



Université de Liège
Faculté des Sciences



Centre d'Ingénierie des Protéines
Professeurs B. Joris et J. Coyette



Faculté de Médecine
Laboratoire de Bactériologie Moléculaire
Professeur A. Allaoui

Contribution à l'étude de l'assemblage de la structure basale du Système de Sécrétion de Type III de Shigella flexneri et caractérisation du rôle de la protéine IcsB dans l'autophagie.

Dissertation présentée par

AIME CHRISTIAN KAYATH

Pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences

Année Académique 2009-2010

Résumé

Shigella flexneri est une bactérie à Gram négatif de la famille des entérobactéries, responsable de la shigellose ou dysenterie bacillaire, maladie invasive du colon qui cause la mort d'un million d'individus par an. *Shigella* a la capacité d'envahir la muqueuse colique ou rectale humaine, en provoquant une intense réaction inflammatoire par la destruction de l'épithélium. *Shigella* doit sa pathogénicité au plasmide de virulence qui contient une région *mxi-spa* codant pour le système de sécrétion de type III (SST3). Ce dernier permet d'injecter les protéines effectrices dans les cellules épithéliales ce qui déstabilise les voies de signalisation cellulaires au profit de la bactérie.

Mon projet de thèse a porté sur l'étude des facteurs de virulence codés par des gènes localisés dans la région d'entrée du plasmide de virulence. Deux types de gènes ont été étudiés : 1/ un groupe de gènes nommés *spa* : *spa40*, *spa32*, *spa24*, *spa29* et *spa9* dont les produits sont importants dans l'assemblage et le fonctionnement du SST3 et 2/ le gène *icsB* qui code pour un effecteur sécrété par le SST3 et permet à *Shigella* d'échapper à l'autophagie. Nos résultats expérimentaux ont fait l'objet de trois publications dans des revues internationales («*Molecular Microbiology*», «*Microbiology*» et «*Microbe and infection*») dont deux en tant que co-premier auteur et une en tant que premier auteur. Nous avons ainsi montré que : **(1)** l'association des éléments du proto-canal avec Spa40 puis son interaction avec Spa32 joue un rôle important dans le changement de spécificité de substrats : de la sécrétion des composants de l'aiguille (MxiH et MxiI) à celle des effecteurs, **(2)** les associations des éléments du proto-canal Spa24, Spa9 et Spa29 avec les composants Mxi-Spa sont importantes dans la consolidation et le fonctionnement de l'appareil d'exportation, **(3)** l'interaction d'IcsB avec le cholestérol des cellules hôtes permet à *Shigella* de se protéger de l'autophagie.

En conclusion, nos travaux ont permis d'élucider une partie des mystères utilisés par les bactéries du genre *Shigella*, à savoir le mode d'assemblage des composants de la base du SST3 et la protection de *Shigella* contre la réponse cellulaire autophagique. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives d'étude du système SST3 chez d'autres bactéries pathogènes. Les systèmes de sécrétion sont conservés chez plusieurs bactéries pathogènes pour l'homme, l'animal et les plantes. Par conséquent, notre contribution dépasse le cadre de *Shigella* et pourrait aboutir à l'élaboration de nouveaux médicaments anti-infectieux.

*A mes parents Alain Pierre Kayath et
Elisabeth Kimangou*

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier le Directeur de ce travail, le Professeur A. Allaoui de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je voudrais lui exprimer ma plus sincère gratitude pour m'avoir encadré. Sa disponibilité et sa passion m'ont aidé à découvrir le monde mystérieux de Shigella. Sa perspicacité, sa rigueur scientifique et ses encouragements m'ont permis de franchir les nombreux obstacles rencontrés au cours de ce projet de thèse. Nous avons eu de nombreuses discussions pendant lesquelles ses conseils ont toujours été plein de bon sens.

Les bons souvenirs ne subissent « ni de mutation ponctuelle ni de mutation suppressive » dans une boîte crânienne. De plus, le Professeur Jacques Coyette a été un vrai père qui apprend à son fils les notions de la vie. Grâce à lui, j'ai d'abord appris le travail de laboratoire et j'ai pu être encouragé à réaliser une thèse. Je vous remercie de tout mon cœur, de toutes mes forces, de toute mon âme et de tout mon esprit.

Ensuite, je remercie le Professeur Bernard Joris, pour toute son assistance administrative, ses conseils et son aide précieuse; le Professeur Jean Jacques Letesson pour m'avoir éclairci sur le concept du « quorum sensing » pour mon « séminaire de thèse »; et le Dr. Collette Duez pour son aide parfaite et ses encouragements jusqu'au bout du couloir.

Je remercie aussi tout le jury d'avoir accepté de faire partie des membres d'évaluation de cette thèse : le Professeur Jacques Dommes, le Professeur Stéphane Genin, le Dr. Claire Remacle, et le Dr. Sylvie Legrand.

Bien que ce travail ait été principalement financé par mes soins, je tiens à remercier la Fondation David Alice Van Buuren, la CUD, le service social de l'ULg, le service main-d'œuvre (Jobiste au laboratoire de Bactériologie Moléculaire du Pr. Allaoui) et le département de Biologie animale et végétale de l'ULB (Assistant auprès de Madame Laurence Ladrière et Madame Cathérine Ledent, faculté de Médecine-ULB) pour m'avoir accordé des subsides nécessaires à la réalisation de ma thèse.

Merci à mes collègues : Dr. Moustafa Chamekh, Dr. Latefa Biskiri, Dr. Issam Harfi, Dr. Rachelle Deplus, Dr. Anne Botteaux, Moughit Kaoukab, Lionel Schiavolin, Alaeddine Meghraoui, Nargisse El Hajjami, Youness Cherradi, Céline De Rop, Khaoula Ichiba, Laurence Terreur et Dalila Lakhoulfi.

Enfin, je remercie « les Kayath », « les Lecocq », Maman Ida Landu, Abbé Gilbert Yamba ainsi que les « Langues de Feu » pour leur soutien moral.

LISTE DES ABREVIATIONS

Abréviations utilisées dans ce travail	Signification
°C	degré Celsius
CMA	Chaperone-Mediated Autophagy
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DAMP	Danger-Associated Molecular Patterns
DTM	Domaine Transmembranaire
i.e.	id est
ICE	IL- β Converting Enzyme
ics	intra/inter-cellular spread
IFN	interféron
Ig	immunoglobulines
IL	interleukine
ipa	invasion plasmid antigen
kb	kilobase
kDa	kilodalton
LPS	lipopolysaccharide
ME	membrane externe
MI	membrane interne
ml	millilitre
mxi	membrane expression of ipa
NC	Needle Complex
NK	natural killer
nm	nanomètre
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
P	périplasme
PAIs	îlots de pathogénécité
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PG	peptidoglycane
PRMs	Pattern Recognition Molecules
RC	Rouge Congo
spa	surface presentation of antigen
SST3	Système de Sécrétion de Type 3
TLR	Toll-Like Receptor

Table de matières

Introduction	5
1. Shigellose	6
1.1. Définition et épidémiologie.....	6
1.2. Manifestation de la maladie.....	6
1.3. Le genre <i>Shigella</i>	6
1.4. Traitements et vaccins.....	7
1.5. Modèles expérimentaux.....	8
2. Pathogénie cellulaire.....	9
2.1. Processus infectieux de <i>Shigella</i> et mise en place de l'inflammation.....	9
3. Les déterminants moléculaires de la virulence	12
3.1. Le plasmide de virulence	12
3.2. La régulation de l'expression des gènes de virulence	13
3.2.1. Régulation au niveau transcriptionnel	13
3.2.2. Régulation au niveau posttraductionnel	14
3.3. Les systèmes de sécrétion	15
3.3.1. Généralités	15
3.4. Le SST3 de <i>Shigella flexneri</i>	16
3.4.1. Origine du SST3.....	17
3.4.2. Caractéristiques.....	18
3.4.3. Assemblage du SST3	19
3.4.3.1. Le corps basal	19
3.4.3.1.1. Les anneaux de la membrane interne.....	19
3.4.3.1.2. Les anneaux de la membrane externe	20
3.4.3.2. Le bulbe	21
3.4.3.2.1. Les protéines membranaires : MxiA, Spa24, Spa9, Spa29, et Spa40	22
3.4.3.2.2. Les protéines cytosoliques	23
3.4.3.4. L'aiguille.....	24
3.4.3.4.1. Composants et assemblage.....	24
3.4.3.4.2. Régulation de la longueur de l'aiguille	25
4. Les effecteurs : de bons immunosuppresseurs	26
4.1. Les effecteurs précoces produits indépendamment de l'activité du SST3	26
4.2. Les effecteurs partiellement contrôlés par le SST3	28
4.3. Les effecteurs dépendant entièrement de l'activation du SST3	28
4.4. Les rafts lipidiques, bons médiateurs de l'infection à <i>Shigella</i>	29
4.5. Mouvements intra- et inter-cellulaires	30
4.6. Les chaperons : les premiers acteurs de la sécrétion et de la translocation.....	32
4.6.1. Le signal de sécrétion	32
4.6.2. Le rôle des chaperons dans la translocation	33
4.7. Autophagie	36
4.7.1. L'autophagie médiée par les chaperons (CMA)	36

4.7.2. Microautophagie	37
4.7.3. Macroautophagie	38
4.7.3.1. Activation du processus biologique de l'autophagie	38
4.7.3.2. Déroulement du processus de l'autophagie	39
4.7.3.3. Régulation de l'autophagie.....	41
4.7.3.4. Rôle de l'autophagie dans l'immunité des affections bactériennes	42
4.7.4. Adaptation des bactéries à l'autophagie.....	43
4.7.4.1. Suppression de l'induction de l'autophagie	44
4.7.4.2. Protection à l'égard de la capture autophagique.....	45
Objectifs.....	46
Résultats.....	47
1. Assemblage et fonctionnement de l'appareil d'exportation du SST3	47
1.1. Etude de la protéine Spa40	47
1.2. Etude de la protéine Spa32	48
1.3. Etude des protéines Spa24, Spa9 et Spa29	49
2. Caractérisation du rôle de la protéine IcsB dans la protection contre l'autophagie	50
Discussion	51
1. Assemblage de l'appareil d'exportation	51
1.1. De la consolidation de l'appareil d'exportation à la connexion entre Spa40 et Spa32.....	51
1.2. Spa24, Spa9, Spa29: le carrefour de la sécrétion	57
1.2.1. Les réseaux d'interaction du proto-canal : Spa24, Spa9 et Spa29 et les composants du locus mxi-spa.	60
2. IcsB : un véritable hijacking du système immunitaire	63
Perspectives	71
Conclusion générale	72
Annexe.....	73
Bibliographie.....	74

Introduction

1. SHIGELLOSE

1.1. Définition et épidémiologie

La shigellose est une colite infectieuse caractérisée par une réaction inflammatoire aiguë des voies intestinales causée par *Shigella* qui est un pathogène uniquement pour l'homme et certains primates. Les *Shigella* sont des bâtonnets immobiles, à Gram négatif, courts, de 2 à 3 μm de long sur 0,5 à 0,7 μm de large (**Fig. 1**). Nommé *Shigella* (1930) en l'honneur du bactériologiste japonais Kiyoshi SHIGA qui a découvert le bacille de la dysenterie en 1897. Les derniers relevés épidémiologiques réalisés par l'OMS font état de 169 millions d'épisodes de shigellose dans le monde, dont 500.000 à 1.1 million de décès par an. Chez les enfants âgés de moins de cinq ans, un total de 69% d'épisodes diarrhéiques et 61% de décès sont attribuables à la shigellose [1].

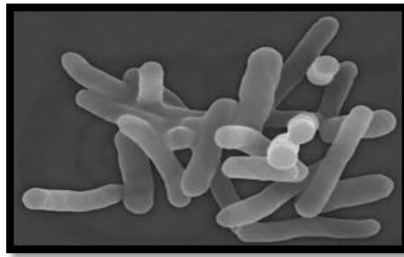


Fig.1. Cellules de *Shigella flexneri*

1.2. Manifestation de la maladie

La shigellose est par excellence une maladie due à l'insuffisance d'hygiène. La transmission se fait par ingestion d'eau ou d'aliments contaminés par les selles de malades ou de porteurs chroniques. La shigellose est une infection intestinale localisée essentiellement au niveau du colon et se caractérise par des douleurs abdominales, souvent accompagnées de vomissements, d'épreintes et de l'émission permanente de selles (30 à 50 par jour) glairo-sanguinolentes et purulentes, voire parfois hémorragiques. La fièvre est élevée, avec altération de l'état général.

1.3. Le genre *Shigella*

Les *Shigella*, qui font partie de la famille des *Enterobacteriaceae*, sont toutes pathogènes strictes intracellulaires. De nombreuses études réalisées ces dernières années stipulent que *Shigella* appartient à la même famille qu'*Escherichia coli*. En effet, la divergence de séquences entre ces deux bactéries n'est seulement que de 1,5% [2]. De plus,

l'ordre des gènes semble identique sur les cartes chromosomiques d'*E.coli* K-12 et de *Shigella* [3]. Les *Shigella* comportent quatre espèces qui se différencient sur un plan antigénique par la structure de l'antigène O du LPS (**Tableau I**) [1].

Tableau I : Les différentes espèces de *Shigella*.

Espèces	Groupes	Nombre de sérotypes	Localisation géographique
<i>S. dysenteriae</i>	A	15	Régions tropicales (Asie et Amérique du sud)
<i>S. flexneri</i>	B	14	Pays en voie de développement
<i>S. boydii</i>	C	20	Pays en voie de développement (Continent indien)
<i>S. sonnei</i>	D	1	Pays industrialisé (Europe)

1.4. Traitements et vaccins

Le malade guérit le plus souvent spontanément en quelques jours et plus rapidement après administration d'antibiotiques. Le traitement est compliqué par l'émergence de souches de *Shigella* multirésistantes aux antibiotiques tels que l'ampicilline, le chloramphénicol, la streptomycine, le sulfisoxazole, la tétracycline, l'acide nalidixique le sulfaméthoxazole-triméthoprim et la ciprofloxacine [4, 5].

A ce jour, les fluoroquinolones telles que la ciprofloxacine et la norfloxacine sont actives contre *Shigella*. Par ailleurs une résistance aux fluoroquinolones a été observée [6]. De nos jours, aucun vaccin efficace n'est disponible, néanmoins des approches vaccinales sont en cours de réalisation [7]. La première approche repose sur l'utilisation de souches vivantes de virulence atténuée combinant l'inactivation des gènes codant pour une voie métabolique et les facteurs de virulence. Cette combinaison mène à des degrés divers d'atténuation. Certains vaccins actuels, sont dans la catégorie des souches soit faiblement atténuées soit fortement atténuées [8]. Une autre difficulté se pose car la plupart des facteurs de virulence de *Shigella* sont immunosuppresseurs d'où l'intérêt d'envisager une autre approche utilisant des vaccins sous-unitaires. Les récentes tentatives se basent sur le LPS ou les protéines de virulence de *Shigella* tels que les vaccins préparés à partir du LPS de *S.*

dysenteriae serotype I conjugués à la toxine tétanique, ou encore à partir du LPS de *S. flexneri* et *S. sonnei* conjugués à l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* [9-13].

1.5. Modèles expérimentaux

L'absence d'un modèle animal de laboratoire standardisé reproduisant les principaux aspects de la shigellose humaine demeure un obstacle majeur pour répondre à des questions précises sur la pathogenèse de *Shigella*, mais également pour le criblage thérapeutique et l'évaluation des vaccins [14]. Néanmoins, différents modèles ont été récemment développés, par exemple chez les singes cynomolgus (*Macaca fascicularis*) [15] et chez les porcelets nouveau-nés [16] (**Tableau II**). Mais le modèle animal de référence est le cobaye, ou cochon d'Inde, utilisé dans le cadre d'un test de formation de kérato-conjonctivite (**Tableau II**) [17].

Tableau II: Différents types de modèles expérimentaux développés pour l'étude de l'infection à *Shigella* spp [17], [18], [19, 20], [21], [22], [22], [16], [15].

Modèles expérimentaux	Voie d'injection	Nombre de bactéries causant l'infection	Efficacité	Références
Cochon d'Inde (test de Sereny)	Cul de sac conjonctival	10 ⁹ bactéries / ml (<i>Shigella</i> spp.)	Evalue les capacités disséminatrices du pathogène	Sereny <i>et al.</i> , 1971
Lapin	Colon	10 ⁷ bactéries / ml (<i>S. flexneri</i> 2a)	Reproduit les lésions tissulaires semblables à celles engendrées par la shigellose	Rabbani <i>et al.</i> , 1995
Souris	Intra-nasale	Doses variables (<i>S. flexneri</i> 5a)	Evalue la réponse inflammatoire pulmonaire après inoculation des souches virulentes	Philpott <i>et al.</i> , 2000, Cersini <i>et al.</i> , 2003
Souriceaux nouveau-nés	Intra-gastrique	5. 10 ⁹ bactéries / ml (<i>S. flexneri</i> 5a)	Aboutit à la destruction tissulaire caractéristique de la shigellose humaine	Fernandez <i>et al.</i> , 2003
Cochon d'Inde	Intra-rectale	10 ⁹ bactéries / ml (<i>S. flexneri</i> 5a)	Permet d'obtenir, une réponse immunitaire humorale de type IgA sécrétoire et IgG sérique	Shim <i>et al.</i> , 2007
Porcelets nouveau-nés	Orale	Doses variables (<i>S. dysenteriae</i>)	Permet de développer plusieurs symptômes gastro-intestinaux très proches de la shigellose humaine	Jeong <i>et al.</i> , 2010
<i>Macaca fascicularis</i>	Intra-gastrique	10 ¹¹ bactéries / ml (<i>S. dysenteriae</i>)	Reproduit les caractéristiques similaires d'une shigellose humaine	Shipley <i>et al.</i> , 2010

2. PATHOGENIE CELLULAIRE

Le pouvoir pathogène de *Shigella* est lié à son entrée dans les cellules épithéliales intestinales. Sa capacité de mouvement intracellulaire permet un passage de cellule à cellule entraînant une colonisation épithéliale très efficace. Cette colonisation a un retentissement majeur sur l'inflammation car une fois en intracellulaire, *Shigella* reprogramme la cellule épithéliale qui produit massivement des molécules déclenchant le processus inflammatoire. Le modèle actuel des mécanismes de pathologie de la shigellose dérive d'études effectuées *in vivo* et *in vitro* utilisant une variété de cellules eucaryotes (HeLa, MDCK, BHK, CaCo2, MDAMC, macrophages, cellules embryonnaires des fibroblastes de souris (MEF), globules rouges) et des modèles animaux tels que décrits précédemment.

2.1. Processus infectieux de *Shigella* et mise en place de l'inflammation

Shigella est hautement pathogène. En effet, un inoculum de 10 à 100 bactéries suffit à engendrer la maladie [23]. Cette propriété est en partie due à leur capacité à résister à l'acidité gastrique, pH 1-3 [24]. Récemment, il a été montré que les bactéries comme *E. coli* entéropathogène, *Shigella* et *Brucella*, possèdent le gène *hdeA* codant pour la protéine amphiphile HdeA qui joue un rôle important dans la résistance à l'acidité gastrique. En effet, chez *E. coli*, HdeA possède, dans sa partie interne, une région hydrophobe exposée en surface et des résidus chargés positivement dans sa partie C-terminale qui lui confèrent une activité de chaperon permettant de résister à des pH faibles [25].

Après l'estomac, *Shigella* traverse le tractus intestinal où elle reprime l'expression des peptides antimicrobiens sécrétés par les entérocytes [26]. Elle se retrouve rapidement au niveau de la muqueuse colique où elle traverse l'épithélium via les cellules M, qui sont des grandes cellules spécialisées dans la capture des antigènes et qui les acheminent vers les macrophages ou les cellules dendritiques situées dans les replis de leur membrane plasmique [27, 28] (**Fig. 2**).

Après transcytose, les bactéries sont phagocytées et capturées dans une vacuole primaire par les macrophages. Une fois internalisées, les bactéries sécrètent des protéines qui facilitent la lyse de la vacuole primaire [29] et peuvent alors se répliquer librement dans le cytosol [30]. La lyse de la vacuole ne dépend pas de son acidification mais plutôt du Système de Sécrétion de type 3 (SST3) et de ses effecteurs IpaB, IpaC et IpaD (voir chapitre 4.1.).

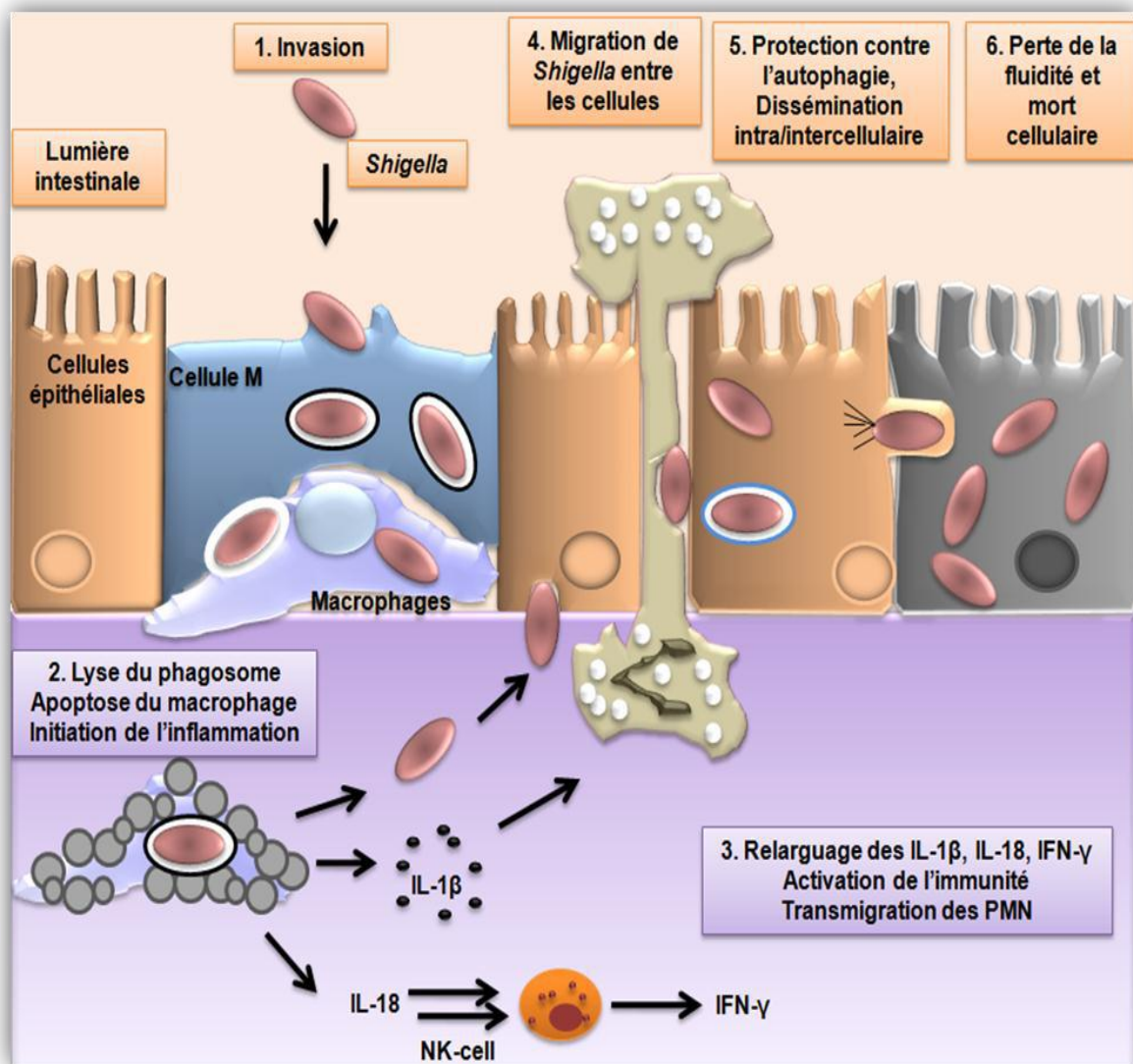


Fig. 2. Processus infectieux de *Shigella*.

