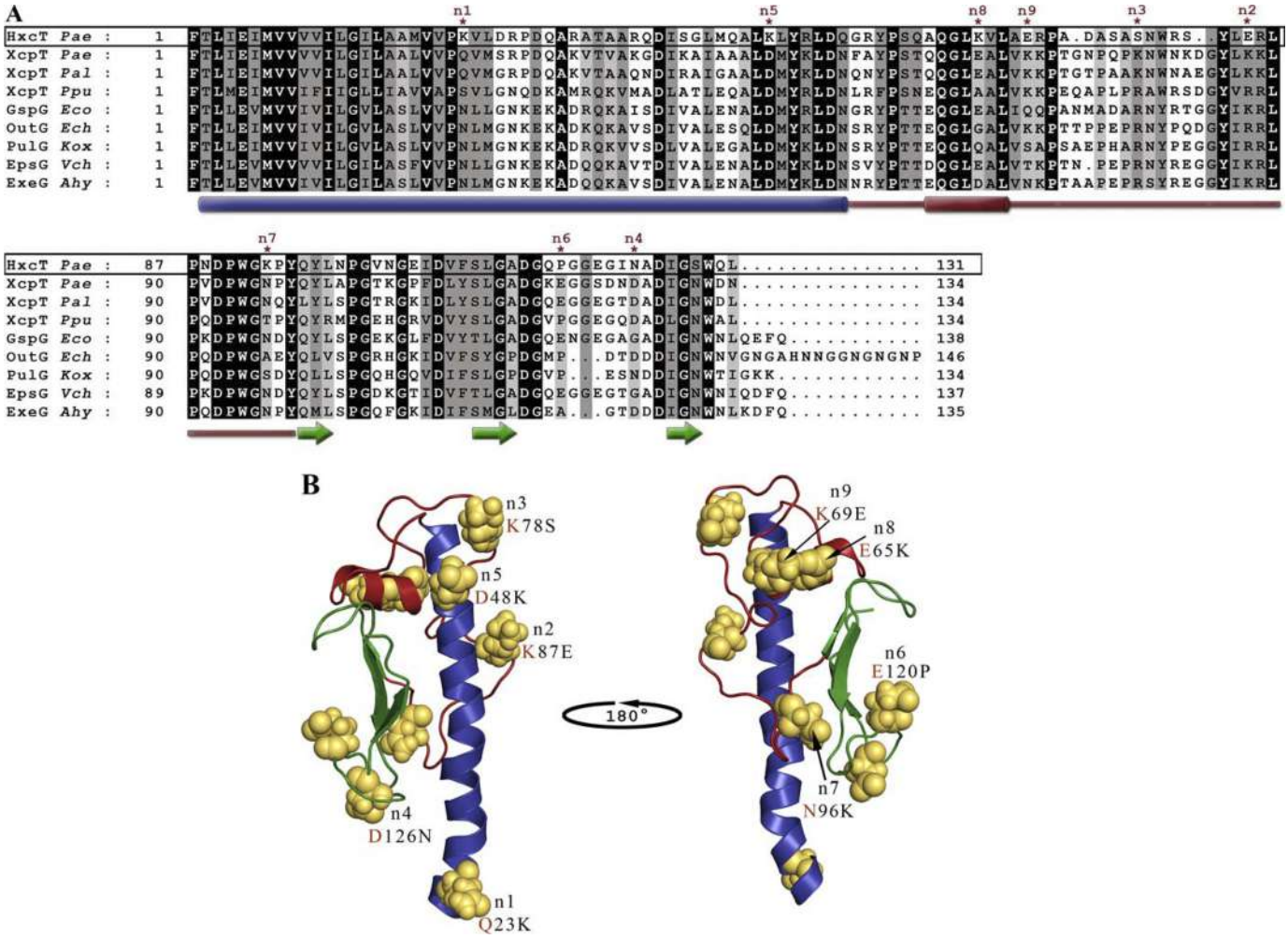


FIGURE 2. **Selection criteria for mutations of HxcT.** *A*, sequence alignment of matured major pseudopilins from T2SSs. Sequence of HxcT from the T2SS of *P. aeruginosa* PAO1 is *boxed*. Identical residues are highlighted in *black*, conserved residues are highlighted in *dark gray*, and similar residues are highlighted in *light gray*. The secondary structure elements are indicated below the sequence alignment where *cylinders* represent the α-helices, *arrows* represent the β-strand, and the *red line* indicates the $\alpha\beta$-loop region. The point mutations selected to transform HxcT in XcpT are indicate by *asterisks*. Pseudopilin gene identification (gi) numbers: Pal, *P. alcaligenes* M-1(gi 3978481/AAC83358.1); Ppu, *P. putida* WCS358 (gi 3297910/CAA56982.1); Eco, *E. coli* SMS-3-5 (gi 170681001/YP_001745224.1); Ech, *E. chrysanthemi* (gi 259985/AAB24181.1); Kox, *K. oxytoca* UNF5023 (gi 131595/P15746.1); Vch, *V. cholera*e MZO-3 (gi 153802200/ZP_01956786); Ahy, *A. hydrophila* ATCC 7966 (gi 117620343/YP_855105); and Pae, *P. aeruginosa* PAO1 (gi 15598297/NP_251791 and 15595878/NP_249372) for XcpT and HxcT, respectively. *B*, *ribbon* view of the XcpT pseudopilin from *P. aeruginosa* (PAO1). N-terminal helix is colored in *blue*, $\alpha\beta$-loop region in *red*, and the C-terminal three-stranded β-sheet is colored in *green*. Residues selected to transform HxcT into XcpT are represented in sphere mode. Mutations performed are indicated below the priority tag with a *red letter* for the XcpT residue.

predominant role in the multimerization process of XcpT. We thus call the HxcT substitutions K23Q, E84K, S77K, N123D, and K48D, n1, n2, n3, n4, and n5 mutations, respectively. The substitution P117E is the n6 mutation and is located in the putative calcium binding site in the $\beta2\beta3$ loop (27), shown to be important in the secretion process. The three last targeted positions did not seem to be involved in intersubunit interactions and were considered as minor in terms of pseudopilus formation and were therefore the last to be introduced. These substitutions, K93N, K65E, and E69K, were named n7, n8, and n9, respectively. We thus design the progressive conversion of HxcT into XcpT by generating nine HxcT variants (HxcTmut1 until HxcTmut9). For example, HxcTmut9 bears all nine substitutions, whereas the HxcTmut2 variant carries the K23Q and E84K substitutions (see supplemental Table S1).

Successful HxcT Reversion with HxcTmut5—The newly engineered genes encoding the nine HxcT variants were subcloned into the pMMB190 broad-host range vector and expressed in the PAO1Δ*xcpT*Δ*hxcT* background. All of the HxcT variants are produced by the bacterial strain as seen by SDS-PAGE and Western blot analysis of cell extracts (Fig. 3). To test the functionality of the HxcT variants we checked two different phenotypes, the restoration of Xcp-dependent secretion on a lipid agar plate and XcpT-like HPP formation by IMF microscopy (Fig. 4). All assays were performed using the PAO1Δ*xcpT*Δ*hxcT* strain carrying either the plasmid pMMB190, the plasmid carrying the *xcpT* gene, the plasmid carrying the wild-type *hxcT* gene, or the plasmids carrying either one of the nine *hxcTmut* alleles. The HxcT variants HxcTmut2 to HxcTmut4 behave as the wild-type HxcT protein and do not provide any of the above-mentioned phenotypes. Interestingly, the HxcTmut5 variant is able to grow on a lipid agar plate, albeit only slightly, and assembles into few and short HPPs. Analysis of the supernatant of a liquid culture of the

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on August 25, 2011

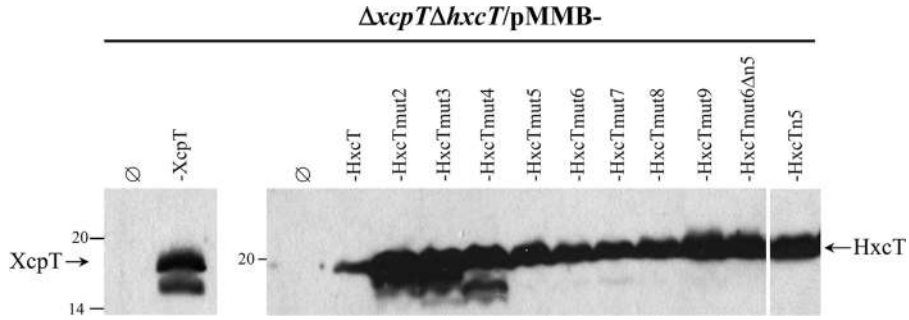


FIGURE 3. **Production of HxcT variants.** 15% SDS-PAGE and Western blot of cell extracts from the Δ*xcpT*Δ*hxcT* strain producing XcpT, HxcT, and the various HxcT variants and grown on Luria broth plate supplemented with 2 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside. The membrane was revealed by anti-XcpT (*left*) or anti-HxcT (*right*) antibodies. An *arrow* indicates the position of the proteins. Molecular mass markers are indicated on the *left* side of each panel.

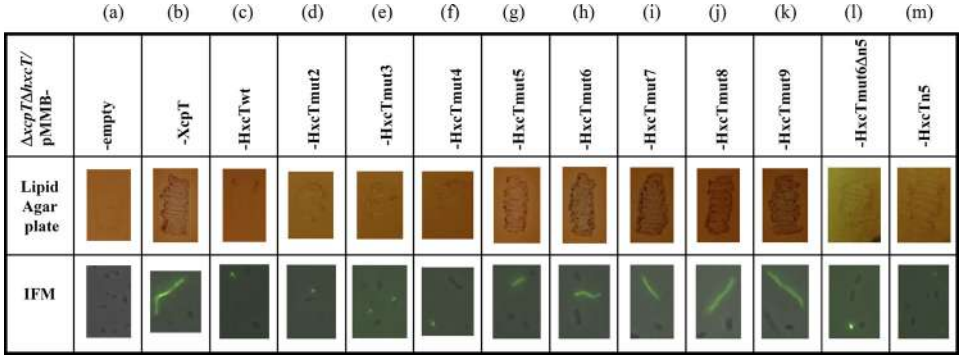


FIGURE 4. **Phenotypical studies of the HxcT variants.** The complementation of the Xcp-dependent secretion is shown by the lipid agar plate assay (*second row*), and the formation of HPP is investigated using IMF microscopy (*third row*). The name of the constructs used in each case is indicated in the *first row*.