La mort cellulaire programmée (apoptose) des macrophages, induite après 1-2h d'infection, est réalisée par deux voies distinctes: une première voie se fait grâce à l'activation de la caspase-1 par la protéine IpaB [31, 32]. Ce mécanisme d'apoptose est induit par l'activation de la caspase-1 [33], une cystéine protéase, appelée également ICE (pour IL- β Converting Enzyme). Cette enzyme permet le clivage des pro-IL-1 β et pro-IL-18 en leur forme mature IL-1 β et l'IL-18 [34]. Ces deux cytokines proinflammatoires ont un rôle essentiel dans la mise en place de l'inflammation massive caractéristique de la shigellose. En effet, l'IL-1 β entraîne un afflux de polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) au site infectieux [35] qui s'insèrent entre les cellules épithéliales. L'IL-18 active les cellules NK et la production d'IFN- γ ce qui exacerbe la réponse inflammatoire [36] (Fig. 2).

Une deuxième voie se fait par la translocation du lipide A cytosolique de *Shigella*, qui se produit indépendamment de l'activité des caspase-1 [37].

Une fois éclipsée du macrophage apoptotique, *Shigella* induit, grâce au SST3, sa propre internalisation dans les cellules épithéliales intestinales via leur pôle baso-latéral. Cette entrée se fait par un phénomène de macropinocytose reflétant une réorganisation importante du cytosquelette de la cellule hôte suite à l'activation de GTPases de la famille Rho et à l'activation de cascades impliquant la protéine Scr [38]. Une fois à l'intérieur de la cellule, la bactérie s'échappe du phagosome grâce à l'action coordonnée des protéines IpaB, C et D [39-42] et se multiplie dans le cytoplasme de la cellule hôte [43]. *Shigella* va ensuite, via la polymérisation d'actine, passer d'une cellule à une autre et envahir tout l'épithélium colique. Pendant la dissémination, les bactéries sont enfermées dans une vacuole secondaire à double membrane (autophagosome). Les bactéries sécrètent des protéines qui lysent les deux membranes, permettant ainsi leur passage vers les cellules adjacentes [44].

Les PRMs (Pattern Recognition Molecules) sont divisées en deux sous-classes : les récepteurs de surface « TLRs » (pour « Toll-like Receptors ») et les récepteurs cytosoliques de la famille « NOD » (pour « Nucleotide-binding Oligomerization Domain »). Le récepteur Nod-1, prévalent dans les cellules épithéliales intestinales, reconnaît les fragments de peptidoglycane relargués par *Shigella* et active le facteur nucléaire NF- κ B ce qui permet la transcription et la sécrétion de l'IL-8. Cette chémokine permet le recrutement massif des PMNs et leur transmigration aboutissant à une déstabilisation de l'intégrité de la barrière épithéliale et constituant un autre moyen d'entrée de *Shigella* dans les entérocytes sans passer par les cellules M (**Fig. 2**).

La manifestation de la shigellose peut aussi être associée aux entérotoxines ShET1 et ShET2, produites par la plupart des souches de *Shigella*. Elles induisent une sécrétion de fluide dans l'intestin augmentant le caractère aqueux de la diarrhée [45, 46]. De plus, la toxine de Shiga (Stx) produite exclusivement par *Shigella dysenteriae* serotype 1, est cytotoxique pour une multitude de cellules (cellules nerveuses, intestinales, rénales...) et est responsable de lésions vasculaires au niveau du colon et du système nerveux central entraînant de nombreuses complications mortelles [47]. En effet, les Stx (Shiga toxines) sont responsables de certaines complications graves, telles que les colites hémorragiques et le syndrome

hémolytique urémique (HUS : haemolytic uremic syndrome). Les Stx se fixent sur les récepteurs de nature glycolipidique (la clathrine) du côté apical de la cellule permettant l'internalisation de la toxine dans le cytoplasme de la cellule hôte. Les Stx transitent dans le cytosol en passant par le réseau de l'appareil de Golgi et gagnent le réticulum endoplasmique où elles empêchent la synthèse des protéines en interférant avec les ribosomes [48, 49]. De plus, il a été récemment montré que la Shiga toxine peut induire l'apoptose dans différents types de cellules (épithéliales, endothéliales, leukocytiques, lymphoïdes et neuronales) [50].

3. LES DETERMINANTS MOLECULAIRES DE LA VIRULENCE

Le séquençage complet du chromosome et du plasmide de virulence de *Shigella* a facilité l'étude des nombreux déterminants de l'entrée et de la dissémination bactérienne [51, 52]. Bien que le plasmide soit un déterminant essentiel de la virulence et permet à lui seul de conférer ce caractère invasif à une souche d'*E. coli* commensale [53], certains gènes chromosomiques sont aussi importants et directement impliqués dans la virulence. Les gènes de virulence sont généralement regroupés en îlots de pathogénicité (PAIs) [54].

3.1. Le plasmide de virulence

Shigella doit sa pathogénicité aux gènes portés par le plasmide de virulence pWR100 (220-kb, voir annexe). L'analyse de la séquence de ce dernier montre qu'il est composé d'une mosaïque de 100 gènes et de nombreuses séquences d'insertion. En dehors du fait que ce plasmide code pour des protéines effectrices (Osp, IpaH, IcsA, IcsB,...) jouant pour la plupart des fonctions dans les étapes post-invasives, il contient une région de 31-kb très conservée entre espèces, appelée région d'entrée, qui est nécessaire et suffisante à l'entrée de *Shigella* dans les cellules épithéliales intestinales et à l'induction de l'apoptose du macrophage [55-58] (**Fig. 3**).

Les gènes de cette région sont divisés en deux opérons transcrits de façon divergente; l'opéron *mxi-spa* (membrane expression of *i*pa et surface presentation of antigen) qui spécifie un système de sécrétion de type III (SST3), et l'opéron *ipa* (invasion plasmid antigen) qui code pour les protéines sécrétées par cette machinerie, appelées effecteurs de l'entrée (les protéines IpaA-D, IpgB et IpgD) et de la dissémination (IcsB) [59, 60] (**Fig. 3**).

De plus, cette région comporte des gènes codant pour des chaperons cytoplasmiques (IpgC, IpgE, IpgA et Spa15) (voir chapitre 4.6.), qui stabilisent les substrats du SST3 et des activateurs transcriptionnels (MxiE, VirB) [61-64].



Fig. 3. Représentation schématique de la région (31-kb) nécessaire à l'entrée de *Shigella* dans les cellules épithéliales. Les gènes mis en évidence font l'objet de ce travail.

3.2. La régulation de l'expression des gènes de virulence

3.2.1. Régulation au niveau transcriptionnel

Pendant la croissance de la bactérie, le SST3 est assemblé mais inactif avant tout contact cellulaire; dans ces conditions, environ 5% des protéines effectrices stockées dans le cytoplasme sont sécrétées dans le milieu extérieur [65]. Ce phénomène est communément appelé sécrétion de « fuite ». D'autres facteurs additionnels peuvent aussi influencer l'expression des gènes du plasmide comme le pH, l'osmolarité ou la concentration environnante en fer [66-68] (**Fig. 4**).

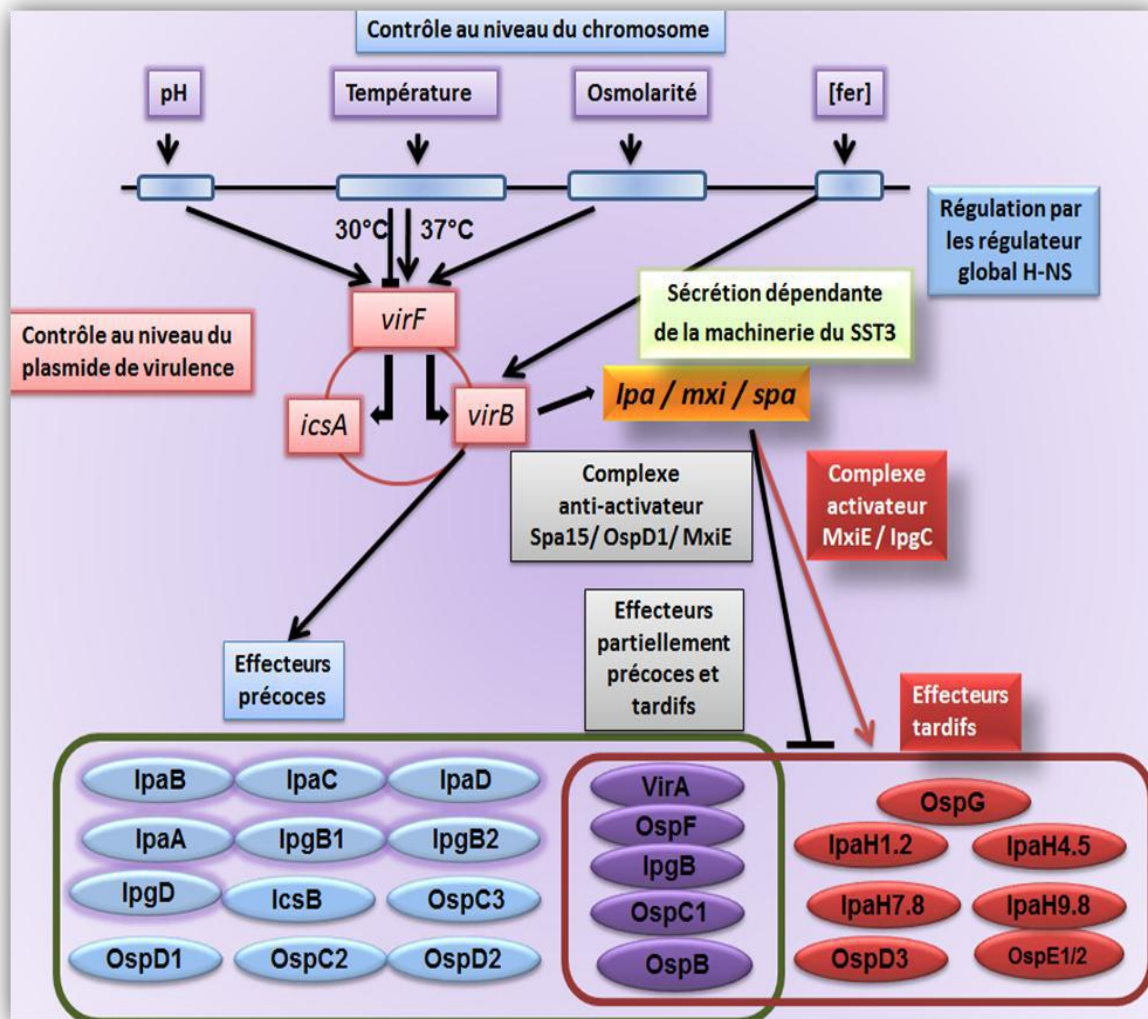


Fig. 4. Cascade de régulation de l'expression des gènes de virulence de *S. flexneri*. A 30°C, H-NS réprime la transcription des gènes *virB*, *virF* et *icsA*. A 37°C, *VirF* régule positivement *VirB* ainsi qu'*IcsA*. *VirB* peut, à son tour, activer la transcription des effecteurs précoces. Avant tout contact cellulaire, la protéine *OspD1*, stabilisée par *Spa15*, bloque *MxiE* [69]. Après contact avec la cellule, l'anti-activateur *OspD1* et les protéines *IpaB* et *IpaC* sont sécrétées libérant ainsi le chaperon *IpgC* qui se lie à *MxiE*. Cette liaison entraîne un changement de conformation favorisant ainsi sa liaison à l'ADN, ce qui permet la transcription des gènes dits « tardifs ».

3.2.2. Régulation au niveau posttraductionnel

Plusieurs substrats du SST3 interviennent dans la régulation de la sécrétion au niveau post-traductionnel. Les exemples les plus cités sont les protéines *IpaBCD*, *Spa47* et la protéine *MxiC* [70] (Fig. 5).

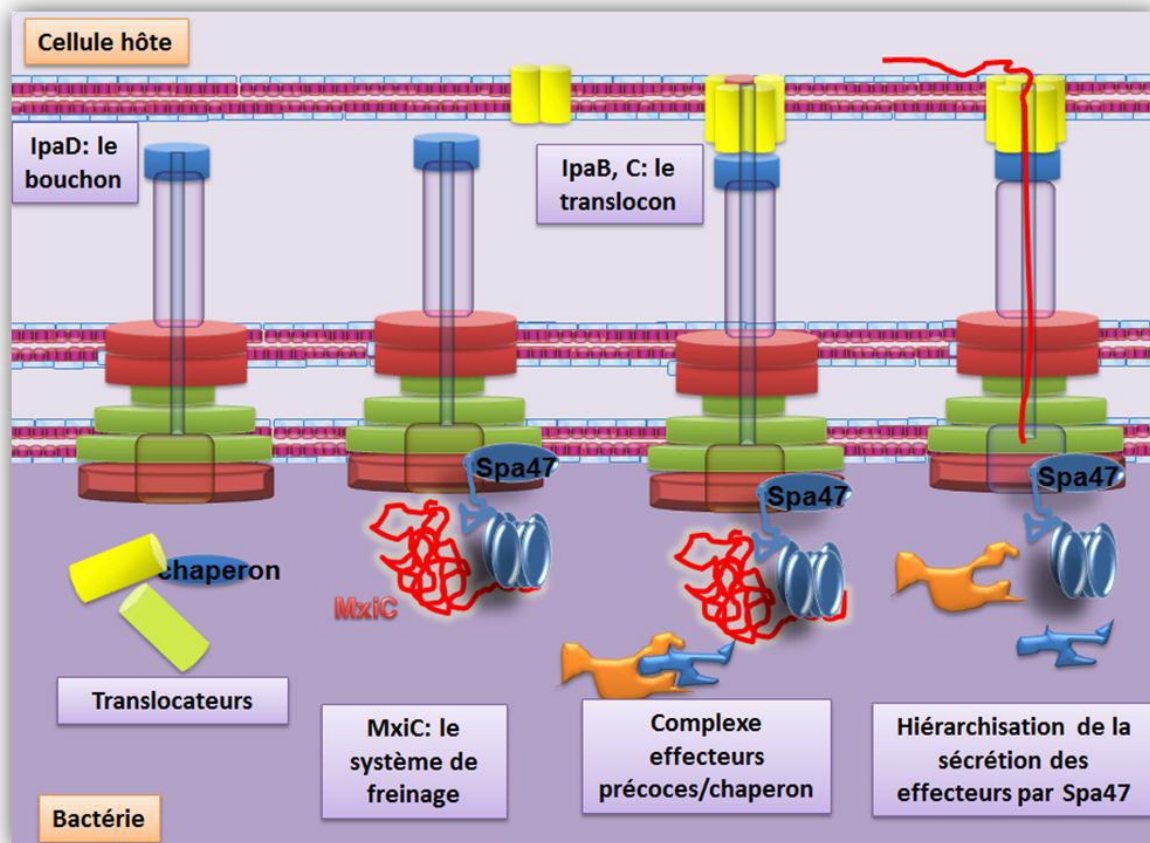


Fig. 5. Mécanisme régulant la hiérarchie de la sécrétion via le SST3. La protéine IpaD empêche la sécrétion précoce des translocateurs/effecteurs avant le contact cellulaire et permet la mise en place d'un pore constitué des protéines IpaB et IpaC dans la membrane de la cellule eucaryote [71, 72]. Les trente premiers acides aminés de MxiC, servant de signal de sécrétion, représentent son domaine d'interaction avec l'ATPase du SST3, Spa47. Cette interaction pourrait permettre à MxiC d'empêcher la sécrétion/translocation des effecteurs [73]. Une fois le translocon mis en place, Spa47 peut ainsi continuer à assurer la hiérarchie de la sécrétion.

3.3. Les systèmes de sécrétion

3.3.1. Généralités

Les bactéries ont su développer des systèmes de sécrétion pour injecter des macromolécules interférant avec les fonctions physiologiques de l'organisme infecté. Jusqu'à présent, sept systèmes différents de sécrétion (Type I à VII) ont été décrits. Trois d'entre eux (type III, IV et VI) permettent de pénétrer les membranes des cellules et d'injecter des protéines directement dans le cytosol des cellules hôtes. Les SST1 sont similaires à l'ATP-binding cassette (ABC) des systèmes de transporteurs, alors que les SST2, SST3 et SST4

sont, du point de vue évolutif, liés respectivement au système de pili de type IV, aux flagelles et aux machineries de conjugaison bactérienne [74-76]. Les systèmes de sécrétion de type VI et VII sont encore mal connus.

Les systèmes de sécrétion peuvent donc être divisés en deux groupes. Le premier regroupe les systèmes Sec dépendants (SST2 et SST5), via lesquels la protéine est exportée vers le périplasma grâce à la présence d'une séquence signal amino-terminale clivable. Le deuxième groupe comprend les systèmes Sec-indépendants (SST1, SST4, SST3 [77] et SST6 [74]), et sécrète des substrats en une seule étape, sans étape périplasmique intermédiaire [78] (**Fig. 6**). Dans ce travail, nous nous limiterons au Système de Sécrétion de Type III (SST3).

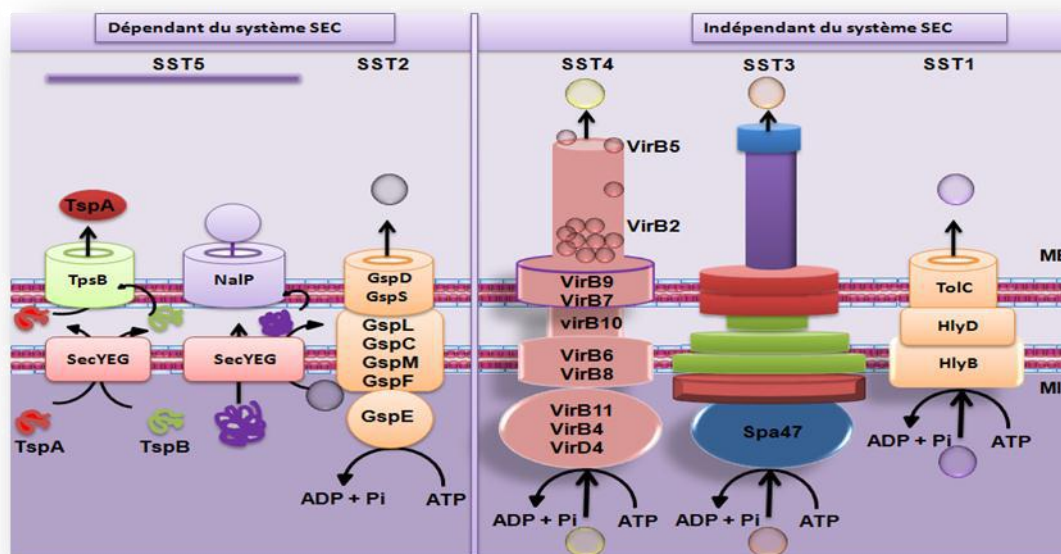


Fig. 6. Différents types de systèmes de sécrétion chez les bactéries [79]. Les systèmes de sécrétion de type I (SST1s) sont illustrés par le système de sécrétion de l'hémolysine d'*Escherichia coli*. Les systèmes de sécrétion de type II (SST2s) sont illustrés par la voie générale de sécrétion (GSP, pour General Secretion Pathways). Les systèmes de sécrétion de type III (SST3s), appelés aussi injectisomes, sont présents chez de nombreux pathogènes d'animaux et de plantes. Les systèmes de sécrétion de type IV sont illustrés par le système VirB / D d'*Agrobacterium tumefaciens*. Les systèmes de sécrétion de type V (SST5s) sont illustrés par le système à deux composants NalP/TpsB de *Neisseria meningitidis*.

3.4. Le SST3 de *Shigella flexneri*

Les protéines associées à la virulence de *Shigella* sont structurées et organisées en nanomachine ou SST3 qui achève la sécrétion et la translocation des protéines de virulence du cytoplasme bactérien jusqu'au cytosol de la cellule hôte.

3.4.1. Origine du SST3

Le SST3 possède des origines évolutives communes avec le système flagellaire, marquées par la similarité des corps basaux des deux nanomachines (**Fig. 7**) [80] et incluent un certain nombre de protéines homologues [81]. Le flagelle, tout comme le SST3, possède une partie enchâssée dans les membranes (externe et interne) et un appendice extracellulaire (le crochet dans le cas du flagelle et l'aiguille dans le cas du SST3). Il a été montré que l'aiguille du SST3 de *Shigella flexneri* a la même symétrie hélicoïdale (5,6 unités / tour d'un pas d'hélice de 24 Å) que celle mieux caractérisée du filament flagellaire de *Salmonella typhimurium* (~ 5,5 unités / tour d'un pas d'hélice de 26Å) [82].

De plus, ces deux systèmes possèdent d'autres similitudes telles que l'utilisation de chaperons, ainsi qu'un processus d'assemblage semblable [83].

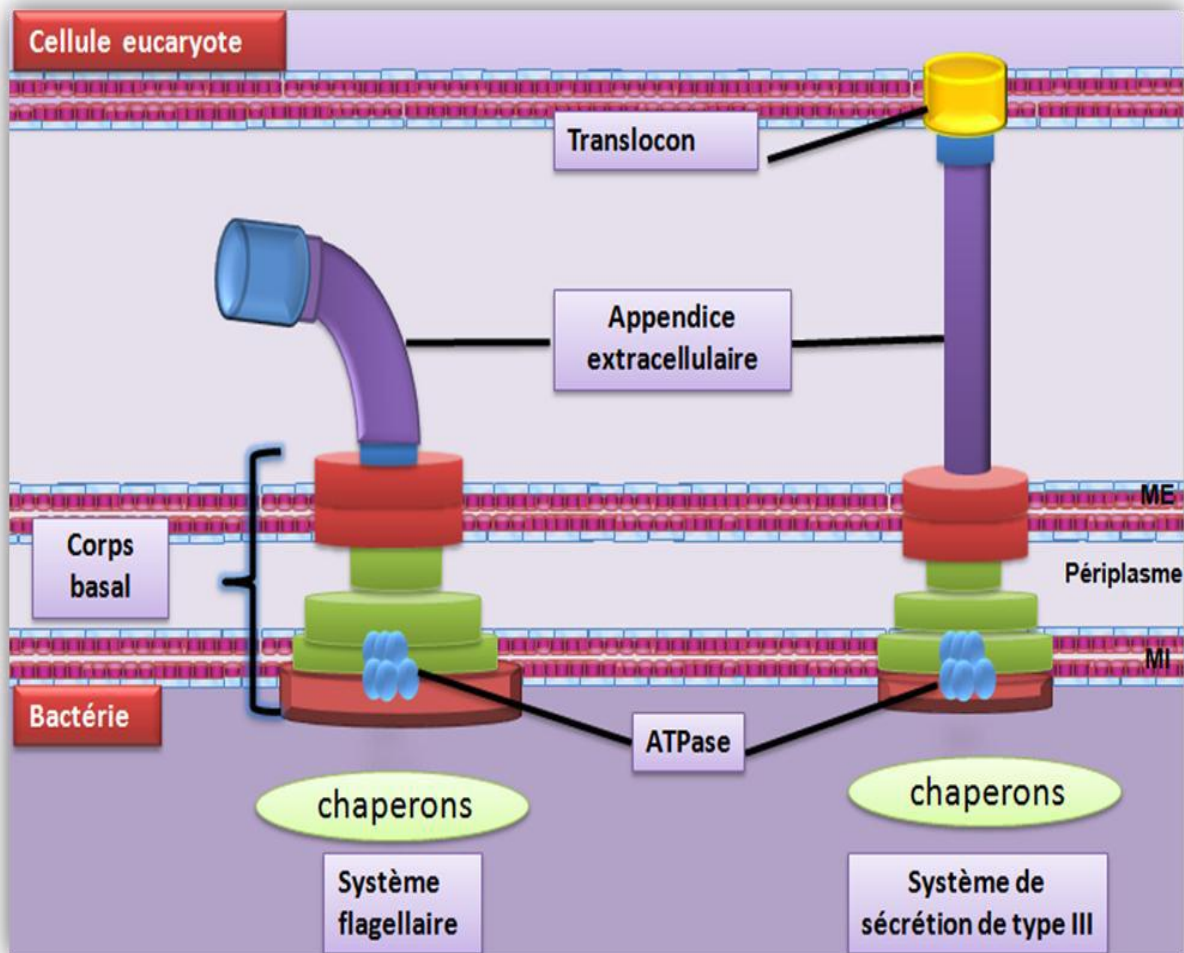


Fig. 7. Représentation comparative entre le système flagellaire et le SST3. ME : membrane externe, MI : membrane interne.

3.4.2. Caractéristiques

Le SST3 fut découvert dans les années 90 en Belgique par le groupe du Pr. Cornelis [84]. Il est retrouvé chez plus de 25 bactéries pathogènes d'animaux, de plantes, mais aussi chez des pathogènes d'insectes et d'amibes [85].

Le SST3 est caractérisé par i) une sécrétion induite au contact de la cellule eucaryote, ii) l'absence de séquence signal clivable, iii) la présence de protéines chaperons stabilisant et dirigeant la plupart des substrats vers l'appareil de sécrétion, iv) le regroupement des gènes de virulence en îlots de pathogénicité et v) la translocation des effecteurs vers la cellule hôte [86]. Les études de microscopie électronique ont permis d'observer l'ultrastructure du SST3 de *Salmonella* [87], de *Shigella* [88] et de *Yersinia* [89]. Le SST3 est composé de trois parties morphologiquement distinctes : i) un bulbe cytoplasmique, ii) un corps basal traversant les membranes interne et externe et iii) une aiguille extracellulaire (Fig. 8).

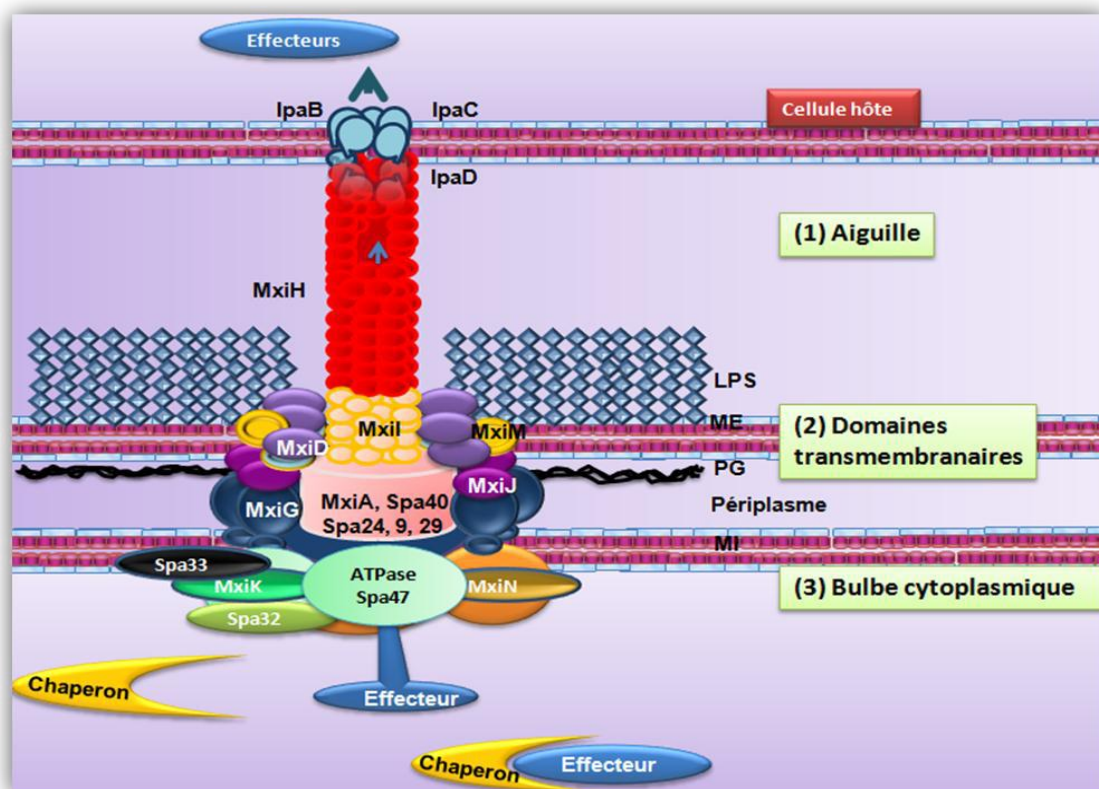


Fig. 8. Représentation schématique d'un modèle du système de sécrétion de type III (SST3) de *Shigella flexneri*. Les différents produits des gènes de la région d'entrée sont représentés. Les membranes de la bactérie, encadrant la couche du peptidoglycane, sont montrées. Légende : ME : membrane externe, MI : membrane interne, PG : Peptidoglycane.

3.4.3. Assemblage du SST3

Le SST3 s'assemble en plusieurs étapes; d'abord, les protéines formant le corps basal, ensuite le bulbe cytoplasmique, puis enfin l'aiguille.

3.4.3.1. Le corps basal

La formation du corps basal résulte d'une succession de deux doublets d'anneaux, qui traversent la membrane interne (MI), le périplasme (P), la couche de peptidoglycane (PG) et la membrane externe (ME). Très récemment, il a été proposé que le corps basal s'assemble selon une hiérarchie bien précise. En effet, l'assemblage du SST3 de *Yersinia* commence par la protéine de l'anneau supérieur formé par YscC, l'homologue de MxiD (**Fig. 9**). Ensuite, viennent s'attacher, tour à tour, les connecteurs YscD et YscJ qui sont respectivement les homologues de MxiG et MxiJ de *S. flexneri*. Après l'assemblage des anneaux supérieurs et inférieurs, le complexe ATPase formé d'YscN, K, L et Q (homologue de Spa47, MxiK, MxiN et Spa33) s'assemble du côté cytoplasmique de l'appareil de sécrétion. Le timing de l'assemblage de l'appareil d'exportation de YscR, S, T, U et V (homologue de Spa24, 9, 29 et 40 des quatre premiers composants) reste encore mal connu [90].

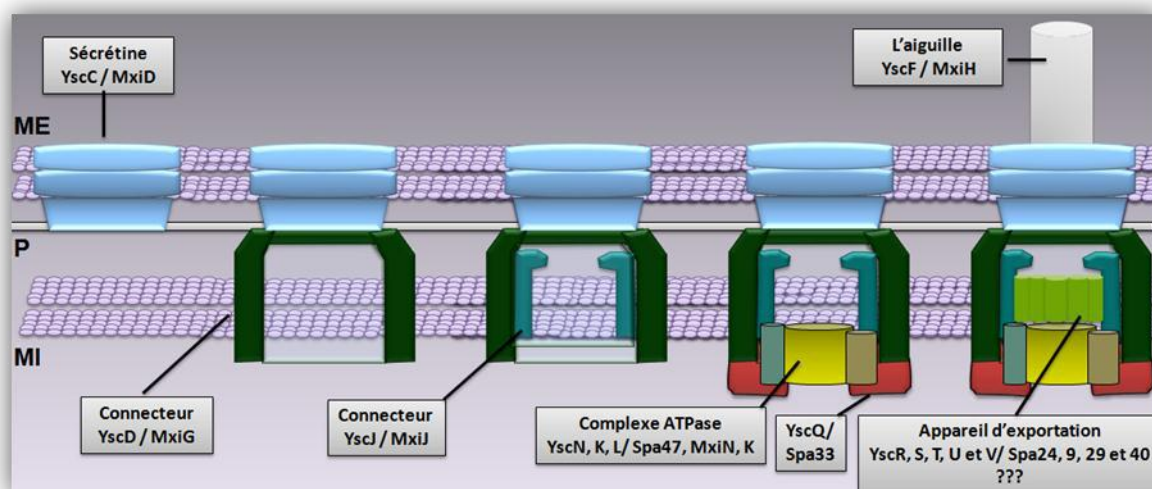


Fig. 9 : Modèle d'assemblage du corps basal du SST3 de *Yersinia*. ME : membrane extérieure, MI : membrane intérieure, P : périplasme [90].

3.4.3.1.1. Les anneaux de la membrane interne

Ces anneaux sont composés principalement de la lipoprotéine MxiJ et de la protéine membranaire MxiG insérées dans la membrane interne [91-94]. Ces deux protéines sont essentielles à l'assemblage du SST3. En effet, l'analyse par microscopie électronique des mutants *mxiJ* et *mxiG* montre l'absence de needle complex (NC) à leurs surfaces. Les

protéines MxiG et MxiJ sont très conservées dans les différents SST3s [91, 95, 96]. Elles pourraient former un pont périplasmique avec les anneaux la membrane externe. L'interaction MxiJ-MxiD a d'ailleurs été démontrée à la fois par des méthodes de double hybride chez la levure et par co-purification [94].

3.4.3.1.2. Les anneaux de la membrane externe

Une étude récente du SST3 de *Shigella* a fourni des détails additionnels sur la composition du corps basal. Il a été montré, par exemple, que l'anneau de la membrane externe est subdivisé en trois anneaux (**Fig. 10**). Le troisième anneau, appelé connecteur, est périplasmique et lié aux anneaux de la membrane interne [97] (**Fig. 10**).

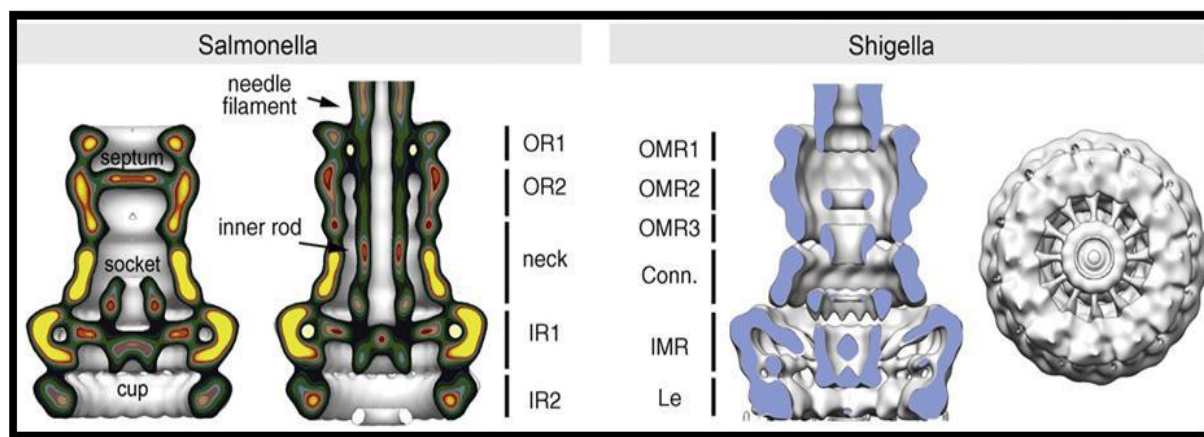


Fig. 10. Ultrastructure du corps basal de *Salmonella* et *Shigella*: OMR (Outer Membrane Ring), IMR (Inner Membrane Ring), Conn. (connector), Le (leg) pour *Shigella*, et OR (outer membrane ring), IR (inner membrane ring) pour *Salmonella* [98].

Les anneaux sont composés de la sécrétine MxiD exportée de façon Sec-dépendante [88, 99, 100]. MxiD et ses homologues sont formés de 12 à 14 sous-unités insérées dans la membrane externe [101-104]. La stabilité de ces sécrétines dans le périplasma, leur oligomérisation et leur association à la membrane externe, dépend des protéines MxiM qui lient spécifiquement l'extrémité C-terminale de MxiD (MxiD₅₅₃₋₅₇₀) [94, 105, 106].

Une étude remarquable réalisée par Okon *et al.* [106] a permis d'établir la structure 3D du complexe MxiM₂₈₋₁₄₂-MxiD₅₅₃₋₅₇₀. Cette étude montre que le lipide est attaché de manière covalente, après la traduction, via un résidu cystéine conservé du côté N-terminal de MxiM. Ces auteurs montrent que MxiM partage une similitude structurale et fonctionnelle avec LolA

et LolB [106]. Cette observation les a conduits à proposer un modèle expliquant comment MxiM assiste l'assemblage de MxiD (Fig. 11).

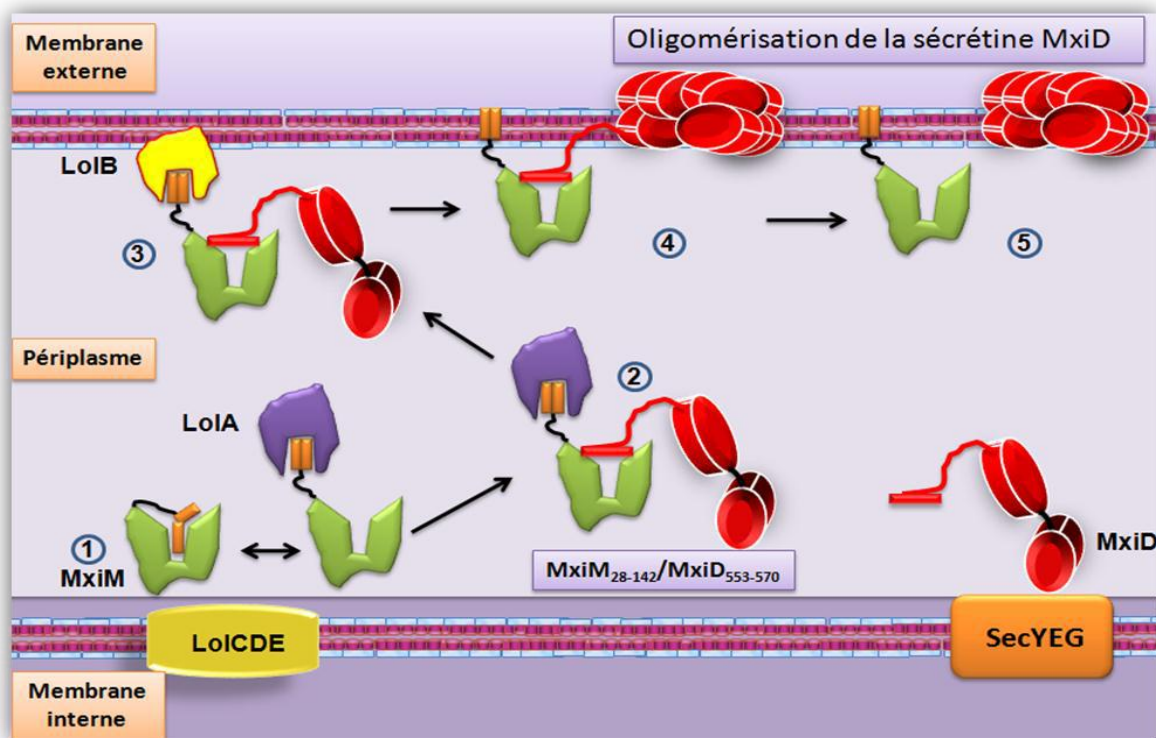


Fig. 11. Mécanisme d'assemblage des anneaux de la membrane externe. (1) LolA interagit avec MxiM via le domaine de fixation avec les lipides. (2) Cette interaction libérerait le site de liaison et permettrait de recruter MxiD, de sorte que l'extrémité C-terminale de MxiD soit engagée dans une liaison avec MxiM. (3) Une fois formé, le complexe ternaire LolA-MxiM-MxiD, migrerait au niveau de la membrane externe grâce à l'action concertée avec LolB qui, en se liant sur LolA, (4) permettrait de guider la lipoprotéine MxiM pour se fixer sur le feuillet interne de la membrane externe. (5) MxiM pourrait ainsi interagir, par sa région lipophile avec les lipides de la membrane, et assister MxiD à s'assembler dans la membrane externe [106].

3.4.3.2. Le bulbe

Les protéines Spa47, Spa40, MxiA, Spa9, Spa29 et Spa24 possèdent de grandes similarités de séquence avec les protéines formant l'appareil d'exportation flagellaire ; FliI, FlhB, FlhA, FliP, FliQ et FliR, respectivement. De tous les SST3 observés, seul celui de *Shigella* a permis l'observation d'une telle structure cytoplasmique collée au domaine transmembranaire de l'appareil de sécrétion. De plus, ce bulbe est aussi composé des protéines cytoplasmiques telles que Spa33, MxiN et MxiK, toutes impliquées dans la fonction du SST3. La caractérisation des composantes du bulbe représente une grande partie de ce travail de thèse.

3.4.3.2.1. Les protéines membranaires : MxiA, Spa24, Spa9, Spa29, et Spa40

MxiA possède 7 domaines transmembranaires (DTM) et un large domaine cytoplasmique (MxiA₃₁₆₋₆₈₆) [107]. Le domaine cytoplasmique C-terminal, très variable, a été récemment cristallisé [108]. En dépit du rôle crucial de cette protéine dans la virulence de *Shigella*, aucune interaction entre MxiA avec d'autres composants du SST3 n'a pu être mise en évidence avant le début de ce travail de thèse.

Les protéines transmembranaires Spa24, -9 et -29 présentent un degré élevé d'homologie, tant sur le plan physico-chimique que topologique, avec SpaP, -Q, et -R de *Salmonella*; YscR, -S et -T de *Yersinia*; et EscR, -S et -T d'*E. coli* entéropathogène [85]. Ces protéines forment le « proto-canal » [83]. Des études *in silico* montrent que les membres de ce groupe présentent tous des domaines transmembranaires (4 pour Spa24, 2 pour Spa9 et 5 pour Spa29) (**Fig. 12**). Spa24 contient un domaine soluble (Spa24₇₃₋₁₅₄), mais le haut degré d'hydrophobicité rend difficile la caractérisation du triplet. Dans ce travail, nous avons apporté des réponses permettant d'élucider la fonction jouée par les protéines du proto-canal (Résultats et Discussion).

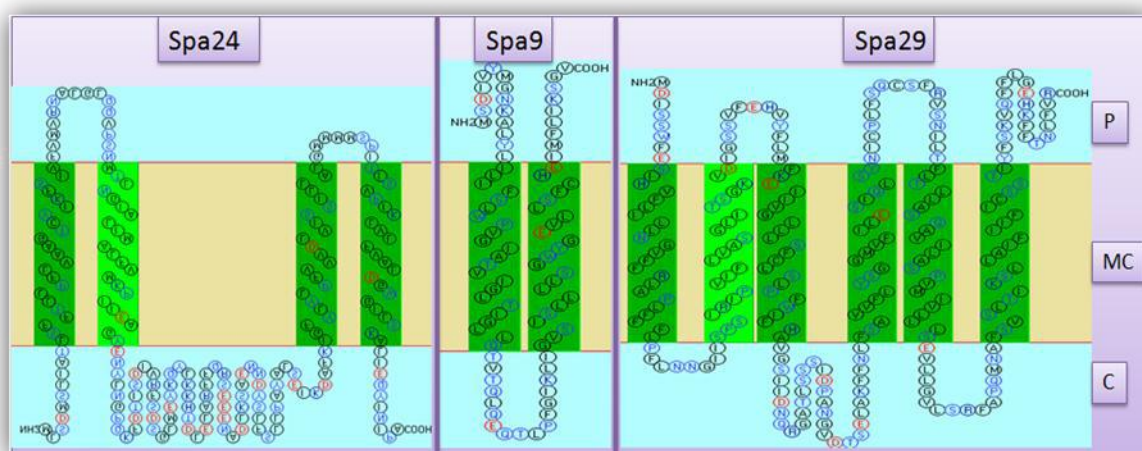


Fig. 12. Prédiction topologique des protéines du proto-canal : Spa24, Spa9 et Spa29, avec P : Périplasme, MC : membrane cytoplasmique et C. cytoplasme. (http://bp.nuap.nagoyau.ac.jp/sosui/sosui_submit.html).

Spa40 est une protéine de la membrane interne, son homologue, YscU, a été décrit et caractérisé chez *Yersinia* [109]. La protéine est constituée de 5 DTM et d'un large domaine cytoplasmique particulièrement conservé parmi d'autres homologues de la famille FlhB (**Fig. 13**).

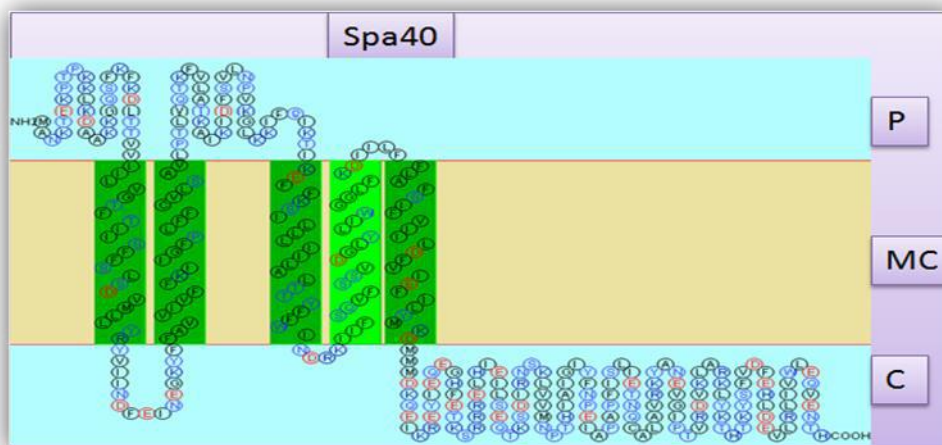


Fig. 13. Prédiction topologique des protéines du proto canal : Spa40, avec P : Périplasme, MC : Membrane Cytoplasmique et C : Cytoplasme (http://bp.nuap.nagoyau.ac.jp/sosui/sosui_submit.html).

Malgré de nombreuses études sur le rôle de Spa40 ou de ses homologues, le mécanisme d'action de cette protéine ainsi que ses éventuels partenaires d'interaction restaient totalement inconnus avant l'entame de notre travail de thèse qui a contribué à apporter des réponses permettant d'élucider le mode d'action de Spa40 dans la virulence (Résultats et Discussion).