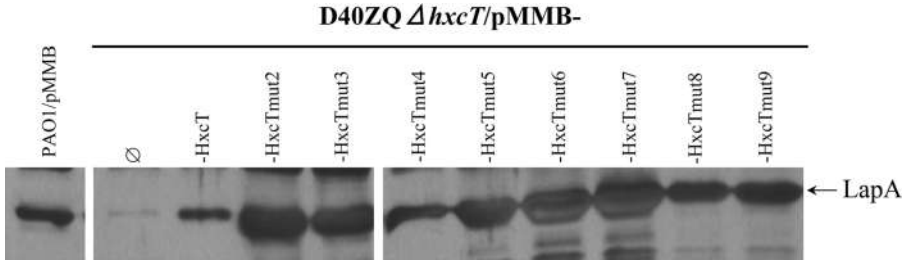


FIGURE 5. **All HxcT variants remain functional in the Hxc secreton.** Analysis of the supernatant of various *P. aeruginosa* strains grown under phosphate-limitation conditions is shown. The equivalent of 1.0 A_{600} has been loaded in each well. Samples were first run on a 12% SDS-PAGE and then blotted and revealed using an antibody directed against LapA. Two strains of *P. aeruginosa* were used here: the PAO1 parental strain and its D40ZQΔ*hxcT* derivative, which lacks the entire *xcp* T2SS operon together with an in-frame deletion of the *hxcT* gene. The two strains were complemented either with the empty vector or with plasmids expressing the wild-type *hxcT* gene or its mutant derivatives. The position of LapA is indicated by an *arrow* on the *right* side of the gel.

PAO1Δ*xcpT*Δ*hxcT* strain producing HxcTmut5 (Fig. 1*A*, *lane 5*) confirmed the restoration, albeit partial, of the Xcp-dependent secretion, which is consistent with the growth on lipid agar (Fig. 4*g*). The HxcTmut6 variant grows better on a lipid agar plate and assembles into more and longer HPPs (Fig. 4*h*). From HxcTmut5 the more HxcT carries Xcp-like amino acids the more the Xcp phenotypes are striking. Indeed, strains producing HxcTmut7–9 grow increasingly better on a lipid agar plate and assemble more and longer HPPs. However, the presence of an aspartate residue at position n5 appears to be absolutely required for HxcT reversion because its absence in HxcTmut6 variant HxcTmut6Δn5 does not allow growth restoration on lipid agar or HPP formation (Fig. 4*l*). Substitution of n5 is, however, not sufficient for reversion because HxcTn5 does not allow growth restoration on lipid agar or HPP formation (Fig. 4*m*).

Note that the Hxc-dependent LapA secretion can be achieved by any of the HxcT variants (Fig. 5). The LapA secretion remains, moreover, Xcp-independent because LapA is still secreted in a strain lacking all *xcp* genes and the *hxcT* gene (PAO1D40ZQΔ*hxcT*) but producing any of the HxcT variants (Fig. 5). The observation that all HxcTmut variants retained functionality in the Hxc secreton indicates that key residues for Xcp pseudopilus formation and secretion are not crucial for Hxc secretion.

In conclusion, by accumulation of amino acid changes, HxcT was progressively turned into XcpT. Each of the mutations brings an additional "XcpT feature" to HxcT and makes it more efficient at complementing an *xcpT* deletion mutant strain. Moreover, our observation demonstrates that restoration of both Xcp-dependent secretion and ability to assemble a HPP are coupled and therefore tightly linked during the Xcp secretion process.

XcpT and HxcT Pseudopilin Multimerization Capacity—One major functional difference between XcpT and HxcT seems to relate to their ability to multimerize into an HPP when

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on August 25, 2011

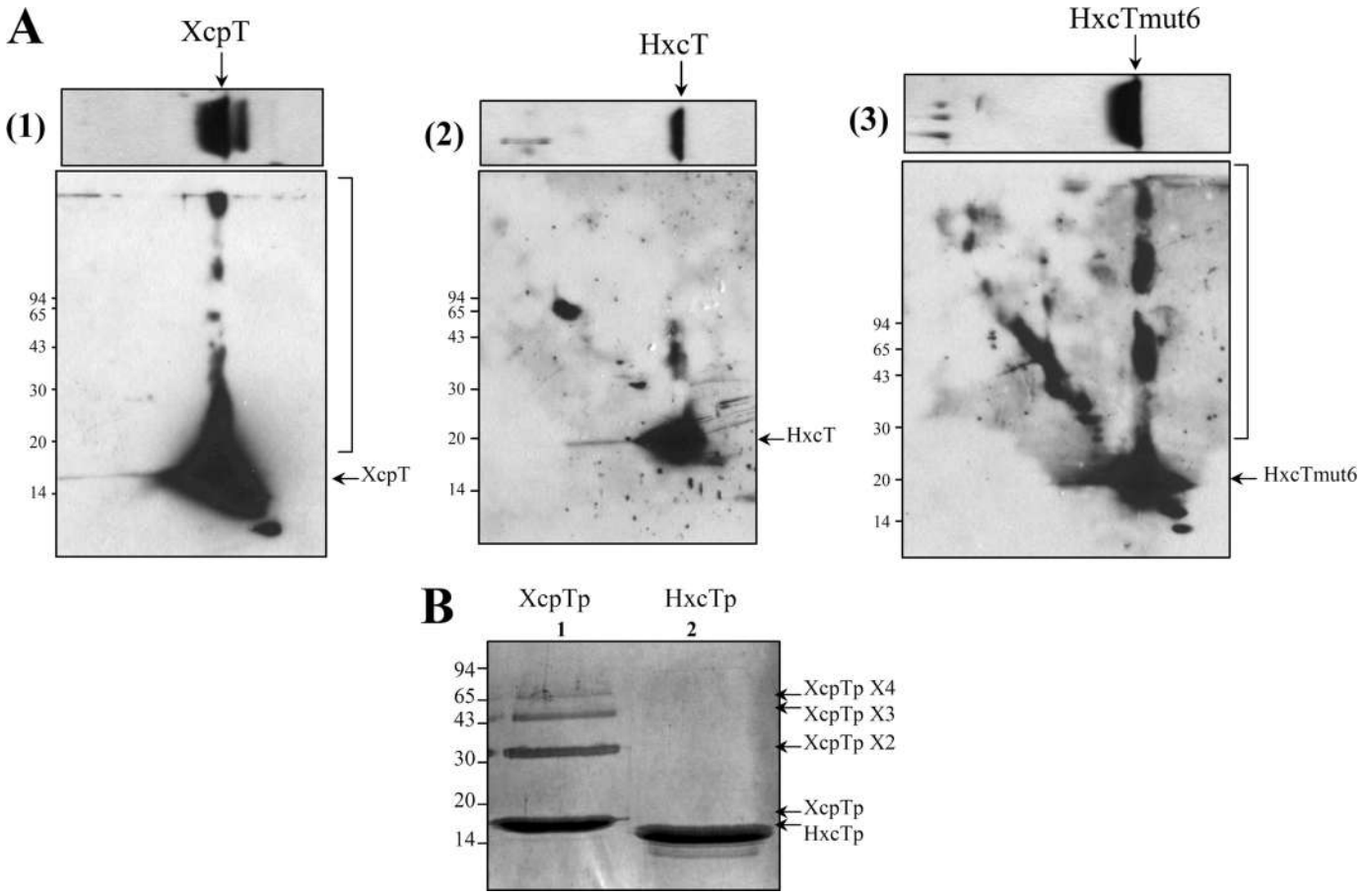


FIGURE 6. **Pseudopilin multimerization.** *A*, two-dimensional SDS-PAGE analysis of the multimerization of full-length major pseudopilins. The first dimension is presented in the *upper panel*, and the second dimension is presented in the *lower panel*. After running, the gels were immunoblotted and revealed by the anti-XcpT antibody (*1*) or the anti-HxcT antibody (*2*) and (*3*). An *arrow* indicates the position of the protein of interest. The *right bracket* on the side of the gel shows the protein multimers. *B*, paraformaldehyde cross-linking-mediated multimerization of the major pseudopilin-soluble domains. The soluble periplasmic domains of XcpT (XcpTp, *lane 1*) and of HxcT (HxcTp, *lane 2*) have both been subjected to chemical cross-linking. Samples were then run on a 15% SDS-PAGE, and the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue. *Arrows* on the side of the gel indicate the proteins and protein multimers. Molecular mass markers are indicated on one side of each *panel*.

these pseudopilins are overproduced. To confirm this observation, we used two-dimensional SDS-PAGE to investigate the multimerization properties of XcpT and HxcT (Fig. 6*A*). This technique consists in loading a cell extract containing the full-length pseudopilin on a SDS-PAGE and in proceeding with migration (first dimension). After migration, a band of gel corresponding to one lane of loaded sample is cut out on its entire length, laid down on top of a second SDS-PAGE (second dimension), and run without heat treatment perpendicular to the first dimension. The migration in the second dimension triggered a local increase of the concentration of pseudopilin subunits before they enter in the running gel. This leads to spontaneous multimerization of pseudopilins which are intrinsically capable of doing so. Using this technique we visualized the multimerization of XcpT (Fig. 6*A*(*1*)), marked by the *bracket*) but not that of the wild-type form of HxcT (Fig. 6*A*(*2*)). However, HxcTmut6 (Fig. 6*A*(*3*)) is clearly able to form multimers to the same extent as XcpT does. We thus found a correlation between the ability of pseudopilins to form multimers in these conditions and their ability to restore the Xcp-related phenotypes (secretion on lipid agar plate and HPP assembly).

Type IV pili and T2SS-associated pseudopili are formed by the helical organization of pilins and pseudopilins, respectively, stabilized by the hydrophobic contacts between the N-terminal α-helices tightly packed in the filament core. However, the position of the soluble domains of pilin/pseudopilin subunits close to the fiber axis does not exclude their involvement in intersubunits contact. Moreover, the soluble domains of pseudopilins are stable, easy to purify in large amount, and thus amenable to *in vitro* biochemical assays (20). We therefore purified the XcpT- and HxcT-soluble/periplasmic domains (designated as XcpTp and HxcTp, respectively) and subjected them to chemical cross-linking to assess their multimerization properties. Upon paraformaldehyde treatment, XcpTp forms various multimeric species, from dimer to tetramer (Fig. 6*B*, *lane 1*), whereas HxcTp is unable to form any oligomeric forms in the same conditions, and only the monomeric species is detected (Fig. 6*B*, *lane 2*). This result confirms that HxcT is unable to multimerize in conditions where XcpT does.

In conclusion, we demonstrated that the intrinsic difference between the T2SS major pseudopilins XcpT and HxcT relies on the ability to multimerize. Therefore, the reason why HxcT in unable to substitute for XcpT in the Xcp-dependent secretion might reside in its limited multimerization capacity, which reflects likely different pseudopilus organization in Xcp and Hxc T2SS.

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on August 25, 2011

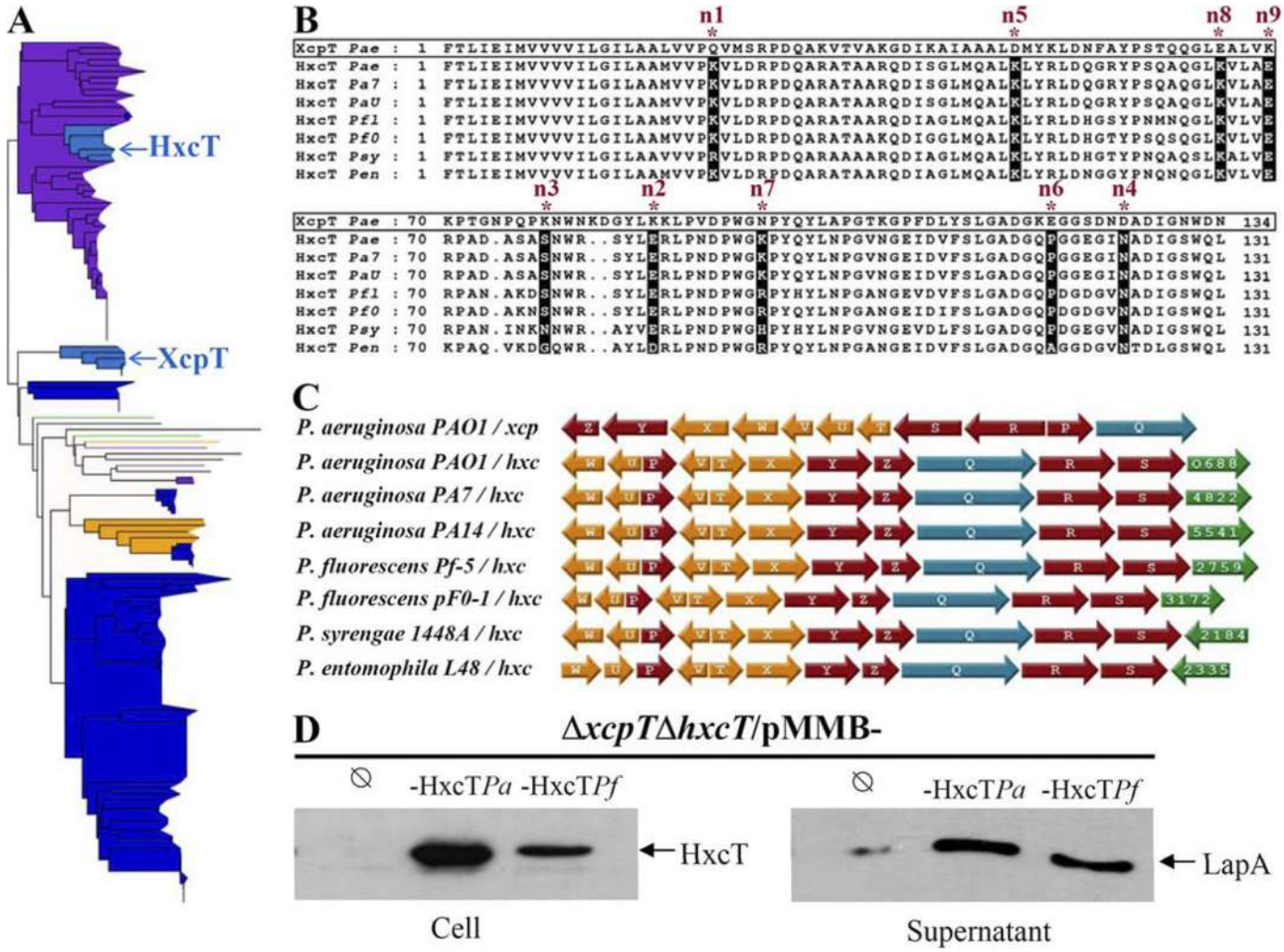


FIGURE 7. **HxcT major pseudopilin phylogeny.** *A*, maximum likelihood unrooted phylogenetic tree based on the D2 alignment (145 sequences, 114 positions). Taxonomic groups are indicated by colors: *green*, Delta/Epsilonproteobacteria; *purple*, Betaproteobacteria; *dark blue*, Gammaproteobacteria; *light blue*, cluster of Gammaproteobacteria containing *P. aeruginosa* PAO1 sequences; *yellow*, Alphaproteobacteria; *pink*, Firmicutes; *red*, Aquificae; *black*, other bacteria). The *scale bar* represents the inferred average number of substitution per site. This phylogeny is available in expanded format in supplemental Fig. S3*A*. *B*, sequences alignment of the seven HxcT-like major pseudopilins found in the *Pseudomonas* genus. The sequence of XcpT from *P. aeruginosa* (*boxed*) was aligned against the seven HxcT isolated in the phylogenetic tree. The nine positions selected in HxcT are indicated by *asterisks*. Their conservation among HxcT-like pseudopilins is highlighted in *black*. The gene identification (gi) numbers: Pa7, *Pseudomonas aeruginosa* PA7 (gi 152986054); PaU, *P. aeruginosa* PA14 (gi 116048588); Pfl, *P. fluorescens* Pf-5 (gi 70730120); Pf0, *P. fluorescens* Pf0–1 (gi 77459401); Psy, *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A (gi 71735284); Pen, *P. entomophila* L48 (gi 104781443); and Pae, *P. aeruginosa* PAO1 (gi 15598297 and 15595878) for XcpT and HxcT, respectively. *C*, genetic organization of the seven T2SS gene clusters involving one of the seven *hxcT* identified compared with the classical genetic organization found in *xcpT*-like T2SSs. Pseudopilin-encoding genes are in *yellow*, inner membrane platform-encoding genes are in *red*, and secretin-encoding genes in are *blue*. In *green* are represented putative substrate-encoding genes (PA numbers labeled *inside*) systematically found in *hxc*-type clusters. *D*, phenotypic complementation of *P. aeruginosa* PAO1 *hxcT* (*hxcTPa*) by *P. fluorescens* Pf-5 *hxcT* (*hxcTPf*). SDS-PAGE and Western blot of cell extracts (cell) and supernatant fractions are shown. Bacteria were grown in phosphate-limiting conditions. The equivalent of 0.2 (cell) or 0.4 (supernatant) A_{600} has been loaded in each well. Samples were first run on a 15% (cell) or 8% (supernatant) SDS-PAGE, the membrane was revealed by anti-HxcT (*left*) or anti-LapA (*right*) antibodies. An *arrow* indicates the position of the proteins.

HxcT and Relatives Form a Subfamily within the Type II Pseudopilin Family—In a recent study (7), we solved the three-dimensional structure of XcpT, revealing that the previously called variable pilin region is in fact highly conserved among major type II pseudopilins and constitutes a specific consensus motif to specifically distinguish them from type IV pilins. This also suggests that both proteins form distinct but homologous families. This observation is in agreement with the maximum likelihood (ML) phylogeny showing that type IV pilins and type II pseudopilins form distinct monophyletic groups (bootstrap value = 100%) separated by an important evolutionary distance (see the length of the branch connecting both groups in supplemental Fig. S1). By contrast, the evolutionary distance separating the two major pseudopilins of *P. aeruginosa* PAO1 is quite small, and both sequences grouped within the well supported monophyletic group that contains all the major pseudopilins (bootstrap value = 100%; supplemental Fig. S1). To examine in more detail the phylogenetic relationships between *P. aeruginosa* PAO1 XcpT and HxcT and other major pseudopilins, we performed an analysis involving the 145 major pseudopilins we described previously (7). The resulting ML tree shows some major inconsistencies with organism taxonomy (*e.g.* some sequences from different taxonomic groups are mixed in the tree; Fig. 7*A* and supplemental Fig. S2), indicating that horizontal gene transfers occurred during the evolution of type II major pseudopilins. Interestingly, *P. aeruginosa* PAO1 HxcT is nested

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on August 25, 2011

together with six other *Pseudomonas* (two *P. aeruginosa*, one *Pseudomonas entomophila*, two *P. fluorescens*, and one *Pseudomonas syringae*) sequences within a large cluster of 40 Betaproteobacteria (purple group, bootstrap value = 92%, Fig. 7*A* and supplemental Fig. S2). By contrast, the *P. aeruginosa* PAO1 XcpT together with five other *Pseudomonas* sequences form an isolated monophyletic cluster (Fig. 7*A* and supplemental Fig. S2). The closer (and well supported) relationship observed between HxcT and Betaproteobacterial sequences (but not XcpT) excludes the possibility that the two *P. aeruginosa* PAO1 major pseudopilins results from a duplication event. On the contrary, this strongly suggests that *P. aeruginosa* PAO1 and a few other *Pseudomonas* species have acquired their HxcT genes from Betaproteobacteria. The same interpretation could be proposed to explain the emergence of the two *Strenotrophomonas* (Gammaproteobacteria) sequences within Betaproteobacteria (supplemental Fig. S2). The two T2SS major pseudopilins in *P. aeruginosa* PAO1 have therefore two distinct evolutionary origins and may represent two distinct subfamilies of major pseudopilins. Importantly, the emergence of *P. aeruginosa* PAO1 HxcT within Betaproteobacteria is recovered when a larger set of major pseudopilin homologs (dataset D3) is considered (supplemental Fig. S3), indicating that our result is not the consequence of a bias in the taxonomic sampling.

The presence of *P. aeruginosa* HxcT close homologs in six *Pseudomonas* species indicates that the transfer might be ancient in this genus or that secondary horizontal gene transfers occurred among those *Pseudomonas* species after the initial acquisition of an HxcT gene by one of them. The high similarity among those seven *Pseudomonas* sequences (in particular the conservation of the nine residues) (Fig. 7*B*) together with the conservation of the singular genetic organization found in *P. aeruginosa* PAO1 Hxc T2SS (Fig. 7*C*) underline the similarity of the T2SS systems in those species. The functional redundancy among the seven identified HxcT homologs is confirmed by the complementation of a *P. aeruginosa* PAO1 *hxcT* mutant by the *hxcT* allele of *P. fluorescens* (Fig. 7*D*).

DISCUSSION

Among the different protein secretion mechanisms found in Gram-negative bacteria, the type II secretion process remains one of the less understood. In analogy with the type IV piliation system, several reports are proposing the involvement of a pilus-like structure, called pseudopilus, in the type II secretion process. Since the discovery in *P. aeruginosa* of a second T2SS secreting its own substrate (16), we wondered why the bacteria acquired a complete second system for the secretion of one more T2SS-dependent protein instead of adding LapA to the dozen of others exoproteins traveling through the Xcp system. Our phylogenetic analyses provide an explanation: HxcT and likely the whole Hxc system, including LapA, was acquired by *P. aeruginosa* PAO1 and a few other *Pseudomonas* species through horizontal gene transfers from a betaproteobacterium and is not the result of an evolutionary process that occurred after a duplication event in the *Pseudomonas* lineage. The conservation of both Hxc and Xcp systems in *P. aeruginosa* PAO1 suggests that they may represent two distinct subfamilies of T2SSs.