3.4.3.2.2. Les protéines cytosoliques

Des études effectuées dans notre laboratoire ont montré que Spa47 forme des complexes multiprotéiques en interagissant, indépendamment, avec MxiK et MxiN [110]. Par chromatographie et spectrométrie de masse, en condition native, il a été récemment montré que ces composants forment un complexe de 440 kDa [111]. Vu le poids moléculaire des quatre protéines, les auteurs proposent que certains composants soient en plusieurs monomères.

Spa47 code pour une ATPase dont les homologues les plus étudiés sont YscN de *Yersinia*, InvC de *Salmonella* et FliI du système flagellaire. Cette dernière serait localisée à la face cytoplasmique de la membrane interne [112].

L'observation par microscopie électronique des mutants *spa47*, *mxiK* et *-N* a montré que ces souches possèdent des SST3s dépourvus d'aiguilles alors que le bulbe et la base sont correctement assemblés. Ces trois protéines sont donc nécessaires au transit des composants de l'aiguille ainsi qu'à leur stabilité étant donné que les protéines MxiH et MxiI sont instables dans les mutants *mxiN* et *mxiK*. Le déficit de sécrétion chez ces mutants est pallié par la

surexpression des composants de l'aiguille MxiH et MxiI, prouvant ainsi le rôle accessoire de MxiN et MxiK dans la fonction de Spa47 [110].

3.4.3.4. L'aiguille

L'aiguille est une structure extracellulaire permettant d'injecter les protéines effectrices directement dans le cytoplasme de la cellule hôte. Des nombreuses observations de microscopie électronique ont permis de mettre en évidence sa composition ultrastructurale [87, 88, 100, 113].

3.4.3.4.1. Composants et assemblage

L'aiguille du SST3 traverse et relie les anneaux de la membrane interne à ceux de la membrane externe [114]. La purification des aiguilles des sécrétions de *Shigella* a montré qu'elles sont composées principalement des protéines MxiH et MxiI [88, 115]. La sécrétion de ces protéines est dépendante de la formation d'un corps basal complet et nécessite en plus la présence de l'ATPase Spa47. MxiH est une protéine hydrophile de 9 kDa, dont les centaines de monomères peuvent polymériser et aboutir à la formation d'une structure hélicoïdale de 50 nm de longueur [116] (**Fig. 14**).

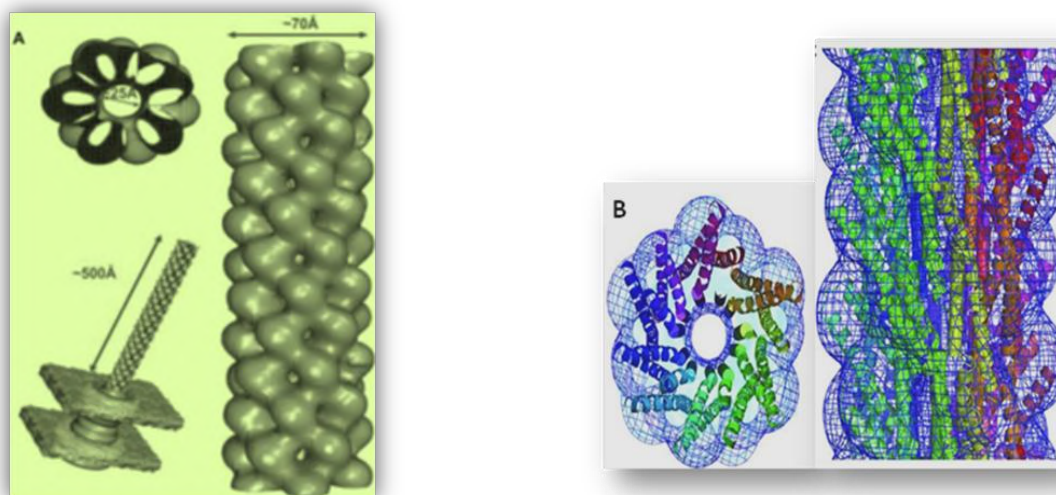


Fig. 14. Ultrastructure de l'aiguille du SST3. A. Représentation schématique des dimensions du sécrétion. B. Modèle ultrastructural représentant l'organisation de l'aiguille du SST3 de *Shigella* par l'emboîtement de 120 monomères de MxiH.

La dimension de l'aiguille ne peut permettre le passage de protéines en conformation native, ce qui suggère que les protéines sécrétées, doivent être partiellement « dépliées » avant

leur sécrétion [117]. La structure tridimensionnelle de MxiH montre qu'elle est formée de deux hélices α antiparallèles séparées par une courte boucle contenant un motif PxxL [118] (**Fig. 14**). La caractérisation de cette structure a permis d'élaborer le premier modèle atomique de l'aiguille de l'injectisome [119].

MxiI est aussi détectée dans des préparations de « needle complexe » (NCs) purifiés. L'analyse en microscopie électronique du mutant *mxiI* montre des structures dépourvues d'aiguilles [88]. La mise en place de YscI, homologue de MxiI, chez *Yersinia* est importante dans la sécrétion des effecteurs Yops [120].

Récemment, Edward A. Miao *et al* (2009) ont montré que MxiI et ses homologues pouvaient activer l'inflammasome via NLRC4 (Nod-Like Receptor family, CARD domain containing protein 4) qui les détecte via un motif conservé. Une étude préalable avait montré que *S. flexneri* et *P. aeruginosa* induisent l'activation de la caspase-1 via NLRC4 dans les macrophages indépendamment de la flagelline [121], bien que le mécanisme était encore mal connu.

3.4.3.4.2. Régulation de la longueur de l'aiguille

La longueur de l'aiguille est contrôlée et ajustée en fonction des autres macromolécules présentes à la surface de la bactérie. Cette constance implique un mécanisme de régulation assuré par la protéine Spa32 de *Shigella* [115, 122] ou ses homologues, YscP de *Yersinia* [113], InvJ de *Salmonella* [123] et FliK du système flagellaire [124]. La sécrétion de YscP semble être un pré-requis pour sa fonction [125], alors que celle de FliK et Spa32 n'est pas nécessaire à leurs fonctions [115, 126].

La régulation de la taille de l'aiguille est nécessaire pour que la bactérie puisse entrer en contact avec la cellule cible et permettre une insertion des translocateurs dans la membrane de cette dernière. Des études ont permis de mettre en évidence l'importance de la longueur de la taille de l'aiguille qui doit être régulée en fonction de la chaîne O du LPS [127].

Malgré les nombreuses études effectuées sur FliK et YscP (voir partie Discussion), aucune donnée bibliographique n'est disponible sur le mode d'action de Spa32. De plus, le mécanisme moléculaire utilisé par ces différentes protéines contrôlant la taille de l'aiguille est au centre d'une controverse et plusieurs modèles ont été avancés. Nous avons donc, dans ce travail de thèse, tenté d'élucider le rôle de Spa32 dans la virulence de *Shigella*.

4. LES EFFECTEURS : DE BONS IMMUNOSUPPESSEURS

Les cellules hôtes possèdent des molécules, appelées « PRMs » pour « Pattern Recognition Molecules », impliquées dans la reconnaissance de motifs moléculaires spécifiques aux bactéries pathogènes, appelés « PAMPS » pour « Pathogen-Associated Molecular Patterns », parmi lesquels on retrouve certains facteurs de virulence (effecteurs) sécrétés par le SST3. [128-130]. Ces effecteurs détournent les voies de signalisation de la cellule hôte au profit de la bactérie. Ils ont été classés en trois catégories en fonction de leur expression et sécrétion contrôlées partiellement ou totalement par l'activité du SST3 [65] (Fig. 15).

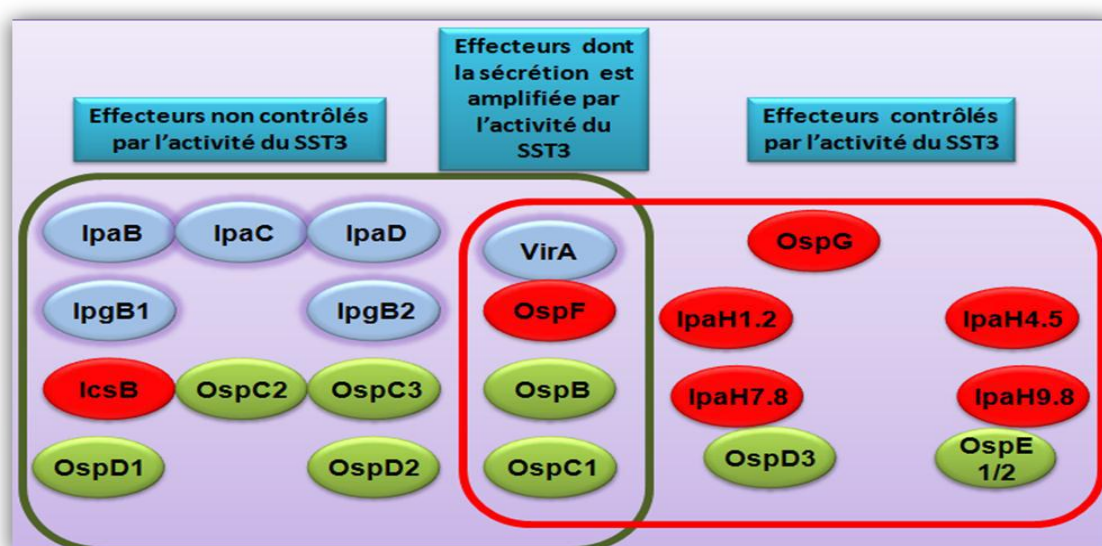


Fig. 15. Expression différentielle des effecteurs sous le contrôle ou non de l'activité du SST3 [65]. Les effecteurs produits indépendamment de l'activité du SST3 sont indiqués dans la zone verte. Les effecteurs dont la production est contrôlée positivement par l'activité du SST3 sont indiqués dans la boîte rouge, les effecteurs dont l'activité est accrue lorsque le SST3 est actif, sont affichés dans la zone de chevauchement. Les effecteurs impliqués dans l'entrée sont indiqués en bleu et ceux impliqués dans la suppression de la réponse innée sont indiqués en rouge. IpaB, IpaC et IpaD sont les translocateurs essentiels proposés pour délivrer les effecteurs dans les cellules hôtes. Les effecteurs en vert, encore mal connus, seraient impliqués dans les événements post-invasifs.

4.1. Les effecteurs précoces produits indépendamment de l'activité du SST3

Ces effecteurs précoces, incluant IpaA, IpaB, IpaC, IpgB1, IpgB2, IcsB et IpgD, sont tous impliqués dans l'entrée de la bactérie dans les cellules épithéliales et ont pour cible essentielle, le cytosquelette [131-134] (**Tableau III**).

Tableau III : Différents effecteurs précoces produits indépendamment de l'activité du SST3, [135-150]

Effecteurs	Activité biochimique	Cibles dans la cellule hôte	Fonction et/ou Phénotype	Références
IpaA	Activation de la vinculine	Vinculine, β 1- intégrines, Signalisation Rho	Efficacité de l'invasion, Réarrangement du cytosquelette, Déstabilisation de l'adhérence cellulaire	Izard <i>et al.</i> , (2006). Skoudy <i>et al.</i> , (2000). Demali <i>et al.</i> , (2006). Hamiaux, <i>et al.</i> , (2006). Tran Van Nhieu, <i>et al.</i> , (1999).
IpaB	Fusionne avec la membrane	Cholestérol, CD44, Caspase -1, Mad2L2	Contrôle de la sécrétion du SST3, Formation du translocon, Echappement au phagosome, Apoptose du macrophage, module le déroulement du cycle cellulaire	Blocker <i>et al.</i> , (1999). Chen <i>et al.</i> , (1996). Hartman, <i>et al.</i> , (1990). Hilbi, H., <i>et al.</i> , (1998). Humer <i>et al.</i> , (2003). Menard <i>et al.</i> , (1994). Iwai <i>et al.</i> , (2007).
IpaC	Polymérisation d'actine	Actine, β - caténine	Formation du translocon, Formation des filopodes, Echappement au phagosome, Perturbation au niveau des jonctions serrées des cellules épithéliales.	Blocker <i>et al.</i> , (1999). Harrington <i>et al.</i> , (2006) . Menard <i>et al.</i> , (1993). Tran Van Nhieu, <i>et al.</i> , (1999).
IpaD			Contrôle du SST3, Mise en place et insertion du translocon	Menard <i>et al.</i> , (1994). Veenendaal <i>et al.</i> , (2007).
IpgB1	Mimétisme RhoG	ELMO1/2	Induction de la perturbation membranaire dépendant de Rac	Alto <i>et al.</i> , (2007). Handa <i>et al.</i> , (2007). Ohya <i>et al.</i> , (2005). Hachani <i>et al.</i> , (2008).
IpgB2	Mimétisme RhoA	CRIVK, ROCKI, ROCKII, mDia1	Induction de la perturbation membranaire dépendant des filaments d'actines	Alto <i>et al.</i> , (2007). Hachani <i>et al.</i> , (2008).
IpgD	Phosphoinositide-4-phosphatase (PIP)	Phosphoinositide-4,5 - bisphosphate	Facilitation de l'entrée, contribution à la survie dans la cellule hôte.	Niebuhr <i>et al.</i> , (2002). Niebuhr <i>et al.</i> , (2000).
OspC2			Fonction mal connue	
OspC3			Fonction mal connue	
OspD1			Fonction mal connue. Anti-activateur de MxiE (<i>Shigella</i>).	Parsot <i>et al.</i> , (2005).
OspD2			Fonction mal connue	
IpaJ			Inhibition de la croissance (levure)	Slagowski <i>et al.</i> , (2008).
OspZ			Empêche la transmigration des PMN	Zurawsky <i>et al.</i> , (2008).

4.2. Les effecteurs partiellement contrôlés par le SST3

Parmi les effecteurs dépendant partiellement de la voie d'activation du SST3, on retrouve les gènes *Osp-B*, *F*, et *C1*, et *VirA* [65] (**Tableau IV**).

Tableau IV: Différents effecteurs contrôlés partiellement par l'activité du SST3 [150-155].

Effecteurs	Activité biochimique	Cibles dans la cellule hôte	Fonction et/ou phénotype	Références
OspF	Phosphothréonine lyase	MARKs, ERK et p38	Inhibition de la phosphorylation des histones et des gènes dépendant de l'activation de NF- κ B, Réduction du recrutement des PMN	Arbibe <i>et al.</i> , (2007). Kramer <i>et al.</i> , (2007). Li <i>et al.</i> , (2007). Zurawski <i>et al.</i> , (2006).
OspC1		Noyau et cytoplasme	Inhibition de la migration des PMN	Zurawski <i>et al.</i> , (2006).
OspB			Fonction mal connue	
VirA	Protéase à cystéine	α - et β -Tubuline	Facilitation de l'entrée et de la motilité intracellulaire par la dégradation des microtubules	Yoshida <i>et al.</i> , (2006). Yoshida <i>et al.</i> , (2002).

4.3. Les effecteurs dépendant entièrement de l'activation du SST3

Les travaux de recherches de ces dernières années ont prouvé que de nombreuses protéines sécrétées par le SST3 régulent négativement les signaux pro-inflammatoires (**tableau V**). Ces protéines responsables de la modulation de la réponse inflammatoire sont sécrétées plus tardivement, i.e. une fois que la bactérie est entrée dans la cellule. Elles ont donc été définies comme des effecteurs « tardifs » de l'invasion. La transcription et la sécrétion de ces protéines sont d'ailleurs contrôlées par l'activité du SST3. Parmi les effecteurs connus à ce jour dont la production est entièrement dépendante de MxiE et de l'activation du SST3, on retrouve *OspD3* (*SenA*), *OspE1/2* et *OspG* et les membres de la famille *IpaH* (chromosomique et plasmidique) [65] (**Tableau V**).

Tableau V: Différents effecteurs tardifs sous le contrôle de l'activité du SST3 [156-160].

Effecteurs	Activité biochimique	Cibles dans la cellule hôte	Fonction et/ou phénotype	Références
OspG	Protéine kinase, Inhibiteur d'ubiquitination	Enzymes conjuguées à l'ubiquitine	Dérégulation de l'activation des NF- κ B, Réduction de l'inflammation	Kim <i>et al.</i> , (2005).
OspD3/SenA,			Fonction mal connue	
OspE		Kinase lié à l'intégrine	Renforce l'adhérence cellulaire	Kim <i>et al.</i> (2009).
IpaH9.8	E3 Ubiquitine ligase	Facteur d'épissage U2AF ³⁵ , MARK kinase Ste7 (levure) NEMO /IKK γ et ABIN-1	Modulation du transcriptome de la cellule hôte, Réduction de l'inflammation, Dégradation des facteurs pro-inflammatoires	Rhode, <i>et al.</i> , (2007). Okuda <i>et al.</i> , (2005). Toyotome <i>et al.</i> , (2001). Ashida <i>et al.</i> , (2010).
IpaH7.8	Ubiquitine ligase	Ste7 (levure)	Efficacité dans l'échappement au phagosome	Fernandez-Prada <i>et al.</i> , (2000).
IpaH1.4	Ubiquitine ligase			
IpaH4.5			Fonction mal connue	
IpaH2.5			Fonction mal connue	

4.4. Les rafts lipidiques, bons médiateurs de l'infection à *Shigella*

Les rafts lipidiques sont des domaines membranaires composés majoritairement de cholestérol, glycosphingolipides, et GPI-AP (pour glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins). Les rafts se sont révélés importants dans la pathogénie d'un certain nombre de bactéries. Le cholestérol est, par excellence, un composant structurel important des membranes et un organisateur essentiel des sous-domaines membranaires [161].

Plusieurs bactéries utilisent les rafts pour reprogrammer certaines voies de signalisation cellulaire. L'implication des rafts a été démontrée au niveau des sites d'entrée de *Shigella flexneri* et *Salmonella* [162]. Le cholestérol et les sphingolipides sont essentiels pour l'adhésion de *Shigella* sur les cellules épithéliales. Les effecteurs précoces IpaB de *Shigella* et SipB de *Salmonella* sont des véritables ligands du cholestérol [163] avec un rapport stœchiométrique de 6 monomères de IpaB/SipB pour une molécule de cholestérol [164]. IpaB et SipB partagent leur double capacité de lier le cholestérol et de participer à la formation de pores avec quelques membres de la grande famille de toxines dépendantes du cholestérol (CDT, pour Cholesterol-Dependant Toxines) [165]. L'interaction IpaB/caspase-1 nécessite la

présence du cholestérol des membranes macrophagiques. Le mode d'activation de la caspase-1 par IpaB n'est pas encore éclairci, mais il a été suggéré que cette interaction permettrait le rapprochement et donc la dimérisation de la pro-caspase-1 aboutissant à son activation [166].

4.5. Mouvements intra- et inter-cellulaires

Après son internalisation dans la cellule, *Shigella* lyse rapidement la membrane qui l'entoure et se multiplie dans le cytoplasme de la cellule hôte avec un temps de génération de 40 minutes. Une fois libre, *Shigella* se déplace à l'intérieur de la cellule par un mouvement aléatoire brusque et rapide nommé *ics* (inter/intra-cellular spread). Le cytosquelette et ses « moteurs » jouent un rôle essentiel dans le positionnement des organites et le trafic membranaire. Sans surprise, beaucoup d'agents pathogènes utilisent à leur profit les fonctions du cytosquelette relatives au maintien et à la stabilisation des niches intracellulaires (**Fig. 16**).

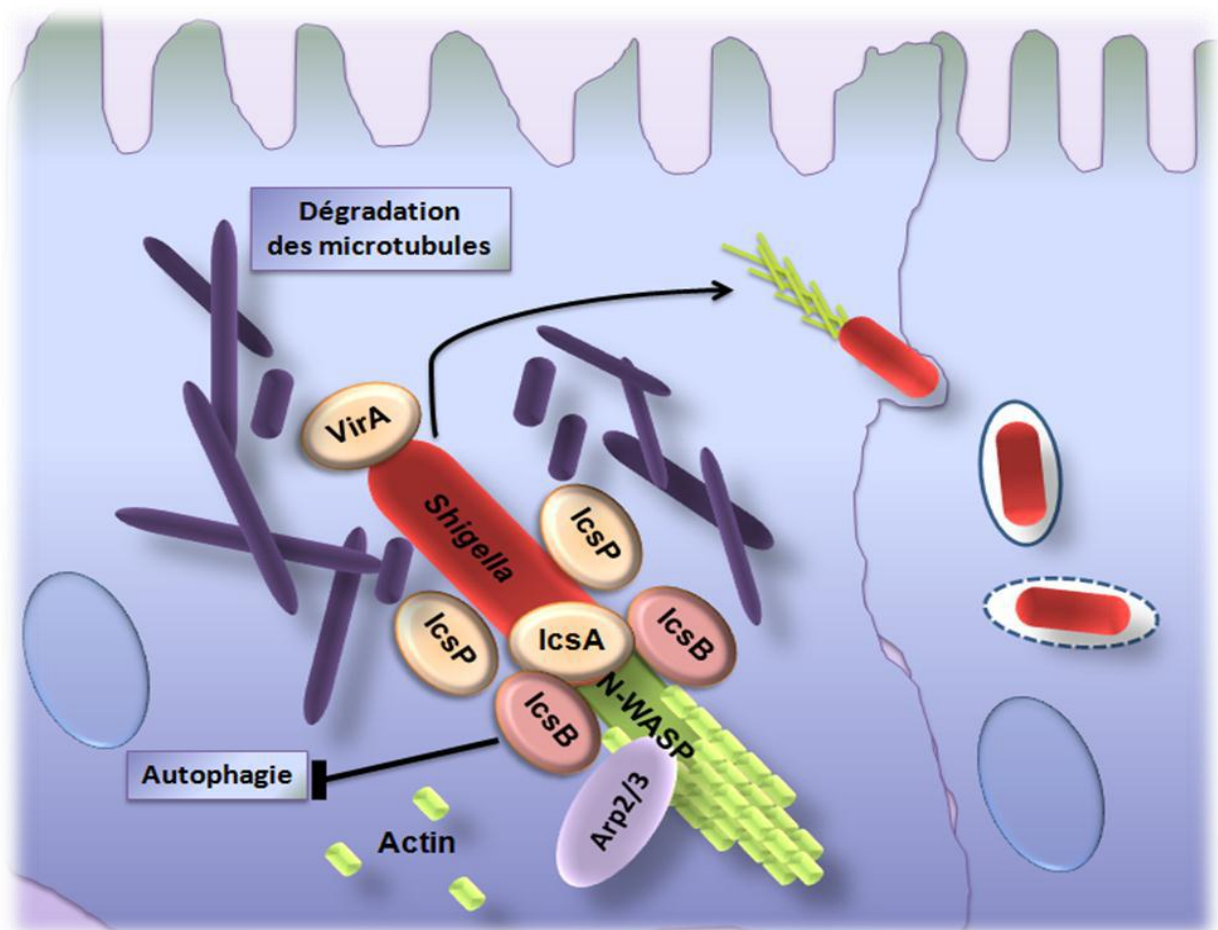


Fig. 16. Représentation schématique des acteurs du mouvement inter- et intra-cellulaire de *Shigella*.