We are proposing that the secretion process of the Hxc T2SS of *P. aeruginosa* is animated by a pseudopilus whose structure and stability may differ from the one commonly found in Xcp and other known T2SSs. Our study shows that modifying HxcT for nine selected residues conserved in XcpT-like protein is sufficient to convert HxcT into a classical compatible major pseudopilin. We gradually substituted the nine residues and observed after introducing the fifth mutation that we were able to restore HPP formation and Xcp-dependent secretion. In our view, the first five mutations are of the most importance because from the HxcTmut5 mutant the phenotypic conversion is obtained, and further substitutions in this mutant form only improved HPP formation and Xcp-dependent secretion. These five mutations are K23Q (n1), E84K (n2), S77K (n3), N123D (n4), and K48D (n5). We hypothesized that restoring those substitutions would restore favorable interactions that would allow the HPP formation. A recent report (28) presents a detailed assembly model of the *K. oxytoca* Pul-dependent type II secretion pilus. Because XcpT is able to substitute PulG for HPP formation in the Pul system (15), the pseudopilus model proposed in this study could be applicable to the XcpT pseudopilus. Strikingly, our structure-based mutagenesis that turned HxcT into an XcpT-compatible pseudopilin indeed highlighted amino acids known to be essential for the PulG/XcpT type of pseudopilus (28). By mapping our mutations onto the PulG pseudopilus model, we are able to describe the effect of each mutation and therefore their potential impact on pilus formation. Taken together, the mutations n2 and n5 reestablish an intermolecular salt bridge between Lys^{84} and Asp^{48}. This salt bridge has been demonstrated to be essential for PulG/XcpT pseudopilus formation (28). The mutations n3 and n4 are also correlated because substituting these two residues (S77K and N123D) has two consequences. Indeed, the residue Lys^{77} in XcpT (Arg^{78} in PulG) is involved in (i) the establishment of a salt bridge with the residue Asp^{32} of another protomer and (ii) the restoration of a positive patch, composed of residues Arg^{51}, Arg^{56}, and Lys^{77}, which interacts with a negative patch of another protomer composed of acidic residues Asp^{114} and Asp^{123}. Interestingly Campos *et al.* (28) proceeded to the charge inversion of Arg^{87} and Asp^{48} into Glu^{87} and Lys^{48}, which exactly correspond to the residues present in HxcT. These residues Lys^{48} (Asp^{48} of PulG) and Glu^{84} (Arg^{87} in PulG) are also able to form a salt bridge, but this potential salt bridge is not important for Hxc pseudopilus because the HxcTmut2 variant (Lys^{84}/Lys^{48}) cannot form a salt bridge but is still functional in Hxc-dependent secretion (Fig. 5). The mutation n2 disrupts this interaction by replacing Glu^{84} by Lys^{84} (the couple Lys^{48}/Lys^{84} precludes the formation of a salt bridge). We confirm the absolute requirement of this Lys^{84}/Asp^{48} salt bridge for Xcp secretion because its absence in the first six substitutions fully abolished the phenotypic restoration, as demonstrated by the mutant HxcTmut6Δn5 (Fig. 4).

Interestingly, our study reveals a clear coupling between pseudopilus formation and protein secretion in classical T2SS. We indeed observed that during the process of the mutagenesis both protein secretion and HPP formation phenotypes were

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on August 25, 2011

concomitantly reverted, thus suggesting that a high degree of major pseudopilin multimerization is not only required but essential for protein secretion in classical T2SSs such as Xcp. We are showing that HxcT is unable to reach such a level of multimerization, indicating that the multimerization capacity associated with the nine conserved XcpT residues is dispensable for Hxc secretion, strengthening our idea that different core assembly might exist between Hxc-like and Xcp-like pseudopili.

Major pseudopilins are not directly involved in substrate recognition because various GspGs are able to replace PulG in Pullulanase secretion by the Pul secreton (15). Therefore, we do not think that XcpT and HxcT are involved in the direct recognition of the substrate. However, we do think that the degree of pseudopilus polymerization does indirectly matter in substrate recognition through another secreton component. The fact that Xcp-compatible HxcT variants are still able to support secretion of the Hxc substrate indicates that other motifs are involved in substrate recognition.

In conclusion, we clearly established that two subfamilies of T2SS which differ by the assembly characteristic of their pseudopili could now be identified. We therefore propose to name them T2aSS and T2bSS for Xcp- and Hxc-type systems, respectively. The next challenge will be to understand why specific residues allowing HPP formation in T2aSS are not required in T2bSS secretion. Such evolution of a secretory machine was previously reported for type V secretion and revealed in one case the alternative widespread T5dSS (29) and in the other case the singular P-Usher transporter (30). Those findings together with the present T2bSS demonstrate how similar bacterial machineries evolve toward distinct mechanisms that may contribute specific functions.

Acknowledgment—We are grateful to Mariella Tegoni for constant interest in this work.

REFERENCES

1. Economou, A., Christie, P. J., Fernandez, R. C., Palmer, T., Plano, G. V., and Pugsley, A. P. (2006) *Mol. Microbiol.* **62,** 308–319
2. Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M. L., Lazdunski, A., Wu, L. F., and Filloux, A. (2001) *EMBO J.* **20,** 6735–6741
3. Michel, G. P., and Voulhoux, R. (2009) in *Bacterial Secreted Proteins* (Wooldridge, K., ed) Vol. 1, pp. 67–92, Caister Academic Press, Norfolk, UK
4. Filloux, A. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1694,** 163–179
5. Bally, M., Filloux, A., Akrim, M., Ball, G., Lazdunski, A., and Tommassen, J. (1992) *Mol. Microbiol.* **6,** 1121–1131
6. Bleves, S., Voulhoux, R., Michel, G., Lazdunski, A., Tommassen, J., and Filloux, A. (1998) *Mol. Microbiol.* **27,** 31–40
7. Alphonse, S., Durand, E., Douzi, B., Waegele, B., Darbon, H., Filloux, A., Voulhoux, R., and Bernard, C. (2010) *J. Struct. Biol.* **169,** 75–80
8. Korotkov, K. V., and Hol, W. G. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15,** 462–468
9. Lam, A. Y., Pardon, E., Korotkov, K. V., Hol, W. G., and Steyaert, J. (2009) *J. Struct. Biol.* **166,** 8–15
10. Yanez, M. E., Korotkov, K. V., Abendroth, J., and Hol, W. G. (2008) *J. Mol. Biol.* **377,** 91–103
11. Yanez, M. E., Korotkov, K. V., Abendroth, J., and Hol, W. G. (2008) *J. Mol. Biol.* **375,** 471–486
12. Nunn, D. N., and Lory, S. (1993) *J. Bacteriol.* **175,** 4375–4382
13. Durand, E., Bernadac, A., Ball, G., Lazdunski, A., Sturgis, J. N., and Filloux, A. (2003) *J. Bacteriol.* **185,** 2749–2758
14. Hu, N. T., Leu, W. M., Lee, M. S., Chen, A., Chen, S. C., Song, Y. L., and Chen, L. Y. (2002) *Biochem. J.* **365,** 205–211
15. Vignon, G., Köhler, R., Larquet, E., Giroux, S., Prévost, M. C., Roux, P., and Pugsley, A. P. (2003) *J. Bacteriol.* **185,** 3416–3428
16. Ball, G., Durand, E., Lazdunski, A., and Filloux, A. (2002) *Mol. Microbiol.* **43,** 475–485
17. Viarre, V., Cascales, E., Ball, G., Michel, G. P., Filloux, A., and Voulhoux, R. (2009) *J. Biol. Chem.* **284,** 33815–33823
18. Durand, E., Michel, G., Voulhoux, R., Kürner, J., Bernadac, A., and Filloux, A. (2005) *J. Biol. Chem.* **280,** 31378–31389
19. Kagami, Y., Ratliff, M., Surber, M., Martinez, A., and Nunn, D. N. (1998) *Mol. Microbiol.* **27,** 221–233
20. Douzi, B., Durand, E., Bernard, C., Alphonse, S., Cambillau, C., Filloux, A., Tegoni, M., and Voulhoux, R. (2009) *J. Biol. Chem.* **284,** 34580–34589
21. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25,** 3389–3402
22. Katoh, K., and Toh, H. (2008) *Brief Bioinform.* **9,** 286–298
23. Philippe, H. (1993) *Nucleic Acids Res.* **21,** 5264–5272
24. de Groot, A., Koster, M., Gérard-Vincent, M., Gerritse, G., Lazdunski, A., Tommassen, J., and Filloux, A. (2001) *J. Bacteriol.* **183,** 959–967
25. de Groot, A., Krijger, J. J., Filloux, A., and Tommassen, J. (1996) *Mol. Gen. Genet.* **250,** 491–504
26. Craig, L., Volkmann, N., Arvai, A. S., Pique, M. E., Yeager, M., Egelman, E. H., and Tainer, J. A. (2006) *Mol. Cell* **23,** 651–662
27. Korotkov, K. V., Gray, M. D., Kreger, A., Turley, S., Sandkvist, M., and Hol, W. G. (2009) *J. Biol. Chem.* **284,** 25466–25470
28. Campos, M., Nilges, M., Cisneros, D. A., and Francetic, O. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107,** 13081–13086
29. Salacha, R., Kovaciæ, F., Brochier-Armanet, C., Wilhelm, S., Tommassen, J., Filloux, A., Voulhoux, R., and Bleves, S. (2010) *Environ. Microbiol.* **12,** 1498–1512
30. Ruer, S., Ball, G., Filloux, A., and de Bentzmann, S. (2008) *EMBO J.* **27,** 2669–2680

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on August 25, 2011

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abendroth, J., Bagdasarian, M., Sandkvist, M., and Hol, W.G. (2004a). The structure of the cytoplasmic domain of EpsL, an inner membrane component of the type II secretion system of Vibrio cholerae: an unusual member of the actin-like ATPase superfamily. J Mol Biol *344*, 619-633.

Abendroth, J., Kreger, A.C., and Hol, W.G. (2009a). The dimer formed by the periplasmic domain of EpsL from the Type 2 Secretion System of Vibrio parahaemolyticus. J Struct Biol *168*, 313-322.

Abendroth, J., Mitchell, D.D., Korotkov, K.V., Johnson, T.L., Kreger, A., Sandkvist, M., and Hol, W.G. (2009b). The three-dimensional structure of the cytoplasmic domains of EpsF from the type 2 secretion system of Vibrio cholerae. J Struct Biol *166*, 303-315.

Abendroth, J., Murphy, P., Sandkvist, M., Bagdasarian, M., and Hol, W.G. (2005). The X-ray structure of the type II secretion system complex formed by the N-terminal domain of EpsE and the cytoplasmic domain of EpsL of Vibrio cholerae. J Mol Biol *348*, 845-855.