Shigella est immobile car elle ne possède pas de flagelle. La protéine IcsA (VirG) est le médiateur principal de la polymérisation d'actine permettant les mouvements de la bactérie dans la cellule [167, 168]. IcsA est une protéine de 120 kDa et contient une séquence signal atypique (IcsA₁₋₅₂). Elle est ancrée dans la membrane externe via son domaine C-terminal (IcsA₇₅₈₋₁₁₀₂) formé d'une structure β en forme de tonneau, tandis que son domaine N-terminal est exposé à la surface bactérienne (IcsA₅₃₋₇₅₇ ou VirG α). IcsA est localisée uniquement à un pôle de la bactérie [167, 169, 170] où elle recrute et active, via son domaine N-terminal, des facteurs cellulaires parmi lesquels la protéine N-WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) et le complexe Arp2/3 [171] (**Fig. 16**). Le complexe multi-protéique ainsi formé permet la nucléation de l'actine et catalyse l'élongation d'une queue d'actine qui propulse *Shigella* à travers le cytoplasme (**Fig. 16**).

La localisation unipolaire d'IcsA ainsi que son activité, sont contrôlées par une sérine protéase appelée SopA/IcsP [172], une apyrase périplasmique, PhoN2 [173, 174], et par la longueur de la chaîne O du LPS [175]. IcsP est également localisée dans la membrane externe, et est capable de cliver IcsA, libérant son domaine actif (α -domain) dans le milieu extracellulaire [173, 176, 177].

Le mutant du gène *icsA* est capable d'entrer dans les cellules épithéliales avec la même efficacité que la souche sauvage. Par contre, il est incapable de se déplacer dans le cytoplasme cellulaire, de former des protusions ou de disséminer dans une monocouche cellulaire.

En plus du complexe formé par la nucléation des filaments d'actine, VirA, une cystéine protéase, sécrétée par le SST3 joue un rôle capital dans l'efficacité du mouvement intracellulaire et dans la propagation intercellulaire ultérieure [154]. VirA dégrade les α -tubulines, créant ainsi un tunnel dans le réseau dense intracellulaire des microtubules (**Fig. 16**). La motilité intracellulaire, la réplication et la survie dépendent d'un substrat du SST3, IcsB [178] qui a fait l'objet d'une partie de mon travail de thèse.

Ce mouvement permet à la bactérie d'induire la formation d'une protusion à la jonction entre la cellule hôte infectée et la cellule adjacente. Certains pathogènes intestinaux peuvent également perturber la barrière en modifiant directement la distribution ou le statut de phosphorylation des protéines des jonctions serrées. Par exemple, les EPEC, *Shigella flexneri* et *Salmonella* peuvent modifier le statut de phosphorylation et la distribution de l'occludine et des zonula occludens (ZO1), ce qui permet aux bactéries de perturber la fonction de la barrière épithéliale [179]. En outre, le rôle d'un effecteur spécifique n'a pas été clairement

identifié. Il sera important de mettre en évidence cette interaction cruciale et de comprendre véritablement le rôle des modifications des jonctions serrées pendant l'infection par *Shigella*.

4.6. Les chaperons : les premiers acteurs de la sécrétion et de la translocation

Deux termes sont clairement utilisés pour décrire le transport des protéines effectrices par les SST3s. Le terme « sécrétion » désigne l'événement de transport des protéines du cytosol vers le milieu extracellulaire et la « translocation », quant à elle, est le transport des protéines du cytosol bactérien au cytosol de la cellule eucaryote. La prise en charge et la reconnaissance des protéines nécessitent certaines caractéristiques.

4.6.1. Le signal de sécrétion

Plusieurs recherches actuelles sont axées, d'une part, sur l'identification des nouveaux effecteurs afin de mieux comprendre les liens moléculaires entre hôtes et agents pathogènes; et d'autre part, sur l'étude des processus biologiques qui conduisent à la spécificité de transport des protéines par la machinerie du SST3. Cela inclut notamment la composition moléculaire de la reconnaissance des effecteurs et l'initiation de transport par le SST3, qui sont pour la plupart inconnues.

Les protéines sécrétées par les SST3s se distinguent par l'absence d'une séquence-signal classique dans l'extrémité N-terminale [180, 181]. Ce signal semble conservé entre les SST3s des différents pathogènes puisque certaines protéines de *Shigella* peuvent être sécrétées par d'autres bactéries [182]. De nombreuses études ont tenté de « décoder » la nature exacte du signal ciblant les substrats vers le SST3. A l'heure actuelle, toutes les hypothèses font l'objet d'une controverse.

Deux théories ont été avancées conduisant les effecteurs à la reconnaissance par le SST3 (Fig. 17). La première théorie admet que la sécrétion est médiée par les 20 premiers acides aminés [180, 183]. La deuxième théorie stipule que ce signal pourrait faire partie de l'ARN messager [184]. Cependant, aucune interaction physique entre l'appareil de sécrétion et les complexes ARNm-ribosome n'a été décrite.

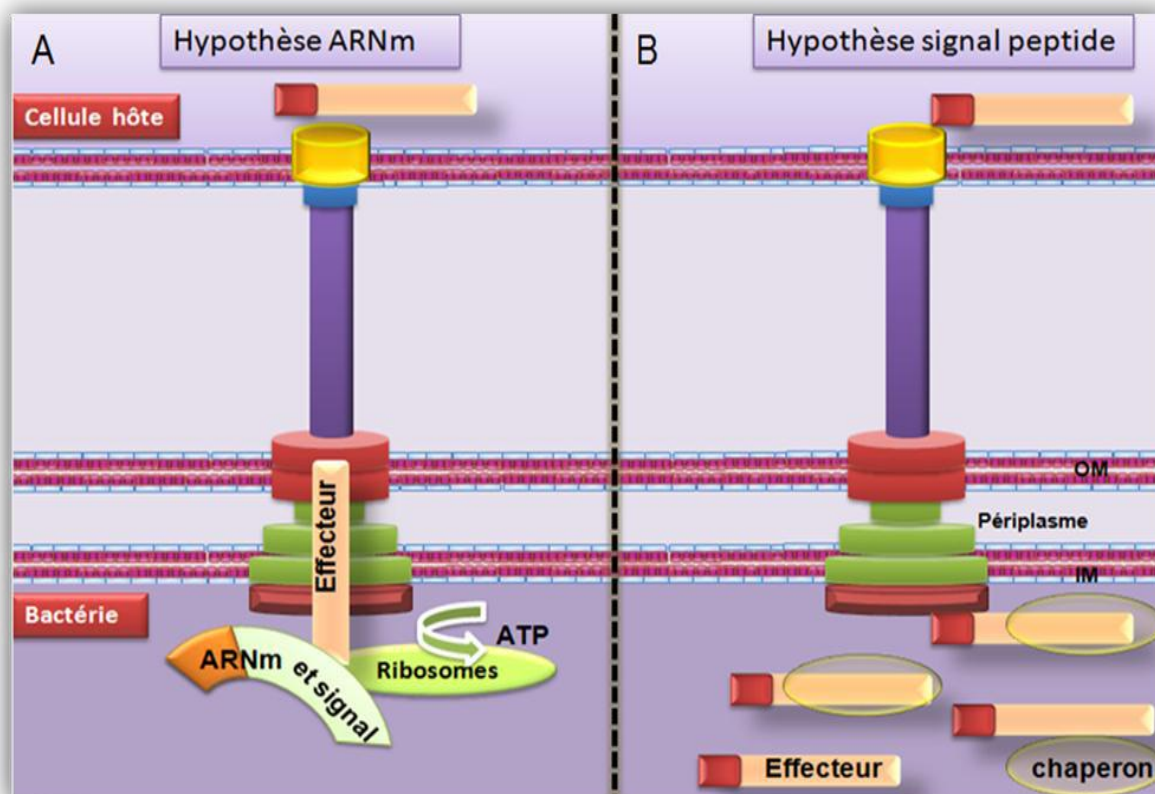


Fig. 17. Représentation schématique du mécanisme de sécrétion des effecteurs. (A) Hypothèse ARNm. (B) droite hypothèse signal de sécrétion. La sécrétion dépend aussi de l'assistance des chaperons qui amplifient le signal [185].

D'autres études tendent à prouver que le signal de sécrétion est constitué d'une alternance de résidus polaires et hydrophobes dans le domaine N-terminal de la protéine [186].

4.6.2. Le rôle des chaperons dans la translocation

Contrairement à la sécrétion, la translocation utilise deux mécanismes simultanés : le signal de sécrétion (les 20 premiers acides aminés) et le signal de translocation (les résidus de 20 à 100) [187, 188]. Le stockage des effecteurs fait intervenir de petites protéines appelées chaperons qui jouent un rôle important dans le mécanisme de translocation [185, 189-192]. Le complexe chaperon-effecteur pourrait constituer le signal tridimensionnel reconnu par le SST3 [193-196].

Les chaperons du SST3 ne partagent pas une similarité significative, même au sein d'un même groupe. Toutefois, elles partagent des caractéristiques communes : un faible poids

moléculaire (entre 9 et 15 kDa), un point isoélectrique acide (entre 4 et 5), une tendance à former des dimères [62, 189, 197], et une structure tridimensionnelle qui se replie de la même manière (3 hélices α et 5 feuillets β) [188, 193, 196, 198, 199] (**Tableau VI**).

Tableau VI : Différents types de chaperons avec les effecteurs correspondants [60, 148, 200-202].

chaperons	Classes	Effecteurs	Références
IpgC	Classe IA Chaperon des translocateurs / effecteurs	IpaB, IpaC	Menard <i>et al.</i> , (1994). Birket <i>et al.</i> , (2007).
IpgE	Classe IA Chaperon à un seul effecteur	IpgD	Niebuhr <i>et al.</i> , (2000).
IpgA	Classe IB Chaperon à un seul effecteur	IcsB	Ogawa <i>et al.</i> , (2003).
Spa15	Classe IB Chaperon à plusieurs effecteurs	IpaA, IpgB1 et 2, OspC2, C3, B et D1	Page <i>et al.</i> , (2002).

Beaucoup de protéines effectrices utilisent des chaperons dans le cytosol bactérien (**Tableau VI**). Malgré la richesse en informations à propos des chaperons, un modèle universel fait défaut pour les mécanismes par lesquels se fait la translocation. Bien que récemment, il ait été proposé que la translocation des protéines pourrait se faire par un mécanisme électrostatique répulsif à travers l'appareil de sécrétion de type III [203]. Le mécanisme de couplage sécrétion / translocation semble être beaucoup plus complexe. Une étude avait montré que l'orientation du complexe chaperon-effecteur, vers le SST3, est médiée par l'affinité des chaperons pour l'ATPase (**Fig. 18**).

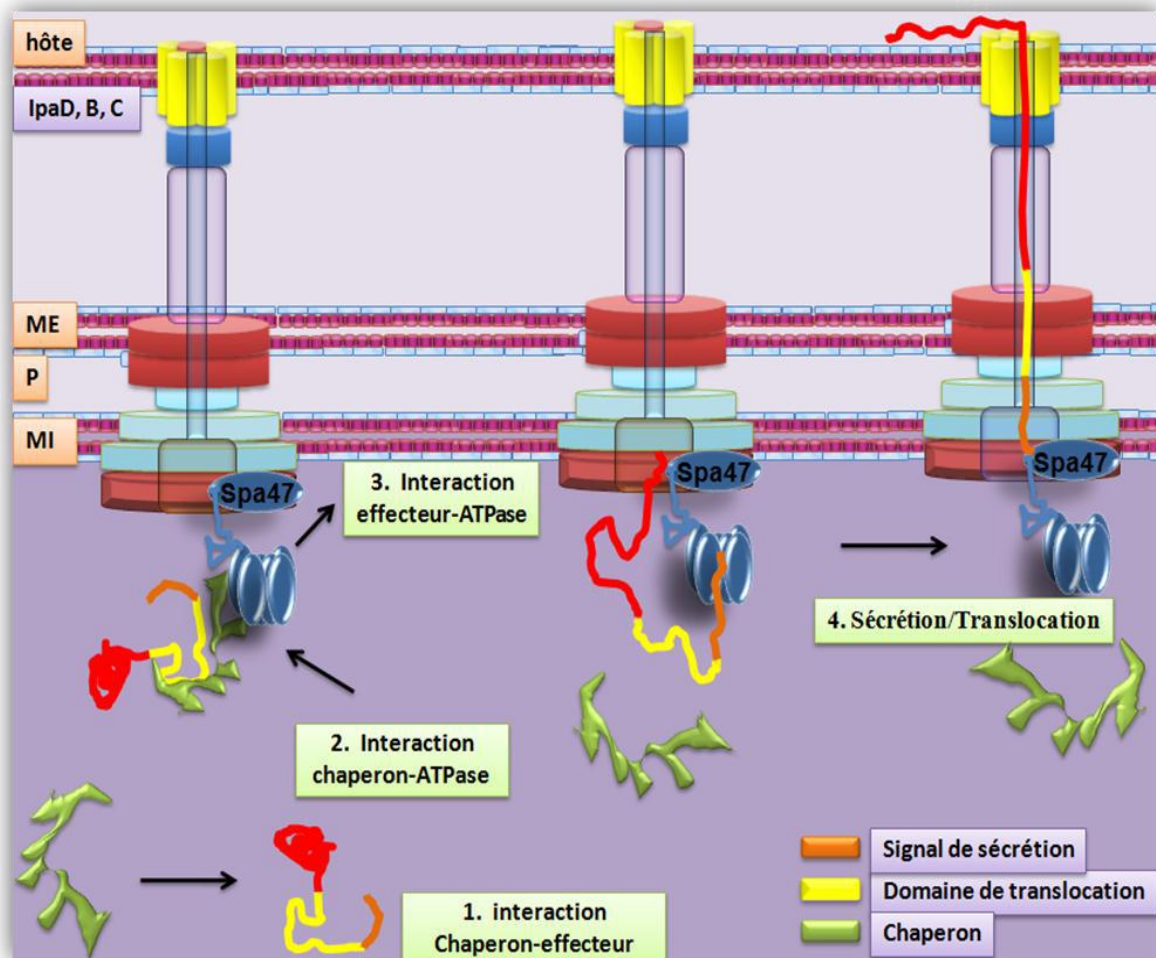


Fig. 18. Modèle du mécanisme de sécrétion et translocation des effecteurs. Ce modèle propose que l'ATPase (Spa47), interagisse avec l'effecteur, libère le chaperon et prenne en charge la protéine effectrice dépliée pour sa translocation [204]. Il a été aussi montré que les chaperons ont une influence sur la hiérarchie de sécrétion. Ce mécanisme se fait grâce à une compétition entre les substrats du SST3 et les chaperons [205-207].

En dehors du rôle de protéine chaperon joué par Spa15, très récemment, il a été montré qu'elle joue un rôle anti-apoptotique dans les cellules HeLa. Ainsi, les mutants *mxiE* et *spa15* étaient les seuls incapables d'inhiber l'apoptose. Spa15 est sécrétée après deux heures, dans les cellules épithéliales, en se basant sur des expériences en condition d'induction rouge congo et des expériences d'immunofluorescence dans les cellules infectées [208]. Ces résultats suggèrent que Spa15 pourrait appartenir à une nouvelle classe de chaperon/effeteur.

4. 7. Autophagie

L'autophagie est un processus catabolique intracellulaire qui aboutit à la dégradation lysosomale d'organelles et de complexes protéiques de grosse taille [209]. Elle est induite lors d'un stress, d'une privation en nutriments, d'une infection bactérienne ou virale.

Le gène *icsB*, étudié dans ce travail, code pour une protéine effectrice jouant un rôle important dans les mécanismes de protection contre l'autophagie [178]. Il n'est pas exclu que d'autres effecteurs de *Shigella* puissent aussi avoir un rôle direct ou indirect dans l'activation de l'autophagie ou la protection contre ce processus.

Malgré la diversité des processus autophagiques qui ont été décrits dans la littérature, ils convergent tous dans l'un des trois principaux types: macroautophagie souvent appelée simplement autophagie, microautophagie et autophagie médiée par les chaperons (CMA, pour Chaperone-Mediated Autophagy) [210].

4.7.1. L'autophagie médiée par les chaperons (CMA)

La plupart des cellules eucaryotes sont équipées de cette forme d'autophagie, connue sous le nom du CMA [211]. Elle est régulée positivement pendant des périodes de stress cellulaire prolongé ou lorsque l'autophagie diminue. La CMA est sélective pour un groupe particulier de protéines solubles cytosoliques qui contiennent une signature de séquence spécifique. Contrairement à d'autres formes d'autophagie, la CMA ne nécessite pas des vésicules de formation intermédiaires [212]. Une fois la signature identifiée, ces protéines solubles sont directement transférées à la membrane lysosomale. Cette signature de séquence, présente dans tous les substrats de la CMA, est un motif pentapeptidique, KFERQ, qui se lie biochimiquement à la chaîne des chaperons cytosoliques requises dans la voie de la CMA [213] (**Fig. 19**).

Le chaperon moléculaire cytosolique Hsc70 et ses co-chaperons reconnaissent le motif KFERQ sur les substrats [214]. Le complexe chaperons/substrat est transféré à la membrane lysosomale où il se fixe sur un récepteur protéique, LAMP-2A (pour Lysosome-Associated Membrane Protein type 2a) [215] (**Fig. 19**). Un second chaperon lysosomal, Hsp73, est requis pour la translocation complète du complexe protéine-Hsc70 dans la matrice du lysosome où il est complètement dégradé par les protéases [216]. Hsp90 est aussi associé aux lysosomes et affecte l'activité de la CMA en favorisant la translocation des substrats. Une autre forme de

Hsp90 présente dans la lumière du lysosome est requise pour la stabilité de LAMP-2A en permettant le passage de la forme monomérique à la forme multimérique [217].

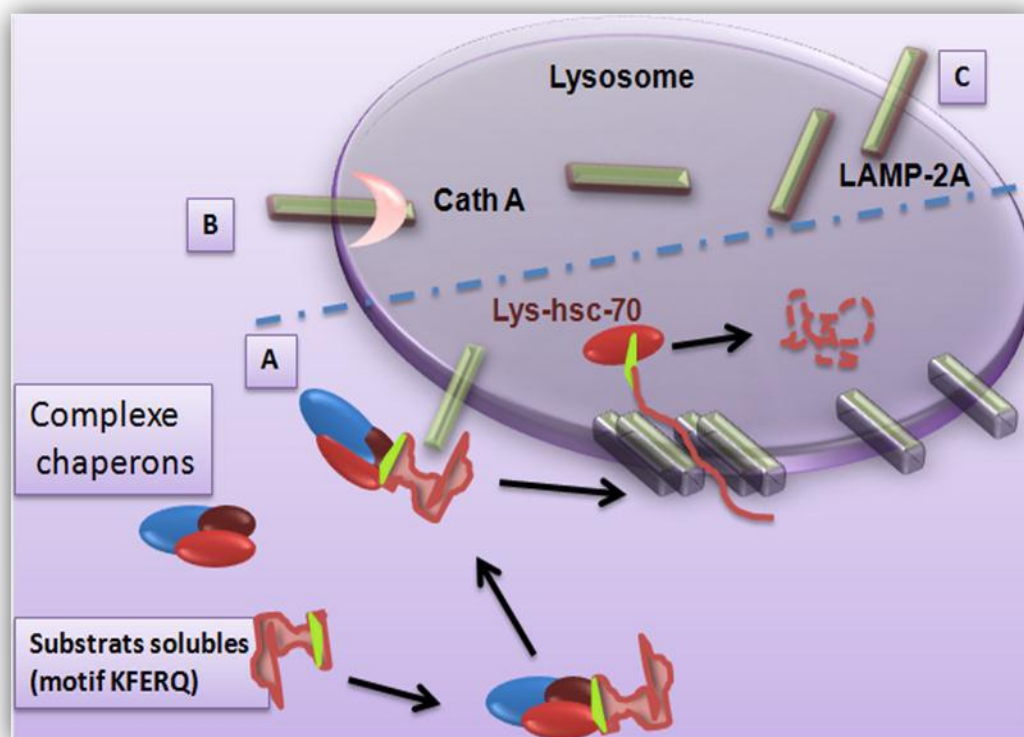


Fig. 19. Représentation schématique du mécanisme de l'autophagie médiée par les chaperons (CMA : Chaperone-Mediated Autophagy). Les composants de base y sont représentés. (A) reconnaissance par le complexe chaperons des cargos via le motif KFERQ, organisation des LAMP-2A et translocation dans la lumière du lysosome où le substrat est dégradé. Les niveaux de LAMP-2A sont régulés par une dégradation dépendant de la cathepsine (CathA) (B et C) [218].

4.7.2. Microautophagie

La microautophagie est un procédé qui agit en masse, capture de petites parties du cytosol, et les internalise directement par invagination de la membrane lysosomale [219] où les protéines sont continuellement dégradées même en condition de repos [220]. Les récentes études sur ce type d'autophagie se sont principalement focalisées chez la levure et dans certains systèmes acellulaires [221]. Certains gènes de la macroautophagie chevauchent avec ceux de la microautophagie. Quelques gènes sont toutefois spécifiques à la microautophagie [222]. La microautophagie est régulée positivement dans des conditions de stress cellulaire, telles que la privation en éléments nutritifs.

4.7.3. Macroautophagie

La macroautophagie désigne habituellement le terme général de l'autophagie. Elle est caractérisée par une double membrane. La macroautophagie est la forme d'autophagie la mieux caractérisée au niveau moléculaire par l'étude de la génétique des levures. Dans ce modèle, 31 gènes appelés *atg* (pour autophagy-related genes), impliqués activement dans l'autophagie, ont été identifiés [210]. Plus de 50 autres gènes, jouant le rôle dans d'autres voies, semblent être impliqués dans le processus de l'autophagie [223]. Une dizaine de gènes homologues ont été identifiés chez les mammifères.

4.7.3.1. Activation du processus biologique de l'autophagie

La stimulation de l'autophagie peut être exogène (bactéries, virus, parasites et autres) ou endogène (organelles et composants des voies de signalisation cellulaire).

Les bactéries à croissance intracellulaire ou qui résident dans le cytoplasme de la cellule hôte comme *S. flexneri*, *Francisella tularensis*, *Listeria monocytogenes*, *Burkholderia pseudomallei*, *Rickettsia* spp., et *Streptococci* du groupe A induisent l'autophagie [178, 224]. Les bactéries qui résident dans les vacuoles modifiées, telles que *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhimurium* et *Mycobacterium tuberculosis*, stimulent aussi l'autophagie [225-227].

Mis à part chez les virus, les composants qui activent la formation de l'autophagosome chez les bactéries sont mal connus. Néanmoins, IcsA (VirG) de *Shigella* contient un motif qui interagit avec ATG5 et conduit vers la voie autophagique [178]. Bien que les mécanismes par lesquels se fait l'activation ne sont pas encore clairement établis, il a été montré que l'autophagie peut être activée par les PRR (Pattern-Recognition Receptor) dans le modèle de drosophile [228], ainsi que dans les cellules épithéliales et fibroblastiques infectées par *L. monocytogenes*. La souche de *Listeria* mutée pour la listériolysine O (LLO) est incapable d'induire l'autophagie [229, 230]. Très récemment, Meyer-Morse *et al.*, [231], ont montré que la LLO de *Listeria* est capable à elle seule de stimuler l'autophagie [230]. Certaines des mêmes molécules utilisées pour libérer les constituants cytoplasmiques pourraient livrer certains pathogènes à la voie de l'autophagie. C'est le cas des PAMPs (pour Pathogen-Associated Molecular Patterns) ou les DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) libérés par les microorganismes [232].