Abendroth, J., Rice, A.E., McLuskey, K., Bagdasarian, M., and Hol, W.G. (2004b). The crystal structure of the periplasmic domain of the type II secretion system protein EpsM from Vibrio cholerae: the simplest version of the ferredoxin fold. J Mol Biol *338*, 585-596.

Arts, J., de Groot, A., Ball, G., Durand, E., El Khattabi, M., Filloux, A., Tommassen, J., and Koster, M. (2007). Interaction domains in the Pseudomonas aeruginosa type II secretory apparatus component XcpS (GspF). Microbiology *153*, 1582-1592.

Ayers, M., Sampaleanu, L.M., Tammam, S., Koo, J., Harvey, H., Howell, P.L., and Burrows, L.L. (2009). PilM/N/O/P proteins form an inner membrane complex that affects the stability of the Pseudomonas aeruginosa type IV pilus secretin. J Mol Biol *394*, 128-142.

B

Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J., and McCammon, J.A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 10037-10041.

Ball, G., Chapon-Herve, V., Bleves, S., Michel, G., and Bally, M. (1999). Assembly of XcpR in the cytoplasmic membrane is required for extracellular protein secretion in Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol *181*, 382-388.

Bally, M., Filloux, A., Akrim, M., Ball, G., Lazdunski, A., and Tommassen, J. (1992). Protein secretion in Pseudomonas aeruginosa: characterization of seven xcp genes and processing of secretory apparatus components by prepilin peptidase. Mol Microbiol *6*, 1121-1131.

Bassford, P., Beckwith, J., Ito, K., Kumamoto, C., Mizushima, S., Oliver, D., Randall, L., Silhavy, T., Tai, P.C., and Wickner, B. (1991). The primary pathway of protein export in E. coli. Cell *65*, 367-368.

Berks, B.C., Palmer, T., and Sargent, F. (2005). Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. Curr Opin Microbiol *8*, 174-181.

Bitter, W., Koster, M., Latijnhouwers, M., de Cock, H., and Tommassen, J. (1998). Formation of oligomeric rings by XcpQ and PilQ, which are involved in protein transport across the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa. Mol Microbiol *27*, 209-219.

Bleves, S., Gerard-Vincent, M., Lazdunski, A., and Filloux, A. (1999). Structure-function analysis of XcpP, a component involved in general secretory pathway-dependent protein secretion in Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol *181*, 4012-4019.

Bleves, S., Lazdunski, A., and Filloux, A. (1996). Membrane topology of three Xcp proteins involved in exoprotein transport by Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol *178*, 4297-4300.

Bleves, S., Voulhoux, R., Michel, G., Lazdunski, A., Tommassen, J., and Filloux, A. (1998). The secretion apparatus of Pseudomonas aeruginosa: identification of a fifth pseudopilin, XcpX (GspK family). Mol Microbiol *27*, 31-40.

Brillet, K., Journet, L., Celia, H., Paulus, L., Stahl, A., Pattus, F., and Cobessi, D. (2007). A beta strand lock exchange for signal transduction in TonB-dependent transducers on the basis of a common structural motif. Structure *15*, 1383-1391.

Brok, R., Van Gelder, P., Winterhalter, M., Ziese, U., Koster, A.J., de Cock, H., Koster, M., Tommassen, J., and Bitter, W. (1999). The C-terminal domain of the Pseudomonas secretin XcpQ forms oligomeric rings with pore activity. J Mol Biol *294*, 1169-1179.

Buchanan, G., de Leeuw, E., Stanley, N.R., Wexler, M., Berks, B.C., Sargent, F., and Palmer, T. (2002). Functional complexity of the twin-arginine translocase TatC component revealed by site-directed mutagenesis. Mol Microbiol *43*, 1457-1470.

Burghout, P., Beckers, F., de Wit, E., van Boxtel, R., Cornelis, G.R., Tommassen, J., and Koster, M. (2004). Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in Yersinia enterocolitica. J Bacteriol *186*, 5366-5375.

C

Camberg, J.L., Johnson, T.L., Patrick, M., Abendroth, J., Hol, W.G., and Sandkvist, M. (2007). Synergistic stimulation of EpsE ATP hydrolysis by EpsL and acidic phospholipids. EMBO J *26*, 19-27.

Camberg, J.L., and Sandkvist, M. (2005). Molecular analysis of the Vibrio cholerae type II secretion ATPase EpsE. J Bacteriol *187*, 249-256.

Campos, M., Francetic, O., and Nilges, M. (2010a). Modeling pilus structures from sparse data. J Struct Biol *173*, 436-444.

Campos, M., Nilges, M., Cisneros, D.A., and Francetic, O. (2010b). Detailed structural and assembly model of the type II secretion pilus from sparse data. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 13081-13086.

Chami, M., Guilvout, I., Gregorini, M., Remigy, H.W., Muller, S.A., Valerio, M., Engel, A., Pugsley, A.P., and Bayan, N. (2005). Structural insights into the secretin PulD and its trypsin-resistant core. J Biol Chem *280*, 37732-37741.

Chen, Y., Shiue, S.J., Huang, C.W., Chang, J.L., Chien, Y.L., Hu, N.T., and Chan, N.L. (2005). Structure and function of the XpsE N-terminal domain, an essential component of the Xanthomonas campestris type II secretion system. J Biol Chem *280*, 42356-42363.

Cianciotto, N.P. (2005). Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. Trends Microbiol *13*, 581-588.

Cianciotto, N.P. (2009). Many substrates and functions of type II secretion: lessons learned from Legionella pneumophila. Future Microbiol *4*, 797-805.

Clausen, M., Jakovljevic, V., Sogaard-Andersen, L., and Maier, B. (2009a). High-force generation is a conserved property of type IV pilus systems. J Bacteriol *191*, 4633-4638.

Clausen, M., Koomey, M., and Maier, B. (2009b). Dynamics of type IV pili is controlled by switching between multiple states. Biophys J *96*, 1169-1177.

Collins, R.F., Davidsen, L., Derrick, J.P., Ford, R.C., and Tonjum, T. (2001). Analysis of the PilQ secretin from Neisseria meningitidis by transmission electron microscopy reveals a dodecameric quaternary structure. J Bacteriol *183*, 3825-3832.

Collins, R.F., Frye, S.A., Balasingham, S., Ford, R.C., Tonjum, T., and Derrick, J.P. (2005). Interaction with type IV pili induces structural changes in the bacterial outer membrane secretin PilQ. J Biol Chem *280*, 18923-18930.

Collins, R.F., Frye, S.A., Kitmitto, A., Ford, R.C., Tonjum, T., and Derrick, J.P. (2004). Structure of the Neisseria meningitidis outer membrane PilQ secretin complex at 12 A resolution. J Biol Chem *279*, 39750-39756.

Crago, A.M., and Koronakis, V. (1998). Salmonella InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization. Mol Microbiol *30*, 47-56.

Craig, L., and Li, J. (2008). Type IV pili: paradoxes in form and function. Curr Opin Struct Biol *18*, 267-277.

Craig, L., Pique, M.E., and Tainer, J.A. (2004). Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. Nat Rev Microbiol *2*, 363-378.

Craig, L., Taylor, R.K., Pique, M.E., Adair, B.D., Arvai, A.S., Singh, M., Lloyd, S.J., Shin, D.S., Getzoff, E.D., Yeager, M., Forest, K.T., and Tainer, J.A. (2003). Type IV pilin structure and assembly: X-ray and EM analyses of Vibrio cholerae toxin-coregulated pilus and Pseudomonas aeruginosa PAK pilin. Mol Cell *11*, 1139-1150.

Craig, L., Volkmann, N., Arvai, A.S., Pique, M.E., Yeager, M., Egelman, E.H., and Tainer, J.A. (2006). Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions. Mol Cell *23*, 651-662.

d'Enfert, C., Chapon, C., and Pugsley, A.P. (1987). Export and secretion of the lipoprotein pullulanase by Klebsiella pneumoniae. Mol Microbiol *1*, 107-116.

D

D'Enfert, C., and Pugsley, A.P. (1989). Klebsiella pneumoniae pulS gene encodes an outer membrane lipoprotein required for pullulanase secretion. J Bacteriol *171*, 3673-3679.

Daefler, S., Guilvout, I., Hardie, K.R., Pugsley, A.P., and Russel, M. (1997). The C-terminal domain of the secretin PulD contains the binding site for its cognate chaperone, PulS, and confers PulS dependence on pIVf1 function. Mol Microbiol *24*, 465-475.

de Groot, A., Filloux, A., and Tommassen, J. (1991). Conservation of xcp genes, involved in the two-step protein secretion process, in different Pseudomonas species and other gram-negative bacteria. Mol Gen Genet *229*, 278-284.

de Groot, A., Koster, M., Gerard-Vincent, M., Gerritse, G., Lazdunski, A., Tommassen, J., and Filloux, A. (2001). Exchange of Xcp (Gsp) secretion machineries between Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas alcaligenes: species specificity unrelated to substrate recognition. J Bacteriol *183*, 959-967.

de Vries, S.J., and Bonvin, A.M. CPORT: a consensus interface predictor and its performance in prediction-driven docking with HADDOCK. PLoS One *6*, e17695.

DebRoy, S., Dao, J., Soderberg, M., Rossier, O., and Cianciotto, N.P. (2006). Legionella pneumophila type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes bacterial persistence in the lung. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 19146-19151.

Dominguez, C., Boelens, R., and Bonvin, A.M. (2003). HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. J Am Chem Soc *125*, 1731-1737.

Douet, V., Loiseau, L., Barras, F., and Py, B. (2004). Systematic analysis, by the yeast two-hybrid, of protein interaction between components of the type II secretory machinery of Erwinia chrysanthemi. Res Microbiol *155*, 71-75.

Driessen, A.J., and Nouwen, N. (2008). Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. Annu Rev Biochem *77*, 643-667.

Durand, E., Bernadac, A., Ball, G., Lazdunski, A., Sturgis, J.N., and Filloux, A. (2003). Type II protein secretion in Pseudomonas aeruginosa: the pseudopilus is a multifibrillar and adhesive structure. J Bacteriol *185*, 2749-2758.

Durand, E., Michel, G., Voulhoux, R., Kurner, J., Bernadac, A., and Filloux, A. (2005). XcpX controls biogenesis of the Pseudomonas aeruginosa XcpT-containing pseudopilus. J Biol Chem *280*, 31378-31389.

Durand, E., Verger, D., Rego, A.T., Chandran, V., Meng, G., Fronzes, R., and Waksman, G. (2009). Structural biology of bacterial secretion systems in gram-negative pathogens--potential for new drug targets. Infect Disord Drug Targets *9*, 518-547.

F

Feucht, A., Lucet, I., Yudkin, M.D., and Errington, J. (2001). Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of Bacillus subtilis. Mol Microbiol *40*, 115-125.

Filloux, A. (2004). The underlying mechanisms of type II protein secretion. Biochim Biophys Acta *1694*, 163-179.

Filloux, A., Bally, M., Ball, G., Akrim, M., Tommassen, J., and Lazdunski, A. (1990). Protein secretion in gram-negative bacteria: transport across the outer membrane involves common mechanisms in different bacteria. EMBO J *9*, 4323-4329.

Filloux, A., Michel, G., and Bally, M. (1998). GSP-dependent protein secretion in gram-negative bacteria: the Xcp system of Pseudomonas aeruginosa. FEMS Microbiol Rev *22*, 177-198.

Forest, K.T. (2008). The type II secretion arrowhead: the structure of GspI-GspJ-GspK. Nat Struct Mol Biol *15*, 428-430.

Forest, K.T., and Tainer, J.A. (1997). Type-4 pilus-structure: outside to inside and top to bottom--a minireview. Gene *192*, 165-169.

Francetic, O., Buddelmeijer, N., Lewenza, S., Kumamoto, C.A., and Pugsley, A.P. (2007). Signal recognition particle-dependent inner membrane targeting of the PulG Pseudopilin component of a type II secretion system. J Bacteriol *189*, 1783-1793.

Francetic, O., and Pugsley, A.P. (2005). Towards the identification of type II secretion signals in a nonacylated variant of pullulanase from Klebsiella oxytoca. J Bacteriol *187*, 7045-7055.

G

Genin, S., and Boucher, C.A. (1994). A superfamily of proteins involved in different secretion pathways in gram-negative bacteria: modular structure and specificity of the N-terminal domain. Mol Gen Genet *243*, 112-118.

Gerard-Vincent, M., Robert, V., Ball, G., Bleves, S., Michel, G.P., Lazdunski, A., and Filloux, A. (2002). Identification of XcpP domains that confer functionality and specificity to the Pseudomonas aeruginosa type II secretion apparatus. Mol Microbiol *44*, 1651-1665.

Gohlke, U., Pullan, L., McDevitt, C.A., Porcelli, I., de Leeuw, E., Palmer, T., Saibil, H.R., and Berks, B.C. (2005). The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 10482-10486.

Gray, M.D., Bagdasarian, M., Hol, W.G., and Sandkvist, M. (2011). In vivo cross-linking of EpsG to EpsL suggests a role for EpsL as an ATPase-pseudopilin coupling protein in the Type II secretion system of Vibrio cholerae. Mol Microbiol *79*, 786-798.

Guilvout, I., Chami, M., Engel, A., Pugsley, A.P., and Bayan, N. (2006). Bacterial outer membrane secretin PulD assembles and inserts into the inner membrane in the absence of its pilotin. EMBO J *25*, 5241-5249.

Guilvout, I., Hardie, K.R., Sauvonnet, N., and Pugsley, A.P. (1999). Genetic dissection of the outer membrane secretin PulD: are there distinct domains for multimerization and secretion specificity? J Bacteriol *181*, 7212-7220.

H

Hager, A.J., Bolton, D.L., Pelletier, M.R., Brittnacher, M.J., Gallagher, L.A., Kaul, R., Skerrett, S.J., Miller, S.I., and Guina, T. (2006). Type IV pili-mediated secretion modulates Francisella virulence. Mol Microbiol *62*, 227-237.

Hardie, K.R., Lory, S., and Pugsley, A.P. (1996a). Insertion of an outer membrane protein in Escherichia coli requires a chaperone-like protein. EMBO J *15*, 978-988.

Hardie, K.R., Seydel, A., Guilvout, I., and Pugsley, A.P. (1996b). The secretin-specific, chaperone-like protein of the general secretory pathway: separation of proteolytic protection and piloting functions. Mol Microbiol *22*, 967-976.

Hazes, B., and Frost, L. (2008). Towards a systems biology approach to study type II/IV secretion systems. Biochim Biophys Acta *1778*, 1839-1850.

Hazes, B., Sastry, P.A., Hayakawa, K., Read, R.J., and Irvin, R.T. (2000). Crystal structure of Pseudomonas aeruginosa PAK pilin suggests a main-chain-dominated mode of receptor binding. J Mol Biol *299*, 1005-1017.

Hobbs, M., and Mattick, J.S. (1993). Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. Mol Microbiol *10*, 233-243.

Holm, L., and Rosenstrom, P. Dali server: conservation mapping in 3D. Nucleic Acids Res *38*, W545-549.

Howard, S.P., Critch, J., and Bedi, A. (1993). Isolation and analysis of eight exe genes and their involvement in extracellular protein secretion and outer membrane assembly in Aeromonas hydrophila. J Bacteriol *175*, 6695-6703.

Hu, N.T., Leu, W.M., Lee, M.S., Chen, A., Chen, S.C., Song, Y.L., and Chen, L.Y. (2002). XpsG, the major pseudopilin in Xanthomonas campestris pv. campestris, forms a pilus-like structure between cytoplasmic and outer membranes. Biochem J *365*, 205-211.

J

Johnson, T.L., Abendroth, J., Hol, W.G., and Sandkvist, M. (2006). Type II secretion: from structure to function. FEMS Microbiol Lett *255*, 175-186.

Jones, S., and Thornton, J.M. (1996). Principles of protein-protein interactions. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 13-20.

Jongbloed, J.D., Martin, U., Antelmann, H., Hecker, M., Tjalsma, H., Venema, G., Bron, S., van Dijl, J.M., and Muller, J. (2000). TatC is a specificity determinant for protein secretion via the twin-arginine translocation pathway. J Biol Chem *275*, 41350-41357.

K

Karuppiah, V., and Derrick, J.P. (2011). Structure of the PilM-PilN inner membrane type IV pilus biogenesis complex from Thermus thermophilus. J Biol Chem.

Kazmierczak, B.I., Mielke, D.L., Russel, M., and Model, P. (1994). pIV, a filamentous phage protein that mediates phage export across the bacterial cell envelope, forms a multimer. J Mol Biol *238*, 187-198.

Kennedy, M.B. (1995). Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. Trends Biochem Sci *20*, 350.

Kohler, R., Schafer, K., Muller, S., Vignon, G., Diederichs, K., Philippsen, A., Ringler, P., Pugsley, A.P., Engel, A., and Welte, W. (2004). Structure and assembly of the pseudopilin PulG. Mol Microbiol *54*, 647-664.

Korotkov, K.V., Gonen, T., and Hol, W.G. (2011). Secretins: dynamic channels for protein transport across membranes. Trends Biochem Sci.

Korotkov, K.V., Gray, M.D., Kreger, A., Turley, S., Sandkvist, M., and Hol, W.G. (2009a). Calcium is essential for the major pseudopilin in the type 2 secretion system. J Biol Chem *284*, 25466-25470.

Korotkov, K.V., and Hol, W.G. (2008). Structure of the GspK-GspI-GspJ complex from the enterotoxigenic Escherichia coli type 2 secretion system. Nat Struct Mol Biol *15*, 462-468.

Korotkov, K.V., Krumm, B., Bagdasarian, M., and Hol, W.G. (2006). Structural and functional studies of EpsC, a crucial component of the type 2 secretion system from Vibrio cholerae. J Mol Biol *363*, 311-321.

Korotkov, K.V., Pardon, E., Steyaert, J., and Hol, W.G. (2009b). Crystal structure of the N-terminal domain of the secretin GspD from ETEC determined with the assistance of a nanobody. Structure *17*, 255-265.

Koster, M., Bitter, W., de Cock, H., Allaoui, A., Cornelis, G.R., and Tommassen, J. (1997). The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of Yersinia enterocolitica forms a ring-shaped multimeric complex. Mol Microbiol *26*, 789-797.

Kuo, W.W., Kuo, H.W., Cheng, C.C., Lai, H.L., and Chen, L.Y. (2005). Roles of the minor pseudopilins, XpsH, XpsI and XpsJ, in the formation of XpsG-containing pseudopilus in Xanthomonas campestris pv. campestris. J Biomed Sci *12*, 587-599.

L

Lario, P.I., Pfuetzner, R.A., Frey, E.A., Creagh, L., Haynes, C., Maurelli, A.T., and Strynadka, N.C. (2005). Structure and biochemical analysis of a secretin pilot protein. EMBO J *24*, 1111-1121.

Lee, H.M., Chen, J.R., Lee, H.L., Leu, W.M., Chen, L.Y., and Hu, N.T. (2004). Functional dissection of the XpsN (GspC) protein of the Xanthomonas campestris pv. campestris type II secretion machinery. J Bacteriol *186*, 2946-2955.

Lee, H.M., Tyan, S.W., Leu, W.M., Chen, L.Y., Chen, D.C., and Hu, N.T. (2001). Involvement of the XpsN protein in formation of the XpsL-xpsM complex in Xanthomonas campestris pv. campestris type II secretion apparatus. J Bacteriol *183*, 528-535.

Lee, M.S., Chen, L.Y., Leu, W.M., Shiau, R.J., and Hu, N.T. (2005). Associations of the major pseudopilin XpsG with XpsN (GspC) and secretin XpsD of Xanthomonas campestris pv. campestris type II secretion apparatus revealed by cross-linking analysis. J Biol Chem *280*, 4585-4591.

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

Lim, M.S., Ng, D., Zong, Z., Arvai, A.S., Taylor, R.K., Tainer, J.A., and Craig, L. (2010). Vibrio cholerae El Tor TcpA crystal structure and mechanism for pilus-mediated microcolony formation. Mol Microbiol *77*, 755-770.

Lindeberg, M., and Collmer, A. (1992). Analysis of eight out genes in a cluster required for pectic enzyme secretion by Erwinia chrysanthemi: sequence comparison with secretion genes from other gram-negative bacteria. J Bacteriol *174*, 7385-7397.

Lindeberg, M., Salmond, G.P., and Collmer, A. (1996). Complementation of deletion mutations in a cloned functional cluster of Erwinia chrysanthemi out genes with Erwinia carotovora out homologues reveals OutC and OutD as candidate gatekeepers of species-specific secretion of proteins via the type II pathway. Mol Microbiol *20*, 175-190.

Linderoth, N.A., Model, P., and Russel, M. (1996). Essential role of a sodium dodecyl sulfate-resistant protein IV multimer in assembly-export of filamentous phage. J Bacteriol *178*, 1962-1970.

Login, F.H., Fries, M., Wang, X., Pickersgill, R.W., and Shevchik, V.E. (2010). A 20-residue peptide of the inner membrane protein OutC mediates interaction with two distinct sites of the outer membrane secretin OutD and is essential for the functional type II secretion system in Erwinia chrysanthemi. Mol Microbiol *76*, 944-955.