Récemment, Dupont *et al.* [233] ont montré que les fragments membranaires du phagosome générés par l'infection de *S. flexneri* permettent d'activer la production des cytokines et l'induction de l'autophagie.

4.7.3.2. Déroulement du processus de l'autophagie

Le processus biologique de l'autophagie se fait en trois étapes: initiation, élongation et maturation de l'autophagosome (**Fig. 20**).

Après un signal d'induction, l'autophagie commence avec la formation d'une double membrane qui, appelée phagophore ou membrane d'isolement, entoure une portion de cytosol incluant de grands organites tels que les mitochondries et les peroxysomes [234] et/ou de bactéries, virus, parasites, jusqu'à enfermement complet de ce matériel dans une vacuole appelée autophagosome. A ce stade, l'autophagosome est encore dépourvu d'enzymes lysosomales. Un marqueur des vacuoles d'autophagie, qui est la protéine LC3 (pour microtubule associated protein Light Chain 3, l'orthologue de la protéine de levure ATG8), joue un rôle dans les étapes initiales de formation des vacuoles : une partie reste piégée à l'intérieur de ces compartiments [235]. L'origine des membranes est encore mal connue, bien que certaines données indiquent qu'elles proviennent du reticulum endoplasmique, parfois sous l'effet d'un stress [236, 237]. Néanmoins, plusieurs protéines ATG, telles que la protéine Beclin 1 (homologue d'ATG6 de la levure), ATG5, ATG7, ATG12, et Vps34 (class III PI3K), sont essentielles pour la formation du phagophore qui constitue le soubassement de l'autophagosome [238, 239].

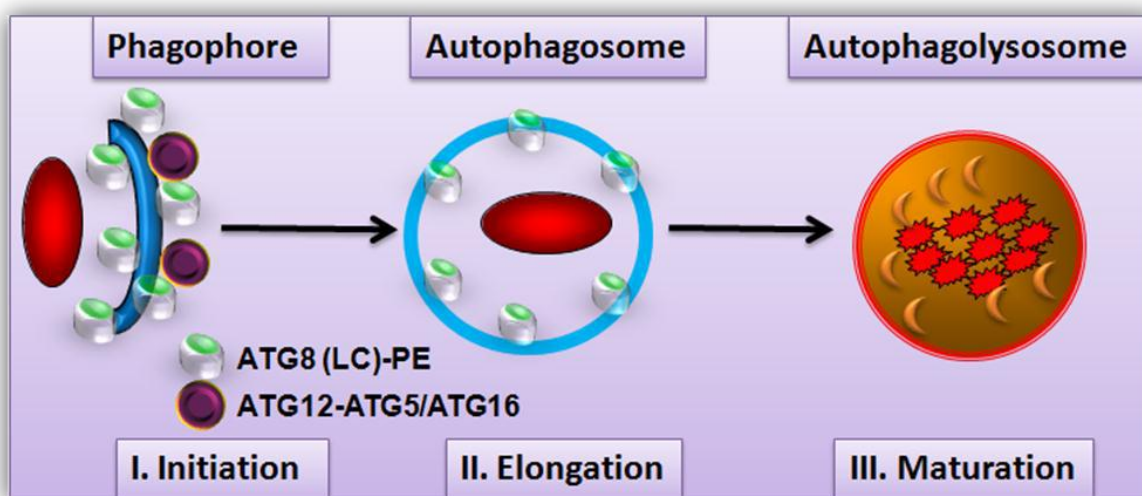


Fig. 20. Représentation schématique des différentes étapes du processus de l'autophagie.

La formation d'autophagosome semble être orchestrée par la conjugaison de deux systèmes protéine-protéine et protéine-lipide (**Fig. 21**). Le premier système est représenté par deux composants ATG5-ATG12 liés de manière covalente. Ce complexe interagit de manière non covalente à ATG16L (l'équivalent chez les mammifères de l'ATG16 de levure) pour former l'enzyme putative E3 [240] qui, après changement de conformation, dirige la formation du second système conjugué protéine-lipide [241] représenté par LC3-II (LC3-PE) qui contient un phosphoéthanolamine dans sa région C-terminale et permet l'association avec la membrane de l'autophagosome en assistant à sa mise en place. Une fois les liaisons membranaires formées, le complexe ATG12-ATG5-ATG16 se dissocie de l'autophagosome tandis que LC3-II reste et devient une protéine structurale autophagosomale importante qui exécute d'autres fonctions en interagissant avec le motif WXXL contenu dans les molécules adaptatrices p62 [242] et NBR1 [243]. Ces interactions permettent la capture de certains « cargos » cytoplasmiques destinés à la dégradation tels que les agrégats de protéines qui sont trop grands pour le système de dégradation protéosomale.

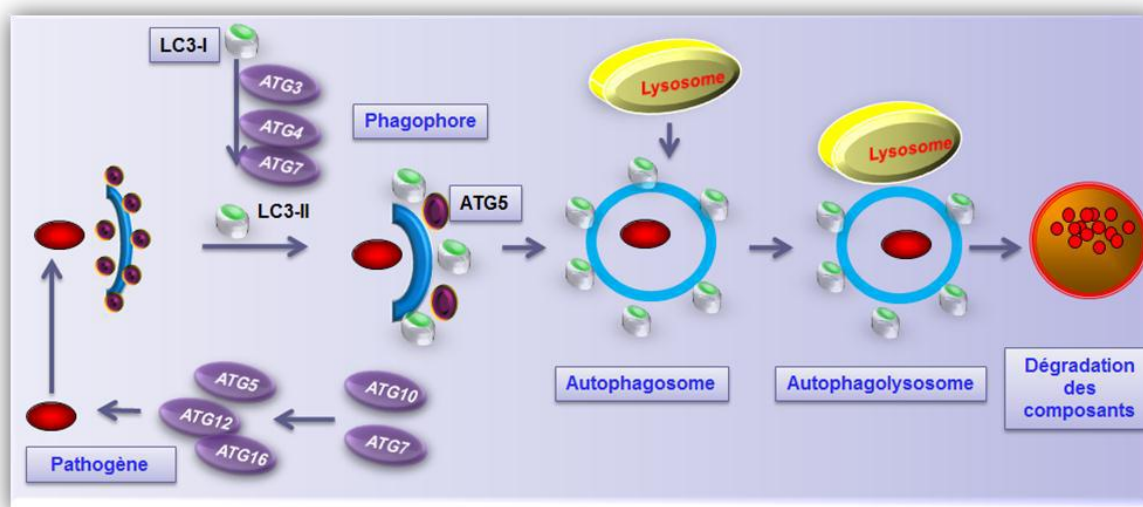


Fig. 21. Schématisation de la formation de l'autophagosome et de la fusion lysosomale [244].

L'autophagosome subit des étapes de maturation et fusionne d'abord avec les endosomes pour devenir un amphisome, puis la membrane extérieure fusionne avec les lysosomes et devient alors un autophagolysosome [245] (**Fig. 21**). Deux complexes de kinases travaillent de concert pour coordonner ou moduler la formation, la circularisation et la fusion avec les compartiments lysosomaux : il s'agit du complexe kinase Beclin-Vps34 et mTor

(pour mammalian Target of rapamycin) [220]. Les restes des membranes sont détruits par les estérases lysosomales, les lipases et les protéases.

4.7.3.3. Régulation de l'autophagie

La régulation de la biogenèse de l'autophagosome, de la maturation et de la fusion avec des lysosomes est un processus complexe qui nécessite plusieurs voies de signalisation (**Fig. 22**). Les multiples apports nutritionnels, transduits par le biais de protéines et la cascade de signalisation des lipides kinases, régulent l'autophagie. L'ATP, qui est un activateur endogène de la réponse inflammatoire, peut stimuler l'autophagie par le biais du récepteur P2X7 [246, 247].

Tous les facteurs stimulant l'autophagie convergent vers deux voies principales de signalisation (**Fig. 22**) : la première est nécessaire dans les étapes initiales de la formation des vésicules, cette voie fait intervenir la Beclin 1 (ATG6), hVps34 (PI3K), ATG14 et hVps15 (p150). La deuxième voie, quant à elle, est importante dans les étapes de nucléation des vésicules, et comprend ATG1, ATG11, ATG13, ATG17. Cette deuxième voie est contrôlée par mTOR qui est une sérine/thréonine kinase classique. La privation de nutriments ou le traitement des levures par la rapamycine augmente l'induction de l'autophagie [248]. Dans les cellules eucaryotes, mTOR module l'autophagie de la même manière que dans la levure [249] (**Fig. 22**). Les aspects métaboliques de l'autophagie sont contrôlés négativement par les facteurs de croissance tels que le récepteur à l'insuline, le PI3K (type I phosphatidylinositol 3 kinase) et l'Akt/PKG [250].

La protéine Beclin 1 est un véritable « chef d'orchestre » pour la régulation de l'autophagie. Elle existe sous forme de complexe contenant la protéine hVps34 et hVps15 (p150) (**Fig. 22**). Ce complexe s'associe avec certains composants tels qu'ATG14 et Vps38/UVRAG (UV radiation Resistance Associated Gene) qui jouent un rôle dans l'initiation de l'autophagie [251]. Le complexe Beclin 1 peut contenir plusieurs autres composants qui peuvent moduler positivement sa fonction tels que les facteurs Ambra 1 et Bif-1/Endophilin B1 [252, 253].

Le rôle exact de hVps34 n'est pas encore connu, mais pourrait jouer un rôle de pivot dans la formation de la membrane de l'autophagosome [254]. Cet enzyme favoriserait l'interaction ATG18 et les autres classes de PI3Ks sur la membrane de l'autophagosome, la

lipidation des LC3 et la maturation autophagosomale [241, 251, 255]. Les PI3K de classe I et III sont impliqués dans les étapes précoces de formation des autophagosomes [256].

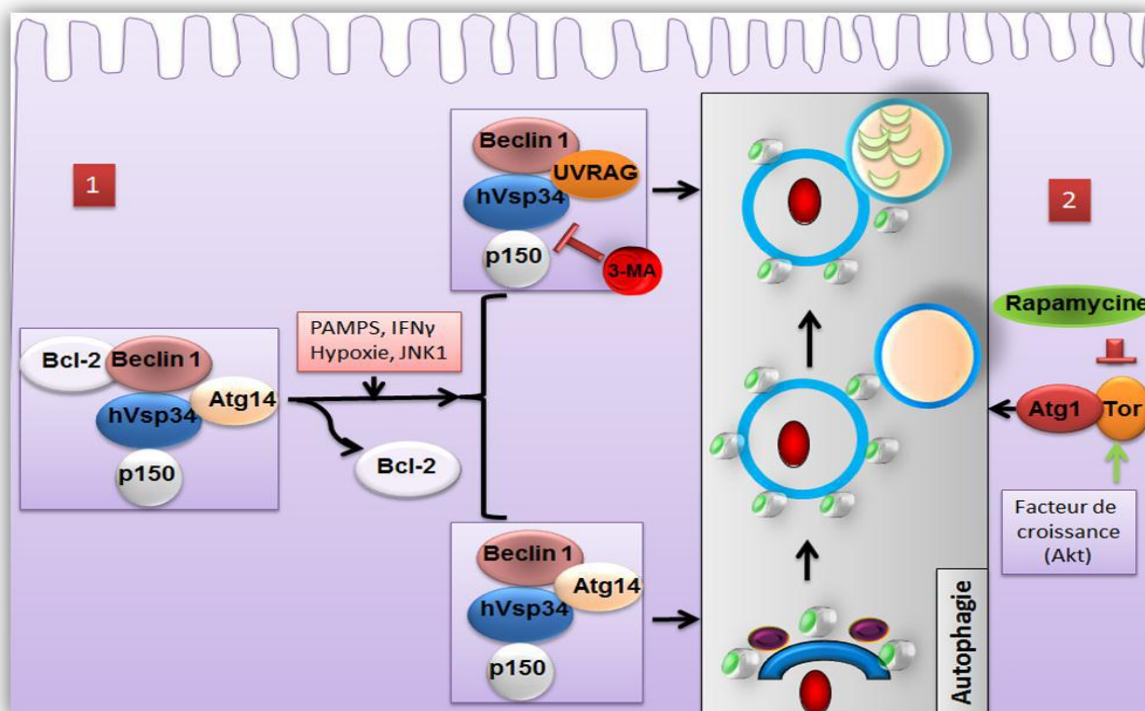


Fig. 22. Représentation schématique des voies de régulation de l'autophagie. (1) La première voie fait intervenir la Beclin 1 (ATG6), hVps34 (PI3K), ATG14 et hVps15 (p150). (2) La deuxième voie comprend ATG1, ATG11, ATG13, ATG17. Cette deuxième voie est contrôlée par mTOR.

4.7.3.4. Rôle de l'autophagie dans l'immunité des affections bactériennes

L'autophagie, en plus de son rôle dans des processus physiologiques comme le développement, la croissance, la longévité et la mort cellulaire programmée, représente une véritable machine « autonome » régulant la capture et la dégradation des bactéries pathogènes [257]. Des composés, non essentiels variant en complexité et en taille, allant des protéines individuelles jusqu'aux organelles sont dégradés pour libérer des unités simples qui sont alors utilisées pour des réactions biosynthétiques vitales [257].

L'autophagie représente un système de surveillance de l'immunité innée à part entière pour tous les envahisseurs du cytoplasme. Toutes les bactéries qui peuvent envahir des cellules hôtes comme les bactéries pathogènes extracellulaires Gram positives telles que *Streptococcus pyogenes* [258] ou les bactéries pathogènes intracellulaires facultatives telles que *M. tuberculosis* [247, 259-261], *Salmonella* [262] et *Listeria monocytogenes* [228, 230,

263] peuvent être éliminées par la voie de l'autophagie. Par exemple, *Streptococcus pyogenes* détruit les vacuoles phagocytaires et entre dans le cytoplasme où il se multiplie, mais les cocci envahissants sont détruits par dégradation autophagique [258], ce qui suggère que l'autophagie joue un rôle central dans la prévention et la destruction des envahisseurs qui établissent des niches répliquatives dans le cytoplasme [238, 239].

Dans l'immunité innée, l'autophagie joue à la fois un rôle de régulateur [264] et d'effecteur de la réponse à la reconnaissance d'antigènes par les PRR tels que les PAMPs [228, 265-267] et probablement les DAMPs [247, 268].

Plusieurs médiateurs de l'immunité tels que l'IL-1 β , une cytokine proinflammatoire générée normalement via l'activation des inflammasomes par les PAMPs ou les DAMPs, peuvent stimuler l'autophagie, ce qui contribue ainsi à la sélection positive et négative du répertoire des cellules T et B [269-273].

La macroautophagie et la CMA sont impliquées dans la présentation des antigènes aux molécules du CMH [274, 275], la sélection dans le thymus et le contrôle de la tolérance centrale [269].

L'autophagie, outre le fait qu'elle affecte l'homéostasie des cellules T, B, et des granulocytes de l'épithélium intestinal [271, 276, 277] est un effecteur pour la polarisation des cellules T en Th1/Th2 [260, 278, 279], une fois induite par les cytokines Th1 tels que les TNF- α et IFN- γ . Elle empêche aussi les macrophages d'utiliser cette même voie dans le contrôle des pathogènes intracellulaires. En effet, les cytokines Th2 telles que l'IL-4 et l'IL-13 inhibent l'autophagie et empêchent l'élimination des pathogènes intracellulaires [280].

4.7.4. Adaptation des bactéries à l'autophagie

Les microorganismes envahisseurs, qui parasitent les cellules eucaryotes (par exemple, les agents pathogènes intracellulaires), ont évolué pour échapper à la pression sélective exercée par l'autophagie cellulaire en tant que voie métabolique au cœur de l'immunité innée et adaptative. Bien que l'autophagie intéresse plusieurs autres envahisseurs intracellulaires (virus, parasites), dans ce travail, nous nous limiterons aux mécanismes d'action impliquant les bactéries.

En effet, il n'est pas surprenant que les bactéries intracellulaires aient élaboré des stratégies pour éviter la dégradation autophagolysosomale et /ou pour étouffer l'activation de l'autophagie dépendante des réponses immunitaires de l'hôte. Les bactéries intracellulaires

peuvent soit échapper à l'autophagie sans créer une niche répliquative soit créer une niche à l'intérieur des phagosomes (**Fig. 23**). Nous nous limiterons aux bactéries appartenant aux premiers types.

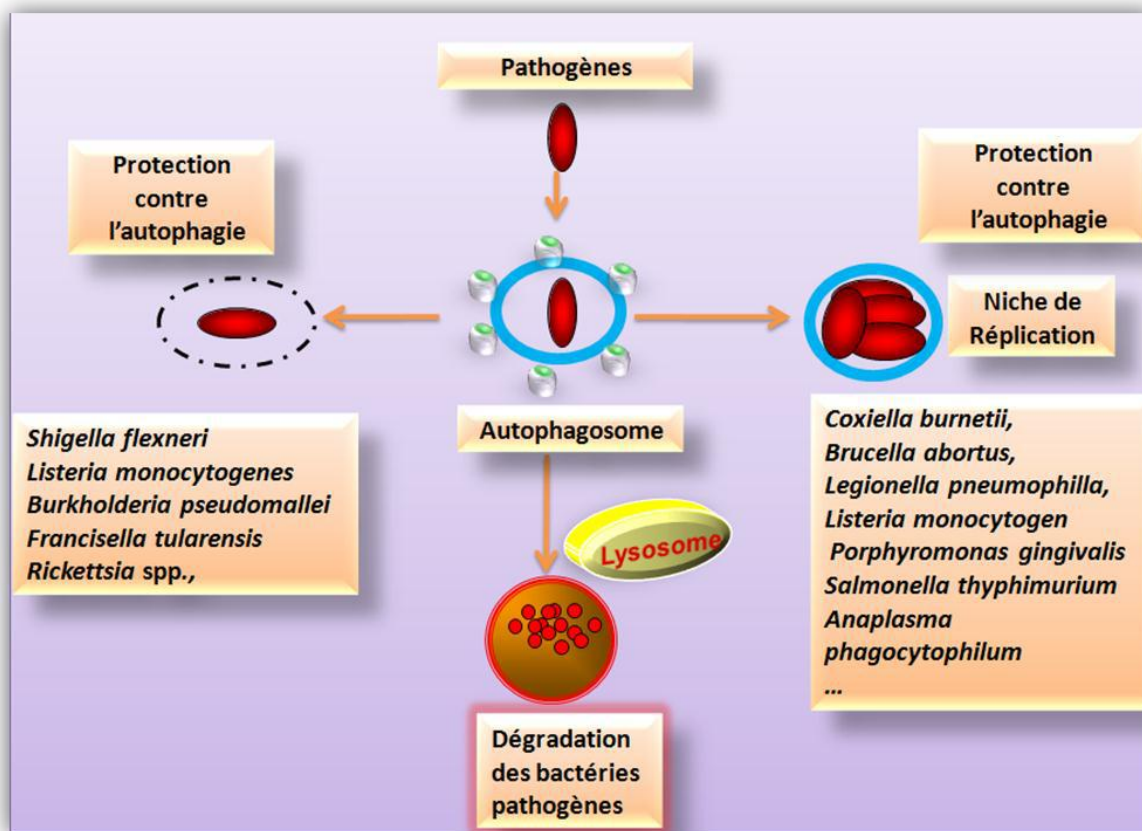


Fig. 23. Schéma représentatif du mode d'action de certaines bactéries intracellulaires pour échapper à la surveillance cellulaire.

4.7.4.1. Suppression de l'induction de l'autophagie

Exception faite des virus, peu d'études ont porté sur les mécanismes d'action utilisés par des agents pathogènes intracellulaires capables de supprimer directement la voie de l'autophagie [209].

Jusqu'à présent, il n'existe pas de données qui démontrent clairement le blocage de l'induction de l'autophagie par les bactéries, bien qu'une analyse en microarray sur les macrophages infectés par *Francisella tularensis* ait révélé une dérégulation de plusieurs gènes de l'autophagie [281]. Cela reste donc une question ouverte de savoir si les agents pathogènes bactériens suppriment ou non l'induction de l'autophagie.

4.7.4.2. Protection à l'égard de la capture autophagique

La protection contre la capture autophagique n'a été décrite, jusqu'ici, que chez trois bactéries : *S. flexneri*, *L. monocytogenes* et *B. pseudomallei*. Le premier exemple le plus classique décrit, est celui de *Shigella* qui semble utiliser une formule particulièrement sophistiquée pour échapper à l'enveloppement autophagique [178]. D'autres bactéries comme *Burkholderia pseudomallei* [282] et *L. monocytogenes* [230, 283] ont aussi des facteurs qui leur permettent de se protéger contre la voie autophagique (**Fig. 24**).

Dans ce travail, nous essayons de comprendre les mécanismes utilisés par *Shigella* pour la survie intracellulaire en caractérisant la protéine IcsB.

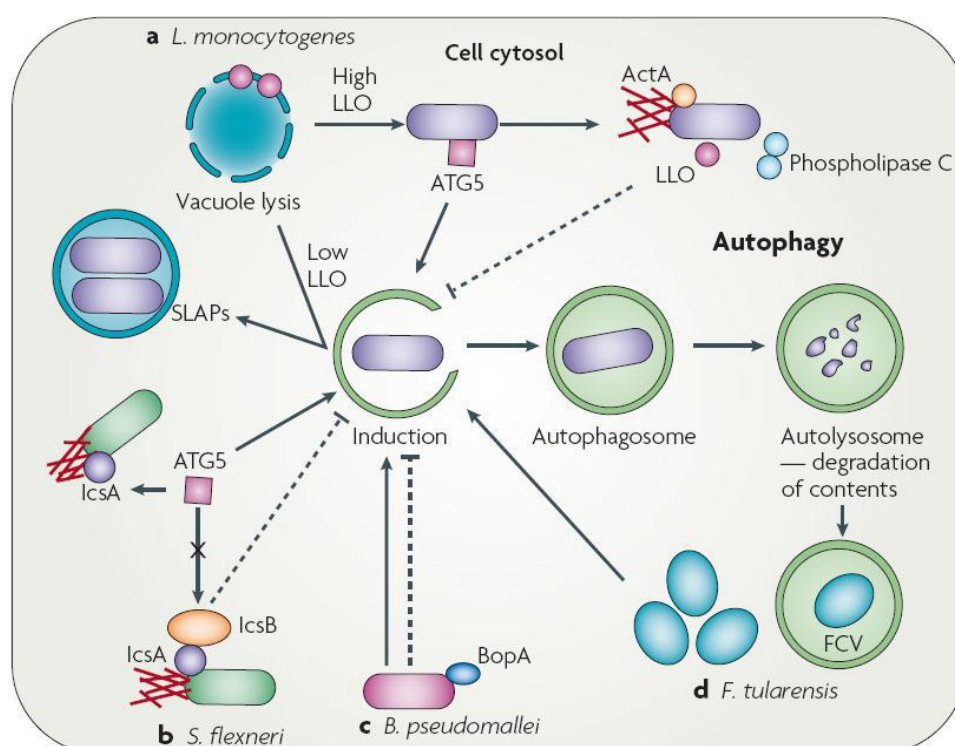


Fig. 24. Interaction entre les bactéries cytosoliques et la voie autophagique [30]. a) Après l'invasion des cellules, *Listeria monocytogenes* échappe à la vacuole en sécrétant la listériolysine O (LLO) qui lyse la membrane de la cellule eucaryote. La protéine ATG5 est nécessaire pour la reconnaissance cytosolique de *L. monocytogenes* et pour l'induction de la voie autophagique. *L. monocytogenes* est aussi capable de se protéger contre l'autophagie à l'aide de multiples protéines, notamment, Pfr (facteur de régulation), phospholipase de type C et ActA [230, 283]. *L. monocytogenes* est en mesure de bloquer la maturation du phagosome, entraînant la formation des SLAPs (Spacious *Listeria*-containing Phagosomes). b) *Shigella flexneri* induit l'autophagie suite à une reconnaissance de la protéine bactérienne IcsA par ATG5. Cependant, il bloque également la réponse autophagique en sécrétant IcsB, qui se lie à IcsA, et entre en compétition avec ATG5. c) *Burkholderia pseudomallei* induit l'autophagie, mais utilise BopA, homologue d'IcsB, pour bloquer l'autophagie. d) *Francisella tularensis* induit une autophagie après la réplication des bactéries dans le cytosol. Il rentre ensuite dans la voie d'endocytose et réside ensuite dans une FCV (*Francisella* contenant vacuole).