Login, F.H., and Shevchik, V.E. (2006). The single transmembrane segment drives self-assembly of OutC and the formation of a functional type II secretion system in Erwinia chrysanthemi. J Biol Chem *281*, 33152-33162.

Lybarger, S.R., Johnson, T.L., Gray, M.D., Sikora, A.E., and Sandkvist, M. (2009). Docking and assembly of the type II secretion complex of Vibrio cholerae. J Bacteriol *191*, 3149-3161.

M

Maier, B., Koomey, M., and Sheetz, M.P. (2004). A force-dependent switch reverses type IV pilus retraction. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 10961-10966.

Marsh, J.W., and Taylor, R.K. (1998). Identification of the Vibrio cholerae type 4 prepilin peptidase required for cholera toxin secretion and pilus formation. Mol Microbiol *29*, 1481-1492.

Michel, G., Bleves, S., Ball, G., Lazdunski, A., and Filloux, A. (1998). Mutual stabilization of the XcpZ and XcpY components of the secretory apparatus in Pseudomonas aeruginosa. Microbiology *144 (Pt 12)*, 3379-3386.

Michel, G.P., Durand, E., and Filloux, A. (2007). XphA/XqhA, a novel GspCD subunit for type II secretion in Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol *189*, 3776-3783.

Michel, G.P., and Voulhoux, R. (2009). The type II secretory system (T2SS) in Gram negative bacteria: a molecular nanomachine for secretion of Sec and Tat-dependent extracellular proteins. In: Bacterial secreted proteins, vol. 1, ed. K. Wooldridge, Norfolk: Caister Academic Press, 67-92.

N

Nouwen, N., Ranson, N., Saibil, H., Wolpensinger, B., Engel, A., Ghazi, A., and Pugsley, A.P. (1999). Secretin PulD: association with pilot PulS, structure, and ion-conducting channel formation. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 8173-8177.

Nouwen, N., Stahlberg, H., Pugsley, A.P., and Engel, A. (2000). Domain structure of secretin PulD revealed by limited proteolysis and electron microscopy. EMBO J *19*, 2229-2236.

Nudleman, E., Wall, D., and Kaiser, D. (2006). Polar assembly of the type IV pilus secretin in Myxococcus xanthus. Mol Microbiol *60*, 16-29.

Nunn, D. (1999). Bacterial type II protein export and pilus biogenesis: more than just homologies? Trends Cell Biol *9*, 402-408.

Nunn, D.N., and Lory, S. (1992). Components of the protein-excretion apparatus of Pseudomonas aeruginosa are processed by the type IV prepilin peptidase. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 47-51.

Nunn, D.N., and Lory, S. (1993). Cleavage, methylation, and localization of the Pseudomonas aeruginosa export proteins XcpT, -U, -V, and -W. J Bacteriol *175*, 4375-4382.

O

Opalka, N., Beckmann, R., Boisset, N., Simon, M.N., Russel, M., and Darst, S.A. (2003). Structure of the filamentous phage pIV multimer by cryo-electron microscopy. J Mol Biol *325*, 461-470.

Osborne, A.R., Rapoport, T.A., and van den Berg, B. (2005). Protein translocation by the Sec61/SecY channel. Annu Rev Cell Dev Biol *21*, 529-550.

P

Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N.C., and Dalbey, R.E. (2002). Signal peptidases. Chem Rev *102*, 4549-4580.

Pallen, M.J., and Ponting, C.P. (1997). PDZ domains in bacterial proteins. Mol Microbiol *26*, 411-413.

Palmer, T., Sargent, F., and Berks, B.C. (2005). Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway. Trends Microbiol *13*, 175-180.

Parge, H.E., Forest, K.T., Hickey, M.J., Christensen, D.A., Getzoff, E.D., and Tainer, J.A. (1995). Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 A resolution. Nature *378*, 32-38.

Patrick, M., Korotkov, K.V., Hol, W.G., and Sandkvist, M. (2011). Oligomerization of EpsE coordinates residues from multiple subunits to facilitate ATPase activity. J Biol Chem *286*, 10378-10386.

Peabody, C.R., Chung, Y.J., Yen, M.R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A.P., and Saier, M.H., Jr. (2003). Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. Microbiology *149*, 3051-3072.

Planet, P.J., Kachlany, S.C., DeSalle, R., and Figurski, D.H. (2001). Phylogeny of genes for secretion NTPases: identification of the widespread tadA subfamily and development of a diagnostic key for gene classification. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 2503-2508.

Possot, O.M., Gerard-Vincent, M., and Pugsley, A.P. (1999). Membrane association and multimerization of secreton component pulC. J Bacteriol *181*, 4004-4011.

Possot, O.M., and Pugsley, A.P. (1997). The conserved tetracysteine motif in the general secretory pathway component PulE is required for efficient pullulanase secretion. Gene *192*, 45-50.

Possot, O.M., Vignon, G., Bomchil, N., Ebel, F., and Pugsley, A.P. (2000). Multiple interactions between pullulanase secreton components involved in stabilization and cytoplasmic membrane association of PulE. J Bacteriol *182*, 2142-2152.

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

Pugsley, A.P., d'Enfert, C., Reyss, I., and Kornacker, M.G. (1990). Genetics of extracellular protein secretion by gram-negative bacteria. Annu Rev Genet *24*, 67-90.

Pugsley, A.P., and Dupuy, B. (1992). An enzyme with type IV prepilin peptidase activity is required to process components of the general extracellular protein secretion pathway of Klebsiella oxytoca. Mol Microbiol *6*, 751-760.

Pugsley, A.P., Francetic, O., Hardie, K., Possot, O.M., Sauvonnet, N., and Seydel, A. (1997). Pullulanase: model protein substrate for the general secretory pathway of gram-negative bacteria. Folia Microbiol (Praha) *42*, 184-192.

Py, B., Chippaux, M., and Barras, F. (1993). Mutagenesis of cellulase EGZ for studying the general protein secretory pathway in Erwinia chrysanthemi. Mol Microbiol *7*, 785-793.

Py, B., Loiseau, L., and Barras, F. (1999). Assembly of the type II secretion machinery of Erwinia chrysanthemi: direct interaction and associated conformational change between OutE, the putative ATP-binding component and the membrane protein OutL. J Mol Biol *289*, 659-670.

Py, B., Loiseau, L., and Barras, F. (2001). An inner membrane platform in the type II secretion machinery of Gram-negative bacteria. EMBO Rep *2*, 244-248.

R

Ramboarina, S., Fernandes, P.J., Daniell, S., Islam, S., Simpson, P., Frankel, G., Booy, F., Donnenberg, M.S., and Matthews, S. (2005). Structure of the bundle-forming pilus from enteropathogenic Escherichia coli. J Biol Chem *280*, 40252-40260.

Reichow, S.L., Korotkov, K.V., Gonen, M., Sun, J., Delarosa, J.R., Hol, W.G., and Gonen, T. (2011). The binding of cholera toxin to the periplasmic vestibule of the type II secretion channel. Channels (Austin) *5*.

Reichow, S.L., Korotkov, K.V., Hol, W.G., and Gonen, T. (2010). Structure of the cholera toxin secretion channel in its closed state. Nat Struct Mol Biol *17*, 1226-1232.

Reynolds, C., Damerell, D., and Jones, S. (2009). ProtorP: a protein-protein interaction analysis server. Bioinformatics *25*, 413-414.

Robert, V., Filloux, A., and Michel, G.P. (2005). Role of XcpP in the functionality of the Pseudomonas aeruginosa secreton. Res Microbiol *156*, 880-886.

Robert, V., Hayes, F., Lazdunski, A., and Michel, G.P. (2002). Identification of XcpZ domains required for assembly of the secreton of Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol *184*, 1779-1782.

Robien, M.A., Krumm, B.E., Sandkvist, M., and Hol, W.G. (2003). Crystal structure of the extracellular protein secretion NTPase EpsE of Vibrio cholerae. J Mol Biol *333*, 657-674.

S

Sampaleanu, L.M., Bonanno, J.B., Ayers, M., Koo, J., Tammam, S., Burley, S.K., Almo, S.C., Burrows, L.L., and Howell, P.L. (2009). Periplasmic domains of Pseudomonas aeruginosa PilN and PilO form a stable heterodimeric complex. J Mol Biol *394*, 143-159.

Sandkvist, M. (2001). Biology of type II secretion. Mol Microbiol *40*, 271-283.

Sandkvist, M., Bagdasarian, M., and Howard, S.P. (2000a). Characterization of the multimeric Eps complex required for cholera toxin secretion. Int J Med Microbiol *290*, 345-350.

Sandkvist, M., Bagdasarian, M., Howard, S.P., and Dirita, V.J. (1995). Interaction between the autokinase EpsE and EpsL in the cytoplasmic membrane is required for extracellular secretion in Vibrio cholerae. EMBO J *14*, 1664-1673.

Sandkvist, M., Hough, L.P., Bagdasarian, M.M., and Bagdasarian, M. (1999). Direct interaction of the EpsL and EpsM proteins of the general secretion apparatus in Vibrio cholerae. J Bacteriol *181*, 3129-3135.

Sandkvist, M., Keith, J.M., Bagdasarian, M., and Howard, S.P. (2000b). Two regions of EpsL involved in species-specific protein-protein interactions with EpsE and EpsM of the general secretion pathway in Vibrio cholerae. J Bacteriol *182*, 742-748.

Sandkvist, M., Michel, L.O., Hough, L.P., Morales, V.M., Bagdasarian, M., Koomey, M., and DiRita, V.J. (1997). General secretion pathway (eps) genes required for toxin secretion and outer membrane biogenesis in Vibrio cholerae. J Bacteriol *179*, 6994-7003.

Sargent, F., Bogsch, E.G., Stanley, N.R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B.C., and Palmer, T. (1998). Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. EMBO J *17*, 3640-3650.

Sauvonnet, N., Poquet, I., and Pugsley, A.P. (1995). Extracellular secretion of pullulanase is unaffected by minor sequence changes but is usually prevented by adding reporter proteins to its N- or C-terminal end. J Bacteriol *177*, 5238-5246.

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

Sauvonnet, N., Vignon, G., Pugsley, A.P., and Gounon, P. (2000). Pilus formation and protein secretion by the same machinery in Escherichia coli. EMBO J *19*, 2221-2228.

Savvides, S.N., Yeo, H.J., Beck, M.R., Blaesing, F., Lurz, R., Lanka, E., Buhrdorf, R., Fischer, W., Haas, R., and Waksman, G. (2003). VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies: new insights into bacterial type IV secretion. EMBO J *22*, 1969-1980.

Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Nussinov, R., and Wolfson, H.J. (2005). PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. Nucleic Acids Res *33*, W363-367.

Schuch, R., and Maurelli, A.T. (1999). The mxi-Spa type III secretory pathway of Shigella flexneri requires an outer membrane lipoprotein, MxiM, for invasin translocation. Infect Immun *67*, 1982-1991.

Schuch, R., and Maurelli, A.T. (2001). MxiM and MxiJ, base elements of the Mxi-Spa type III secretion system of Shigella, interact with and stabilize the MxiD secretin in the cell envelope. J Bacteriol *183*, 6991-6998.

Shevchik, V.E., and Condemine, G. (1998). Functional characterization of the Erwinia chrysanthemi OutS protein, an element of a type II secretion system. Microbiology *144 (Pt 11)*, 3219-3228.

Shevchik, V.E., Robert-Baudouy, J., and Condemine, G. (1997). Specific interaction between OutD, an Erwinia chrysanthemi outer membrane protein of the general secretory pathway, and secreted proteins. EMBO J *16*, 3007-3016.

Shiue, S.J., Chien, I.L., Chan, N.L., Leu, W.M., and Hu, N.T. (2007). Mutation of a key residue in the type II secretion system ATPase uncouples ATP hydrolysis from protein translocation. Mol Microbiol *65*, 401-412.

Shiue, S.J., Kao, K.M., Leu, W.M., Chen, L.Y., Chan, N.L., and Hu, N.T. (2006). XpsE oligomerization triggered by ATP binding, not hydrolysis, leads to its association with XpsL. EMBO J *25*, 1426-1435.

Spreter, T., Yip, C.K., Sanowar, S., Andre, I., Kimbrough, T.G., Vuckovic, M., Pfuetzner, R.A., Deng, W., Yu, A.C., Finlay, B.B., Baker, D., Miller, S.I., and Strynadka, N.C. (2009). A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. Nat Struct Mol Biol *16*, 468-476.

Strom, M.S., and Lory, S. (1991). Amino acid substitutions in pilin of Pseudomonas aeruginosa. Effect on leader peptide cleavage, amino-terminal methylation, and pilus assembly. J Biol Chem *266*, 1656-1664.

Strom, M.S., Nunn, D., and Lory, S. (1991). Multiple roles of the pilus biogenesis protein pilD: involvement of pilD in excretion of enzymes from Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol *173*, 1175-1180.

Strom, M.S., Nunn, D.N., and Lory, S. (1994). Posttranslational processing of type IV prepilin and homologs by PilD of Pseudomonas aeruginosa. Methods Enzymol *235*, 527-540.

T

Thomas, J.D., Reeves, P.J., and Salmond, G.P. (1997). The general secretion pathway of Erwinia carotovora subsp. carotovora: analysis of the membrane topology of OutC and OutF. Microbiology *143 (Pt 3)*, 713-720.

Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J.D., Bron, S., and van Dijl, J.M. (2000). Signal peptide-dependent protein transport in Bacillus subtilis: a genome-based survey of the secretome. Microbiol Mol Biol Rev *64*, 515-547.

Tommassen, J., Filloux, A., Bally, M., Murgier, M., and Lazdunski, A. (1992). Protein secretion in Pseudomonas aeruginosa. FEMS Microbiol Rev *9*, 73-90.

Tsai, R.T., Leu, W.M., Chen, L.Y., and Hu, N.T. (2002). A reversibly dissociable ternary complex formed by XpsL, XpsM and XpsN of the Xanthomonas campestris pv. campestris type II secretion apparatus. Biochem J *367*, 865-871.

Tuteja, R. (2005). Type I signal peptidase: an overview. Arch Biochem Biophys *441*, 107-111.

V

van den Ent, F., and Lowe, J. (2000). Crystal structure of the cell division protein FtsA from Thermotoga maritima. EMBO J *19*, 5300-5307.

Viarre, V., Cascales, E., Ball, G., Michel, G.P., Filloux, A., and Voulhoux, R. (2009). HxcQ liposecretin is self-piloted to the outer membrane by its N-terminal lipid anchor. J Biol Chem *284*, 33815-33823.

Vignon, G., Kohler, R., Larquet, E., Giroux, S., Prevost, M.C., Roux, P., and Pugsley, A.P. (2003). Type IV-like pili formed by the type II secreton: specificity, composition, bundling, polar localization, and surface presentation of peptides. J Bacteriol *185*, 3416-3428.

Voulhoux, R., Taupiac, M.P., Czjzek, M., Beaumelle, B., and Filloux, A. (2000). Influence of deletions within domain II of exotoxin A on its extracellular secretion from Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol *182*, 4051-4058.

W

Wickner, W., Driessen, A.J., and Hartl, F.U. (1991). The enzymology of protein translocation across the Escherichia coli plasma membrane. Annu Rev Biochem *60*, 101-124.

Wretlind, B., and Pavlovskis, O.R. (1984). Genetic mapping and characterization of Pseudomonas aeruginosa mutants defective in the formation of extracellular proteins. J Bacteriol *158*, 801-808.

Wu, L.F., Ize, B., Chanal, A., Quentin, Y., and Fichant, G. (2000). Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: evolution and mechanism. J Mol Microbiol Biotechnol *2*, 179-189.

Y

Yanez, M.E., Korotkov, K.V., Abendroth, J., and Hol, W.G. (2008a). Structure of the minor pseudopilin EpsH from the Type 2 secretion system of Vibrio cholerae. J Mol Biol *377*, 91-103.

Yanez, M.E., Korotkov, K.V., Abendroth, J., and Hol, W.G. (2008b). The crystal structure of a binary complex of two pseudopilins: EpsI and EpsJ from the type 2 secretion system of Vibrio vulnificus. J Mol Biol *375*, 471-486.

Yeo, H.J., Savvides, S.N., Herr, A.B., Lanka, E., and Waksman, G. (2000). Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the Helicobacter pylori type IV secretion system. Mol Cell *6*, 1461-1472.

Yip, C.K., Kimbrough, T.G., Felise, H.B., Vuckovic, M., Thomas, N.A., Pfuetzner, R.A., Frey, E.A., Finlay, B.B., Miller, S.I., and Strynadka, N.C. (2005). Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. Nature *435*, 702-707.

Résumé

Les bactéries à Gram négatif sont entourées par une enveloppe cellulaire qui, contrairement aux bactéries à Gram positif, possèdent une organisation membranaire complexe composée d'une membrane interne appelée généralement membrane cytoplasmique, un espace périplasmique contenant une matrice de peptidoglycane et une membrane externe asymétrique constituée d'une monocouche de phospholipides surmontée d'une assise de lipopolysaccharide (LPS). Afin de franchir cette barrière, les bactéries à Gram négatif ont développé différentes voies de sécrétions spécifiques dédiées au transport des protéines (effecteurs) du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Jusqu'à présent, six systèmes de sécrétion ont été identifiés chez ces bactéries. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie pathogène opportuniste, le système de sécrétion de type II appelé aussi sécréton Xcp constitue l'un des facteurs principales de sa virulence. Le sécréton Xcp est un complexe macromoléculaire formé par 12 protéines, nommées $XcpA_O$ et $XcpP_C$-$XcpZ_M$. Ce complexe macromoléculaire est organisé en trois sous-complexes : i) une plateforme d'assemblage ancrée dans la membrane interne formé par les protéines $XcpR_ES_FY_LZ_M$ ii) un pore de sécrétion localisé dans la membrane externe formé par l'oligomérisation d'une protéine appelé la sécrétine $XcpQ_D$. Le pore de sécrétion est connecté à la plateforme de la membrane interne par une protéine appelée $XcpP_C$ iii) un pseudopilus périplasmique sous forme de fibre hélicoïdale qui est formé par la multimérisation d'une protéine appelée la pseudopiline majeure $XcpT_G$. Quatre protéines appelées les pseudopilines mineures $XcpU_H$-V_I-W_J-X_K intègrent le pseudopilus.

La première partie du travail effectué au cours de cette thèse a eu pour but d'étudier et de comprendre par des approches structurales, biochimiques et biophysiques le mécanisme d'assemblage des pseudopilines en pseudopilus. La deuxième partie de ce travail a porté sur l'étude des réseaux d'interactions entre les substrats sécrétés et les composants de la machinerie Xcp. Durant cette thèse, nous avons ainsi i) identifier grâce à l'étude des interactions protéine-protéine l'existence d'un complexe quaternaire entre les pseudopilines mineures $XcpU_H$-V_I-W_J-X_K localisées au sommet du pseudopilus ii) déterminer les structures de la pseudopiline majeure $XcpT_G$ par RMN et de la pseudopiline mineure $XcpW_J$ par cristallographie aux rayons X iii) déterminer les différents éléments du sécréton qui interagissent avec les exoprotéines du sécréton. Ce réseau d'interaction nous a permis de proposer un nouveau modèle de fonctionnement du sécréton qui élucide le cheminement des exoprotéines dans le sécréton.

Summary

Gram-negative bacteria are characterized by a complex organization of their cell envelope composed by the inner membrane (IM) called cytoplasmic membrane, the periplasmic space containing a peptidoglycan layer and the outer membrane (OM) covered by the lipopolysaccharide matrix. Gram-negative bacteria have evolved several specialized machines called secretion systems to transport their effectors from the intracellular medium to the extracellular milieu or to the host cells. Up to now, at least six secretion systems have been identified. In the opportunistic human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, the type II secretion system called the Xcp secreton is the major pathway for the release of virulence factors. The Xcp secreton is a macromolecular complex composed by 12 proteins called $XcpA_O$, $XcpP_C$-$XcpZ_M$. This machinery is organized in 3 sub-complexes: i) the assembly platform localized in the IM implicating $XcpR_ES_FY_LZ_M$ proteins ii) the OM pore composed by the oligomerization of the secretin $XcpQ_D$. The connection between the assembly platform and the secretin is performed by $XcpP_C$ anchored in the IM iii) a periplasmic pseudopilus consisting of the multimerization of the so-called major pseudopilin $XcpT_G$. The pseudopilus is a helicoidally filament spanning the periplasmic area and pushing the substrate into the secretin pore. Four other proteins, the minor pseudopilins $XcpU_H$-V_I-W_J-X_K, were found in the pseudopilus.

In the present work we first focused on the study of the five pseudopilus components by biochemical, biophysical and structural strategies to understand their assembly. Secondly, we investigate the protein interactome between periplasmic secreton component and secreted substrates. Thus, we revealed the presence of a quaternary complex composed by $XcpU_H$-V_I-W_J-X_K located at the tip of the pseudopilus. To understand at atomic scale the regulation of the pseudopilus, we determined the structure of two components of the pseudopilus $XcpT_G$ by NMR and $XcpW_J$ by X-ray crystallography. Using systematic protein-protein interaction studies between secreton components and purified exoproteins of *Pseudomonas aeruginosa*, we identified 5 proteins of the secreton able to interact with exoproteins. This interaction network allowed us to propose a model for the secretion process including the sequential steps followed by exoproteins inside the secreton to leave the cell envelop.