Objectifs

Objectifs

Shigella flexneri possède une arme biologique, à part entière, capable de reprogrammer le fonctionnement de la cellule hôte. Plusieurs composants concourent au bon fonctionnement du système de sécrétion de type III (SST3), constitué de 3 domaines : un bulbe cytoplasmique, un domaine membranaire et une aiguille. Bien que de nombreuses études aient pu éclaircir le rôle de certains acteurs de la machinerie du SST3, plusieurs interrogations subsistent quant à l'organisation de la structure du corps basal, à savoir : quels sont les acteurs qui constituent l'appareil d'exportation du SST3? Quel est l'ordre d'assemblage des composants? Quel est le signal qui permet le changement de spécificité des substrats du SST3? Qui est responsable de la sécrétion des constituants de l'aiguille? Par quel mécanisme la longueur de l'aiguille du sécréton est-elle régulée à 50 nm ?

Par ailleurs, si certains effecteurs délivrés par le SST3 ont des rôles bien connus, d'autres restent cependant de fonction inconnue. Un des effecteurs sécrété par la machinerie de sécrétion est la protéine IcsB qui permet à *Shigella* d'échapper à l'autophagie via une compétition avec Atg5 sur la liaison à VirG. Existe-t-il un seul mécanisme pour échapper à la surveillance cellulaire ? Quelle est la cible cellulaire d'IcsB ?

Ce projet de thèse a eu pour but de répondre à certaines de ces interrogations en caractérisant la fonction de plusieurs gènes portés par le plasmide de virulence. Pour atteindre cet objectif, trois types de gènes, localisés dans la région d'entrée, ont été étudiés:

- 1) Les gènes, *spa24*, *spa9*, *spa29* et *spa40* dont les produits sont hautement conservés parmi les homologues de la famille des protéines du SST3.
- 2) Le gène *spa32* codant une protéine impliquée dans la régulation la longueur de l'aiguille.
- 3) Enfin, le gène *icsB* impliqué dans la dissémination intra et intercellulaire et dans la protection de la bactérie contre l'autophagie.

Nos travaux ont fait l'objet de 3 publications internationales et d'une publication en cours de rédaction.

Résultats

Résultats

1. ASSEMBLAGE ET FONCTIONNEMENT DE L'APPAREIL D'EXPORTATION DU SST3

1.1. Etude de la protéine Spa40

L'étude de la fonction du gène *spa40* dans la virulence de *Shigella flexneri* a fait l'objet d'un article publié dans la revue *Microbiology* en tant que co-premier auteur (Botteaux A., **Kayath C.A.**, Sani M., Page A.L., L.Biskri, Parsot C., and A. Allaoui. **"The 33 carboxyl terminal residues of Spa40 orchestrate the multi-step assembly process of the type III secretion needle complex in *Shigella flexneri*"**. Publié (2010).

L'étude de la protéine Spa32 nous a permis de mettre en évidence une interaction avec le domaine cytoplasmique de Spa40 (Spa40_C, chapitre 1.2.). Par des études de double hybride dans la levure et de co-purification, nous avons montré que les résidus 309 à 342 de la protéine Spa40 suffisaient à l'interaction avec Spa32. Ces résidus font partie du domaine CC de Spa40 issu du clivage du domaine cytoplasmique en deux sous-domaines (CN et CC). Pour mieux comprendre le rôle de Spa40, nous avons inactivé son gène. La mutation du gène *spa40* abolit la sécrétion des protéines de virulence et l'invasion des cellules épithéliales. De plus, nous avons montré, par microscopie électronique, que le mutant *spa40* présente des sécrétions dépourvus d'aiguilles.

Dans le but de mieux caractériser le rôle du domaine CC de Spa40, nous avons mis en évidence, par des études de mutagenèse dirigée, l'importance de certains résidus, conservés entre homologues, non pas uniquement dans le changement de spécificité de substrat, mais aussi dans l'assemblage du SST3.

Nous avons ainsi identifié des composants du SST3 incluant MxiA_C, Spa33, Spa47, MxiN et MxiK comme partenaires d'interaction de Spa40. Nous avons montré que la délétion de ce motif NPTH abolit le clivage de Spa40 ainsi que sa fonction dans la sécrétion. Toutefois, il semble que ce clivage ne soit pas nécessaire à l'assemblage ni à l'interaction avec MxiA et MxiN mais bien à l'interaction avec Spa32, Spa33, Spa47 et MxiK.

L'ensemble de nos résultats suggère que Spa40_C joue un rôle de plateforme assurant les interactions nécessaires à la mise en place, et à la cinétique, de l'assemblage du SST3 ainsi qu'au changement de spécificité de substrats.

The 33 carboxyl-terminal residues of Spa40 orchestrate the multi-step assembly process of the type III secretion needle complex in *Shigella flexneri*

Anne Botteaux,^{1†} Christian A. Kayath,^{1†} Anne-Laure Page,^{2,3}
Nouredine Jouihri,¹ Musa Sani,^{4‡} Egbert Boekema,⁴ Latéfa Biskri,¹
Claude Parsot^{2,3} and Abdelmounaaim Allaoui¹

Correspondence

Abdelmounaaim Allaoui
aallaoui@ulb.ac.be

¹Laboratoire de Bactériologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, Route de Lennik, 808, 1070 Bruxelles, Belgium

²Laboratoire de Pathogénie Microbienne, Institut Pasteur, 27–28 Rue du Dr Roux, 75725 Paris Cedex 15, France

³INSERM U786, 25 rue du Dr Roux, F-75724 Paris Cedex 15, France

⁴Biophysical Chemistry, Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute, University of Groningen, The Netherlands

The type III secretion apparatus (T3SA) is a central virulence factor of many Gram-negative bacteria. Its overall morphology consists of a cytoplasmic region, inner- and outer-membrane sections and an extracellular needle. In *Shigella*, the length of the needle is regulated by Spa32. To understand better the role of Spa32 we searched for its interacting partners using a two-hybrid screen in yeast. We found that Spa32 interacts with the 33 C-terminal residues (CC*) of Spa40, a member of the conserved FlhB/YscU family. Using a GST pull-down assay we confirmed this interaction and identified additional interactions between Spa40 and the type III secretion components Spa33, Spa47, MxiK, MxiN and MxiA. Inactivation of *spa40* abolished protein secretion and led to needleless structures. Genetic and functional analyses were used to investigate the roles of residues L310 and V320, located within the CC* domain of Spa40, in the assembly of the T3SA. Spa40 cleavage, at the conserved NPTH motif, is required for assembly of the T3SA and for its interaction with Spa32, Spa33 and Spa47. In contrast, unprocessed forms of Spa40 interacted only with MxiA, MxiK and MxiN. Our data suggest that the conformation of the cytoplasmic domain of Spa40 defines the multi-step assembly process of the T3SA.

Received 9 March 2010

Revised 21 May 2010

Accepted 24 May 2010

INTRODUCTION

Shigella flexneri, the causative agent of bacillary dysentery in humans, is able to enter and to disseminate in epithelial cells by using a specialized Mxi-Spa type III secretion apparatus (T3SA) (Parsot, 2009). The T3SA is widespread among Gram-negative bacteria that are pathogenic for animals and plants or are symbionts (Viprey *et al.*, 1998; Dale *et al.*, 2001, 2002) and is devoted to the injection of

virulence effectors into target cells. The T3SA is composed of a cytoplasmic region called ‘the bulb’, a basal body consisting of a pair of rings that span the inner and outer membranes, and an extracellular needle protruding outside the bacterium. This apparatus is evolutionarily and structurally related to the export machinery of flagellar systems (Macnab, 1999; Blocker *et al.*, 2001). Nine T3SA constituents are related to components of the basal bodies of bacterial flagella (Allaoui *et al.*, 1994; Aizawa, 2001; Blocker *et al.*, 2003; Macnab, 2004), including the inner-membrane proteins MxiA (FlhA), Spa9 (FliP), Spa24 (FliR), Spa29 (FliQ) and Spa40 (FlhB), and the cytoplasmic proteins Spa47 (FliI), MxiN (FliH) and Spa33 (FliN) (Kane *et al.*, 2002; Allaoui *et al.*, 1992b, 1993b, 1995; Penno *et al.*, 2006; Jouihri *et al.*, 2003; Andrews & Maurelli, 1992; Sasakawa *et al.*, 1993; Schuch & Maurelli, 2001; Morita-Ishihara *et al.*, 2005). Additionally, two cytoplasmic proteins, Spa13 and MxiK, which have no obvious counterpart in the flagellar system, are also implicated in

†These authors contributed equally to this work.

‡Present address: Division of Tumour Biology, The Netherlands Cancer Institute–Antoni van Leeuwenhoek Hospital, Plesmanlaan 121, 1066 CX Amsterdam, The Netherlands.

Abbreviations: EPEC, enteropathogenic *Escherichia coli*; GST, glutathione S-transferase; NC, needle complex; T3S, type III secretion; T3SA, type III secretion apparatus; T3SS, type III secretion system; TEM, transmission electron microscopy.

A supplementary table, showing primers used in this study, is available with the online version of this paper.

the assembly of the type III secretion system (T3SS) (Jouihri *et al.*, 2003; Penno *et al.*, 2006).

Among the battery of T3SA substrates, three classes can be defined based on their order of transit through the T3SA: first, the needle subunits of the T3SA, MxiH and MxiI; then the translocators IpaB, IpaC and IpaD; and finally effectors such as IpgB1, IpgB2, IpgD and IpaA. The first switch in secretion from needle subunits to translocators is regulated by the Spa32 protein. Indeed, mutations in *spa32* (Magdalena *et al.*, 2002; Botteaux *et al.*, 2008), as well as in *invJ* from *Salmonella* (SP-1) (Kubori *et al.*, 2000) and *yscP* from *Yersinia* (Journet *et al.*, 2003), lead to abnormally long needles, suggesting that the system is locked in the export of needle subunits. Likewise, *Salmonella* mutants deficient in *fliK*, the *spa32* counterpart in the flagellar system, make polyhooks and no filament. Interestingly, extragenic suppressive mutations that restore filament assembly on polyhook structures (polyhook-filament phenotype) have been mapped in *flhB*, a gene encoding a major component of the export apparatus (Kutsukake *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1996; Fraser *et al.*, 2003). FlhB exists in two processed and unprocessed forms (Minamino & Macnab, 2000). There is a highly sensitive cleavage site between amino acids Asn²⁶⁹ and Pro²⁷⁰ in the cytoplasmic domain of FlhB which is cleaved via an autocatalytic process involving its own tertiary structure (Ferris *et al.*, 2005). These residues lie on a conserved amino acid sequence NPTH in YscU of *Yersinia* and in Spa40 of *Shigella*. The uncleaved form of FlhB permits hook assembly but not flagellin secretion (Fraser *et al.*, 2003). The deletion of the entire NPTH motif of YscU leads to an uncleaved form of the protein and abolishes secretion of the needle subunit (YscF) (Björnfor *et al.*, 2009).

As for YscU and FlhB, Spa40 is also predicted to contain four transmembrane domains followed by a large cytoplasmic one (Allaoui *et al.*, 1994). Deane *et al.* (2008) reported that the C-terminal domain of Spa40 (Spa40_{CT}) is also cleaved within NPTH into two subdomains, Spa40_{CN} and Spa40_{CC}, which remain tightly associated after cleavage. The crystal structures of the cytoplasmic domains of Spa40 (Deane *et al.*, 2008), EcsU from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), SpaS from *Salmonella* (Zarivach *et al.*, 2008) and YscU from *Yersinia* (Wiesand *et al.*, 2009) reveal a tight association of the cleaved fragments and show that the NPTH sequence lies on a loop which, when cleaved, swings away from the catalytic N257 residue, resulting in different surface features in this region. This structural rearrangement suggests a mechanism by which non-cleaved forms of these proteins interfere with the substrate specificity switching of the apparatus (Deane *et al.*, 2008).

While the role of Spa40 in Ipa protein secretion has been genetically proven (Sasakawa *et al.*, 1993), its involvement in the secretion process remains poorly understood. In this study we investigated the molecular role of Spa40 in the assembly/function of the T3SA. What has emerged is a

picture of Spa40 as a central element of the export machinery with a critical role in T3SA assembly prior to the specificity switch.

METHODS

Media and growth conditions. *S. flexneri* strains were derivatives of the wild-type strain M90T (serotype 5) (Sansonetti *et al.*, 1982; Allaoui *et al.*, 1992a). *E. coli* Top10 strains were transformed with pSU18, pQE30 or pGEX4T1 derivatives; strain DH5 α (λ pir) was transformed with derivatives of the suicide vector pGP704, and SM10- λ pir was used to transfer derivatives of pGP704 to *S. flexneri*. Bacteria were grown in tryptic casein soy broth at 37 °C. Antibiotics were used at the following concentrations: ampicillin, 100 μ g ml⁻¹; kanamycin, 50 μ g ml⁻¹; streptomycin, 100 μ g ml⁻¹; and chloramphenicol, 25 μ g ml⁻¹.

Construction of the *spa40* null strain For the construction of a non-polar mutant of *spa40*, the *aphA-3* cassette specifically designed for the purpose was used (Menard *et al.*, 1993). A non-polar mutant of *spa40* was constructed by replacing the 706 bp *SfiI*-*AccI* fragment internal to *spa40* with the *SmaI*-digested *aphA-3* cassette that confers resistance to kanamycin. In pNJ67, the suicide mutator vector, the *spa40* gene was interrupted between codons 62 and 298. The structure of pWR100 derivatives carrying the *spa40* mutation was confirmed by PCR using primers Spa40-1 and Spa40-2, and the resulting strains were designated SM144 or *spa40*.

Construction of targeted mutations in the cytoplasmic domain of Spa40. Plasmid pNL3 was constructed by inserting the 1050 bp *EcoRI*/*HindIII*-digested DNA fragment carrying the *spa40* gene into the corresponding sites of the low-expression vector pSU18 (Invitrogen). Substitutions of Spa40 residues at positions G224, A286, L310 and V320 were made on plasmid pNL3 (Spa40) or pAB51 (GST-Spa40_{CT}) (Botteaux *et al.*, 2009), according to the procedure of the QuickChange Mutagenesis kit (Stratagene). Each primer used created a restriction site to easily confirm the introduced mutation (see Supplementary Table S1). Deletion of Spa40 residues NPTH at positions 258–261 was done by amplifying the first 771 bp of the *spa40* gene using primers Spa40-3 and Spa40-13, and the last 243 bp of the *spa40* gene with primers Spa40-14 and Spa40-4. Then, the two PCR fragments were assembled by PCR using primers Spa40-3 and Spa40-4 and cloned into *EcoRI*/*HindIII*-digested pSU18. The resulting plasmid encoding Spa40^{ANPTH} was named pAB94. The same deletion was made on pGEX-Spa40_{CT}, and the resulting plasmid encoding GST-Spa40_{CT}^{ANPTH} was named pAB98.

Construction of plasmids. Plasmid pAB63, expressing GST-Spa40_{CN} (residues 205–258), was constructed by inserting a 159 bp *BamHI*-*EcoRI* fragment obtained by PCR using primers Spa40-15/Spa40-17 into the corresponding sites of pGEX4T1. Plasmid pAB70, expressing GST-Spa40_{CC} (residues 259–342), was obtained by inserting a 416 bp *BamHI*-*SmaI* PCR DNA fragment obtained using Spa40-18/Spa40-19 primers into the corresponding sites of pGEX4T1. Plasmid pAB71, expressing GST-Spa40_{CC}* [glutathione S-transferase (GST) fused in-frame to residues 309–342 of Spa40] was constructed by inserting a 266 bp *BamHI*-*SmaI* PCR DNA fragment amplified using primers Spa40-20/Spa40-19 into the corresponding sites of pGEX4T1. Plasmid pBAL27 was constructed by inserting a 480 bp *PstI*-*KpnI* PCR fragment of the *mxiA* gene (using primers MxiA2/MxiA6), encoding the last 160 residues of MxiA, into the corresponding sites of pBADHisA. Plasmid pBAL26 was constructed by inserting a *BamHI*-*XhoI* PCR fragment of the *spa33* gene (using primers Spa33.1/Spa33As) into the corresponding sites of pBADHisA.

Production of recombinant proteins and GST pull-down assay.

E. coli strain BL21, harbouring pGEX4T1 or its derivatives (see Table 1) and expressing GST-Spa40_{CT} or its derivatives, was cultured in L-broth with 100 µg ampicillin ml⁻¹ for 2 h at 37 °C, then IPTG was added to a final concentration of 0.1 mM. After incubation for 3 h at 30 °C, bacteria were harvested and GST fusion proteins were purified as described by the manufacturer of Glutathione Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech). Briefly, GST-recombinant proteins bound to Glutathione Sepharose 4B (50 µl) were mixed with cleared extract of *E. coli* strains expressing His-tagged Spa or Mxi proteins and incubated overnight at 4 °C. Supernatants were removed by centrifugation and beads were washed four times with bead-binding buffer (1 % Triton X-100 in Tris-buffered saline, pH 7.4). After the final wash, elution was performed with 40 µl glutathione, and 10 µl SDS-PAGE sample buffer was added to each sample. Bound proteins were analysed by immunoblotting using anti-His (Sigma) or anti-GST antibodies (GE Healthcare).

Protein analysis. Crude extracts and culture supernatants of *S. flexneri* strains were prepared as described by Allaoui *et al.* (1993a) and Botteaux *et al.* (2009), and analysed by SDS-PAGE and Western blotting using anti-IpaB (Barzu *et al.*, 1993) and anti-IpaC monoclonal antibodies (Phalipon *et al.*, 1992) and anti-IpaD (Menard *et al.*, 1993), anti-MxiI and anti-Spa32 (Magdalena *et al.*, 2002), and anti-IpaA polyclonal antibodies (Tran Van Nhieu *et al.*, 1997).

Purification of needle complex (NC), electron microscopy and image analysis. NCs were purified as described by Sani *et al.* (2007) and were negatively stained with 2 % uranyl acetate on glow-discharged carbon-coated copper grids. Electron microscopy was

performed with a Philips CM120FEG electron microscope equipped with a field emission gun operated at 120 kV. Images were recorded with a Gatan 4000 SP 4K slow-scan charge-coupled device (CCD) camera at ×80 000 magnification at a pixel size (after binning the images) of 3.75 Å at the specimen level, with GRACE software for semi-automated specimen selection and data acquisition (Pilgram *et al.*, 1998). Single-particle analysis, including multi-reference and non-reference procedures, multivariate statistical analysis and classification, was performed as described by Sani *et al.* (2007).

RESULTS**Spa32 interacts with a domain that encompasses residues 309–342 of Spa40**

To identify interaction partners of Spa32, we used the two-hybrid technique in yeast to screen libraries of prey plasmids containing DNA fragments from a 65 kb region of the virulence plasmid encompassing the *mxi* and *spa* genes (Page *et al.*, 2001). The bait plasmid was constructed by fusing the *spa32* gene in-frame with the coding sequence of the Gal4 DNA-binding domain. For each screen, approximately 10⁶ diploids carrying the *his3* gene under the control of a Gal4-regulated promoter were spread on plates lacking His, and the insert carried by the prey plasmid present in each of the 19 clones that were selected as His⁺ was sequenced. Three Spa40 proteins encoded by prey plasmids

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant features and/or method of construction	Source or reference
Strains		
M90T-Sm	<i>S. flexneri</i> wild-type parental strain (M90T)	Allaoui <i>et al.</i> (1992b)
SM144	<i>spa40</i> mutant	This study
Plasmids		
pSU18	Expression vector	Martinez <i>et al.</i> (1988)
pUC18K	pUC derivative carrying the <i>aphA-3</i> cassette	Menard <i>et al.</i> (1993)
pJN67	pGP704 suicide vector carrying the inactivated <i>spa40</i> gene	This study
pNL3	pSU18 expressing Spa40	This study
pAB95	pNL3-Spa40 _{G224F}	This study
pAB89	pNL3-Spa40 _{A286V}	This study
pAB87	pNL3-Spa40 _{L310A}	This study
pAB88	pNL3-Spa40 _{V320K}	This study
pAB94	pNL3-Spa40 _{ΔNP_{TH}}	This study
pAB51	pGEX4T1 expressing GST fused to residues 205–342 of Spa40: GST-Spa40 _{CT}	Botteaux <i>et al.</i> (2008)
pAB63	pGEX4T1 expressing GST fused to residues 205–258 of Spa40: GST-Spa40 _{CN}	This study
pAB70	pGEX4T1 expressing GST fused to residues 259–342 of Spa40: GST-Spa40 _{CC}	This study
pAB71	pGEX4T1 expressing GST fused to residues 309–342 of Spa40: GST-Spa40 _{CC} *	This study
pAB59	pGEX4T1 expressing GST-Spa40 _{CT} ^{V320K}	This study
pAB98	pGEX4T1 expressing GST-Spa40 _{CT} ^{ΔNP_{TH}}	This study
pAB74	pGEX4T1 expressing GST-Spa40 _{CT} ^{L310A}	This study
pBAL27	pBADHisA expressing His-MxiA _C (MxiA residues 506–666 fused to 6His)	This study
pMS019	pBADHisB expressing His-Spa47	Botteaux <i>et al.</i> (2008)
pJN51	pQE30 expressing His-MxiN	Jouihri <i>et al.</i> (2003)
pMJ8	pQE30 expressing His-Spa32	Magdalena <i>et al.</i> (2002)
pJN79	pQE30 expressing His-MxiK	Jouihri <i>et al.</i> (2003)
pBAL26	pBADHisA expressing His-Spa33	This study

started at residue L279, two at residue E281, one at residue N283, four at residue R290, two at residue E295, one at residue V304 and six at residue K309. The region common to all preys corresponded to residues 309–342 (LYKTHTKY-SFVDFEHLDEVLRLLIVWLEQVENTH) of Spa40.

In a previous work, we demonstrated that residues 206–246 of Spa32 interact with GST-Spa40_{CT} (GST fused to the C-terminal 137 residues of Spa40), corresponding to the whole predicted cytoplasmic domain (Fig. 1a; Botteaux *et al.*, 2008). To test whether residues 309–342 of Spa40 are sufficient for Spa32 binding we constructed plasmids pAB70 (encoding GST-Spa40_{CC}, i.e. GST fused to Spa40 residues 259–342), pAB71 (encoding GST-Spa40_{CC*}, i.e. GST fused to Spa40 residues 309–342) and pAB63 (ending

GST-Spa40_{CN}, i.e. GST fused to Spa40 residues 205–258) and performed a GST pull-down assay. A soluble extract of an *E. coli* strain producing His-Spa32 was incubated with GST-Spa40 derivatives or GST alone, and bound to Glutathione Sepharose beads, and proteins retained on the beads were eluted with glutathione. As reported by Deane *et al.* (2008), GST-Spa40_{CT} undergoes a cleavage that results in the appearance of two forms of Spa40 that are detected in the eluted fractions with anti-GST antibodies (corresponding to GST-Spa40_{CT} and GST-Spa40_{CN}) (Fig. 1c). SDS-PAGE analysis of eluted proteins indicated that His-Spa32 interacts with GST-Spa40_{CC} and GST-Spa40_{CC*}, but not with GST-Spa40_{CN} or GST (Fig. 1c). These results confirmed that the last 33 residues of Spa40 are indeed sufficient for Spa32 binding.

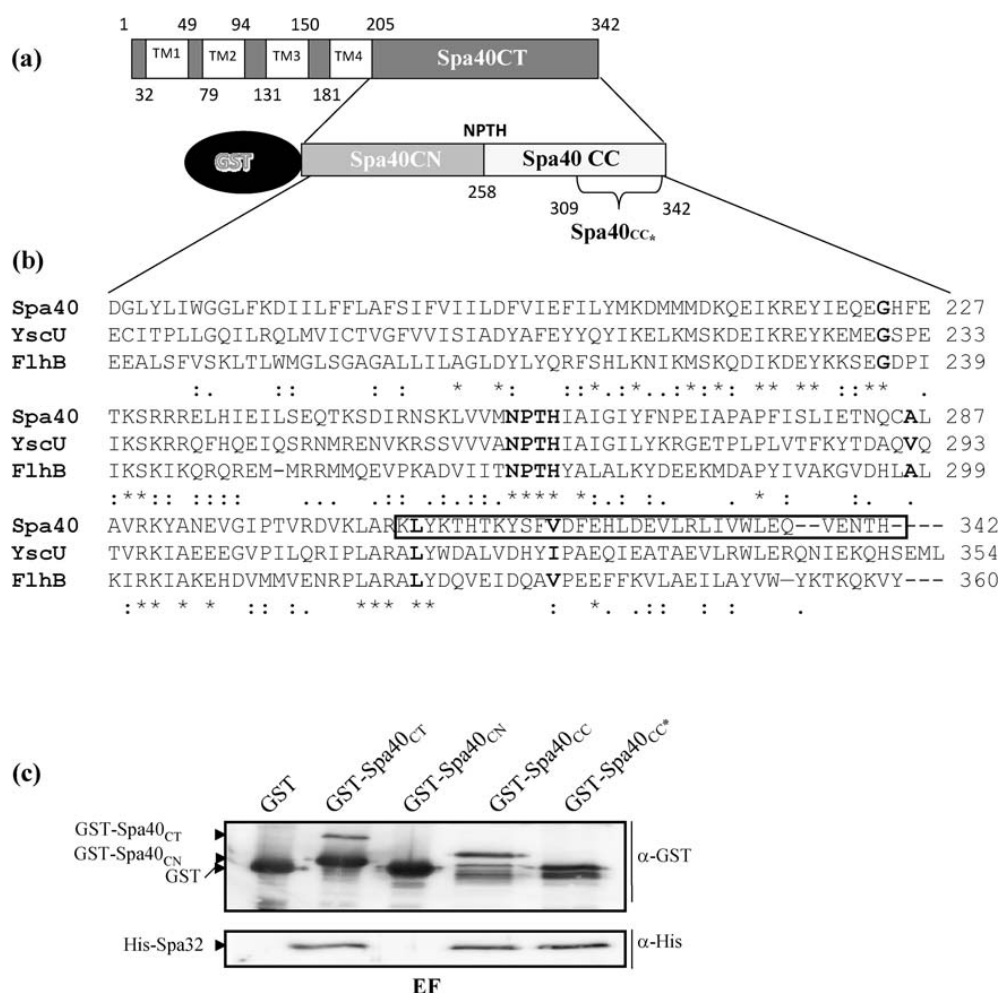


Fig. 1. Residues 309–342 of Spa40 are sufficient for Spa32 binding. (a) Schematic topology of the entire Spa40 protein. The four transmembrane (TM) domains have previously been reported for YscU (Allaoui *et al.*, 1994). Linear presentation of GST-Spa40 constructs used in the GST pull-down assay. (b) Sequence alignment (using CLUSTAL W) of Spa40_{CT} with YscU of *Y. enterocolitica* and FlhB of *Bacillus subtilis*. Residues in bold type were mutated in this work. The box represents the Spa40 domain identified as interacting with Spa32. (c) Eluted fractions (EF) from GST and GST-Spa40_{CT} variants, after incubation with the cleared extract of *E. coli* producing His-Spa32, were analysed by SDS-PAGE and immunoblotting using anti-GST or anti-His antibodies.

The *spa40* mutant is defective in secretion and exhibits a needleless structure

To investigate further the role of Spa40, we inactivated the *spa40* gene in the *S. flexneri* wild-type strain M90T (see Methods). To assess of the ability of the *spa40* mutant to secrete Ipa proteins, whole-cell extracts and proteins secreted by the wild-type and *spa40* mutant were analysed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining (Fig. 2a) or by immunoblotting with antibodies against the needle component MxiI or Spa32, translocators (IpaB, IpaC and IpaD) and an effector (IpaA) (Fig. 2b). Similar amounts of these proteins were present in whole-cell extracts of the two strains (Fig. 2b), and they were all secreted by the wild-type strain but not by the *spa40* mutant. Secretion was restored upon complementation of the *spa40* mutant with pNL3, a low-copy plasmid expressing native Spa40 (Fig. 2a, b).

To characterize the T3SA structure of the *spa40* mutant, extensively purified NCs were analysed by transmission electron microscopy (TEM). The *spa40* mutant produced T3SAs lacking the needle portion (Fig. 2c). In parallel, we also purified NCs and analysed the T3SAs of *mxiA* and *spa47* mutants that also lack the needle structure (Fig. 2c). Average analysis of 2D projections of purified basal body particles revealed that the *spa40* mutant exhibited a structure slightly different from that of the *mxiA* and *spa47* mutants. Indeed, a dense region observed at the

lower end of the bulge in *mxiA* and *spa47* mutants was missing from the corresponding structure of the *spa40* mutant (Fig. 2c, d), which may reflect the position of Spa40 within the NCs.

Mutational and functional analysis of the C-terminal domain of Spa40 (Spa40_{CT})

Sequence alignment of members of the Spa40 family, including FlhB of *Salmonella typhimurium* and YscU of *Yersinia enterocolitica*, pointed to a number of conserved residues (Fig. 1b). As some of these residues are known to be mutagenic suppressors in other systems (Williams *et al.*, 1996; Edqvist *et al.*, 2003; Kutsukake *et al.*, 1994), we mutated the corresponding codons on plasmid pNL3 to construct Spa40 variants G224F in the CN domain and A286V, L310A and V320K in the CC domain. The last two residues were chosen for their location within the Spa40-interacting domain and for their conservation among Spa40/YscU family proteins (Fig. 1b). Plasmids expressing Spa40 variants were introduced into the *spa40* mutant and tested for their ability to restore secretion. Mutations G224F and A286V did not affect Spa40 function, but mutations V320K and L310A abolished secretion of all tested T3SA substrates (Fig. 3a). The fact that the needle component MxiI was not detectable in the supernatant (Fig. 3a) suggested that the V320K and L310A mutations

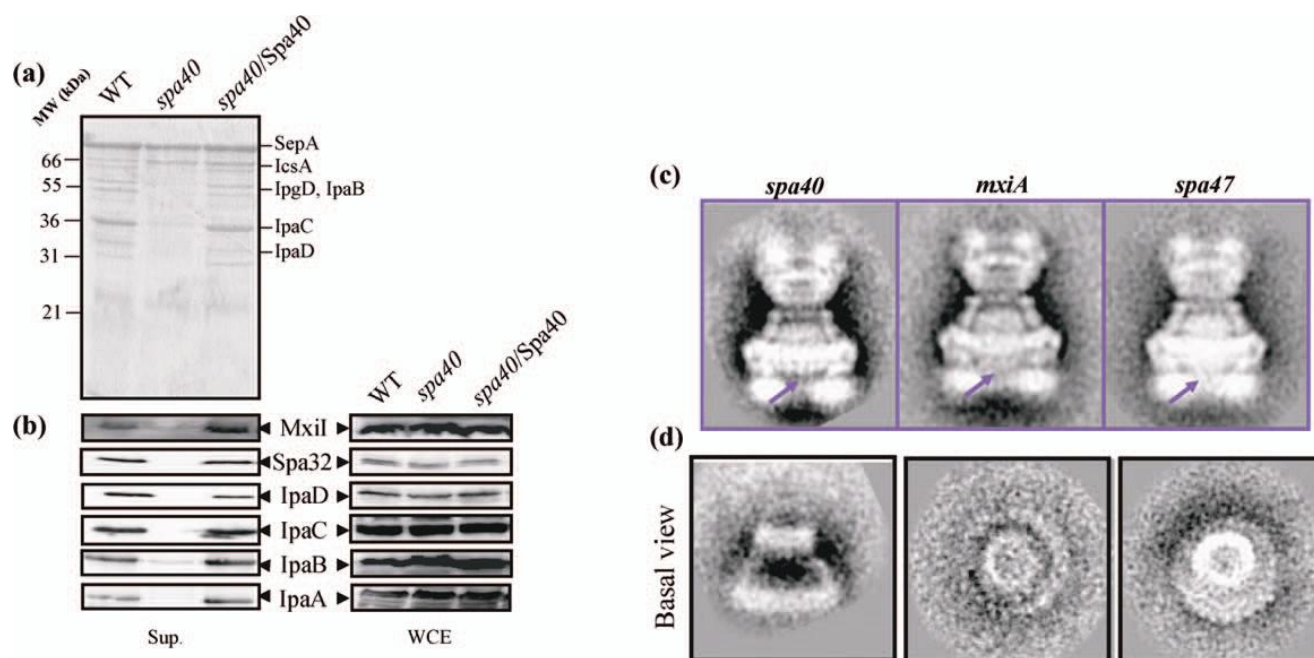


Fig. 2. The *spa40* mutant is deficient in secretion and exhibits a needleless substructure. Culture supernatant (Sup.) and whole-cell extracts (WCE) of M90T (wild-type), *spa40* and *spa40/pNL3* (expressing Spa40) were analysed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining (a) or by immunoblotting with antibodies against MxiI, Spa32, IpaB, IpaC, IpaD or IpaA (b). (c) Electron microscopy 2D average projections of purified NC particles isolated from *spa40*, *mxiA* and *spa47* mutants. The arrow points to the position of a dense region seen in the *mxiA* and *spa47* mutants but missing in the *spa40* mutant. (d) Basal view showing the basal body structure of the *spa40* mutant lacking the upper outer rings and the lower supporting dense region.

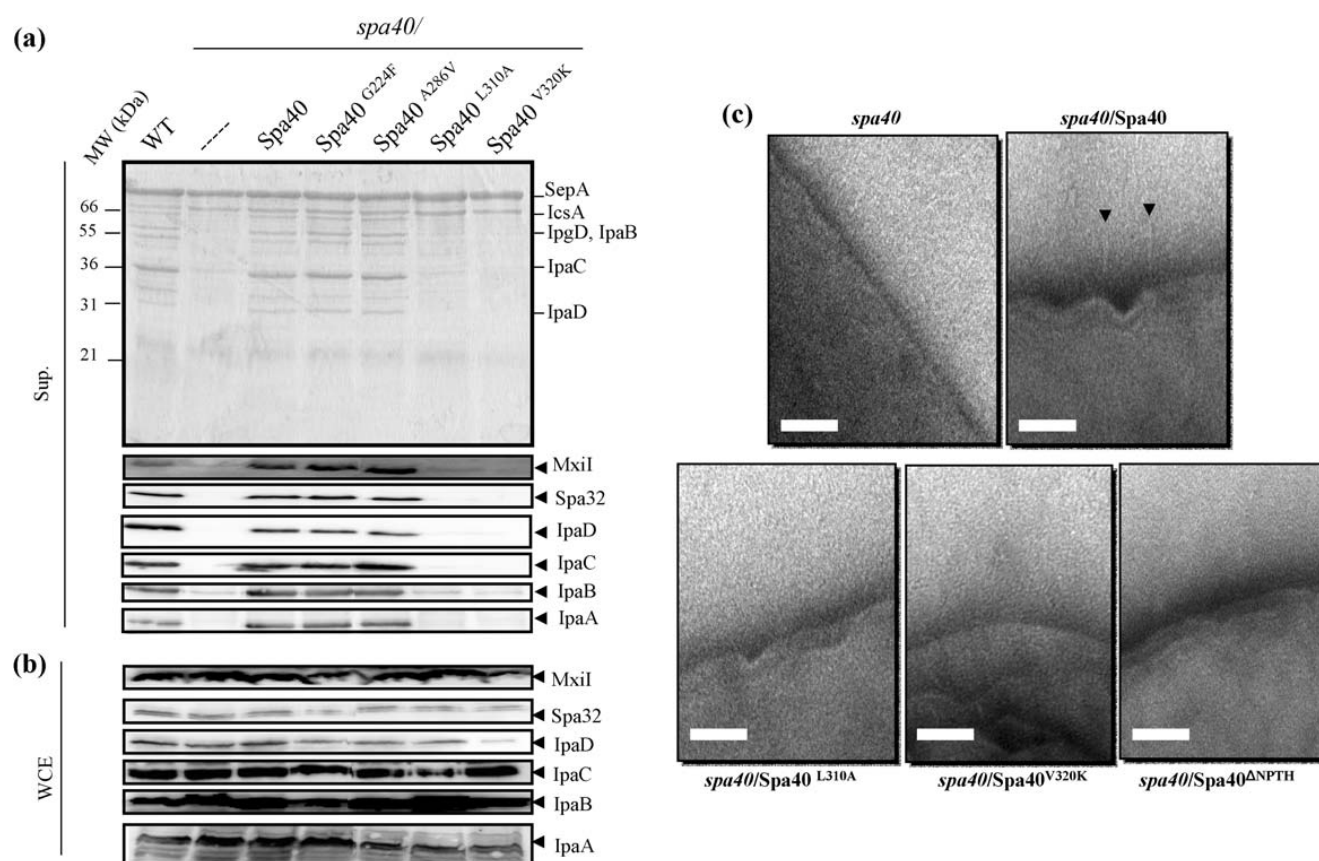


Fig. 3. Residues L310 and V320 are required for protein secretion. (a, b) Whole cell extracts (WCE) and proteins of the culture supernatant (Sup.) of M90T (wild-type; WT), *spa40* and *spa40* harbouring plasmid pNL3 (expressing Spa40) or its derivatives encoding Spa40^{G224F}, Spa40^{A286V}, Spa40^{L310A} or Spa40^{V320K} were analysed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining or by immunoblotting with antibodies directed against MxiI, Spa32, IpaD, IpaC, IpaB or IpaA. (c) Electron micrographs of negatively stained bacteria: *spa40*, *spa40* complemented with native Spa40, Spa40^{L310A}, Spa40^{V320K} or Spa40^{ΔNPTH}. Visualization by electron microscopy of NCs associated with bacteria. Arrowheads indicate the positions of needle substructures protruding from the bacterial surface. Bars, 100 nm.

affect the assembly of the T3SA. To test this hypothesis, we investigated the presence of the needle structure in these strains by electron microscopy and found that bacteria expressing the L310A or V320K variant lacked the needle part (Fig. 3c).

Spa40 interacts via its C-terminal domain with MxiA_C, MxiN, MxiK, Spa47 and Spa33

Since the L310A and V320K mutations affected the export of MxiI, we reasoned that Spa40_{CT} may interact with other T3SA components. To test this hypothesis, we performed GST pull-down assays with other Mxi and Spa components, including MxiA, MxiN, Spa47, MxiK and Spa33, whose corresponding mutated strains exhibit a needleless phenotype (Jouihri *et al.*, 2003; this study; our unpublished data). MxiK, MxiN, Spa47 and Spa33 are soluble proteins, while the overall secondary structure of MxiA indicates the

presence of seven hydrophobic domains followed by a large cytoplasmic C-terminal domain (MxiA_C). To test for interactions between Spa40 and these proteins, we performed a GST pull-down assay as described above. Analysis of the eluted fraction with glutathione indicated that Spa40_{CT} interacted with all tested proteins (Fig. 4), but not with His-DNMT3 α , which encodes a His-DNA-methyltransferase-3- α used as a control. All interactions were detected in *E. coli*, indicating that Spa40 binding to its partners does not require intermediate T3SA components. To investigate further the binding domain(s) of Spa40, we performed a similar GST pull-down assay with GST-Spa40_{CN}, GST-Spa40_{CC} and GST-Spa40_{CC*}. The CC* domain, which is sufficient for Spa32 binding, was found to interact with MxiA_C, MxiN and Spa33. Spa47 bound to the CN domain, but not to the CC one (Fig. 4). Lastly, MxiK, the ATPase cofactor, bound weakly to Spa40_{CN}, and not at all to Spa40_{CC} and Spa40_{CC*}.

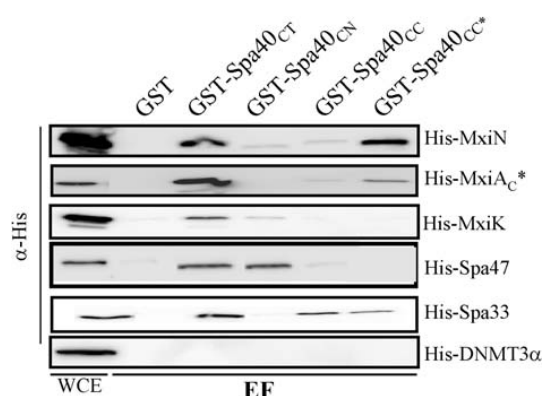


Fig. 4. Spa40 interacts with several T3SS components. SDS-PAGE and immunoblotting analysis of eluted fractions (EF) from GST-Spa40_{CT}, GST-Spa40_{CN}, GST-Spa40_{CC}, GST-Spa40_{CC}* and GST alone after incubation with cleared extract (CE) of *E. coli* strains producing His-MxiA_C*, His-MxiN, His-MxiK, His-Spa47 or His-Spa33. His-DNMT3α, negative control.

Mutation of residues L310A and V320K affects Spa40 interaction with Spa32, MxiA and MxiN

As the same domain of Spa40 is critical for Spa32, MxiA, MxiN and Spa33 binding, we constructed two derivatives of GST-Spa40_{CT} mutated at residues V320 and L310. Analysis of eluted fractions of GST-Spa40_{CT}^{L310A} and GST-Spa40_{CT}^{V320K} revealed that these two mutations affect the correct cleavage of Spa40_{CT} (Fig. 5a, b). We next used these two variants in a GST pull-down assay. GST-Spa40_{CT}^{L310A} and GST-Spa40_{CT}^{V320K} were not able to interact with His-Spa32. GST-Spa40_{CT}^{L310A}, the production of which was remarkably reduced compared with GST-Spa40_{CT}, did not interact with MxiN or MxiK, while the interaction of GST-Spa40_{CT}^{V320K} with MxiA_C* was drastically reduced (Fig. 5c). In contrast, GST-Spa40_{CT}^{L310A} and GST-Spa40_{CT}^{V320K}, like native GST-Spa40_{CT}, were still able to interact with both Spa33 and Spa47 (Fig. 5c). The L310A and V320K mutations may introduce a misfolding by altering the side chains of residues that pack in the hydrophobic core of Spa40. However, as certain interactions are still maintained with these mutants, misfolding is unlikely to explain the absence of interaction with some type III secretion (T3S) components.

Deletion of the NPTH motif abolishes Spa40 processing and affects assembly of the T3SA

To understand better the role of the cleavage per se, we constructed an in-frame deletion of the region encoding the NPTH motif on GST-Spa40_{CT}. As expected, the GST-Spa40_{CT}^{ΔNPTH} protein was not cleaved (Fig. 6a). Next, we tested the effect of this mutation on protein secretion by complementing the *spa40* mutant with pAB94, a plasmid encoding Spa40^{ΔNPTH}. The latter did not restore the secretion defect of the *spa40* mutant (Fig. 6b). MxiI, the

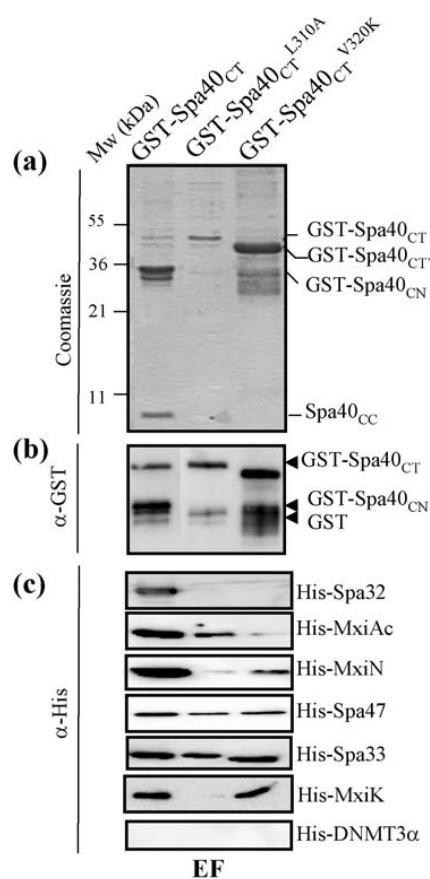


Fig. 5. Residues L310 and V320 are required for Spa40 binding to Spa32, MxiA, MxiN and MxiK. Fractions eluted (EF) upon purification of GST-Spa40_{CT}, GST-Spa40_{CT}^{L310A} or GST-Spa40_{CT}^{V320K} were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining (a) or immunoblotting with antibodies against GST (b) or His-tag (c) after incubation of these beads with the cleared extract (CE) of *E. coli* producing His-Spa32, His-MxiA_C*, His-MxiN, His-MxiK, His-Spa47 and His-Spa33. His-DNMT3, negative control.

minor needle component, accumulated in the lysate of the *spa40*/Spa40^{ΔNPTH} strain compared with the wild-type and *spa40*/pNL3 strains (Fig. 6b). TEM analysis confirmed the absence of the needle assembly in *spa40*/Spa40^{ΔNPTH} (Fig. 3c), indicating that Spa40 cleavage is important for NC assembly.

Spa40^{ΔNPTH} interacts with MxiA, MxiK and MxiN, but not with Spa32, Spa33 or Spa47

To test whether the cleavage of Spa40 interferes with its ability to associate with identified interacting partners, we performed a GST pull-down assay. GST-Spa40_{CT}^{ΔNPTH} was no longer able to interact with His-Spa32, His-Spa33 or His-Spa47 (Fig. 6c). In contrast, the unprocessed form was still able to interact with MxiA_C, MxiK and MxiN (Fig. 6c). The NPTH deletion entirely removes the loop connecting the central β-strands that form the core of the Spa40 fold,

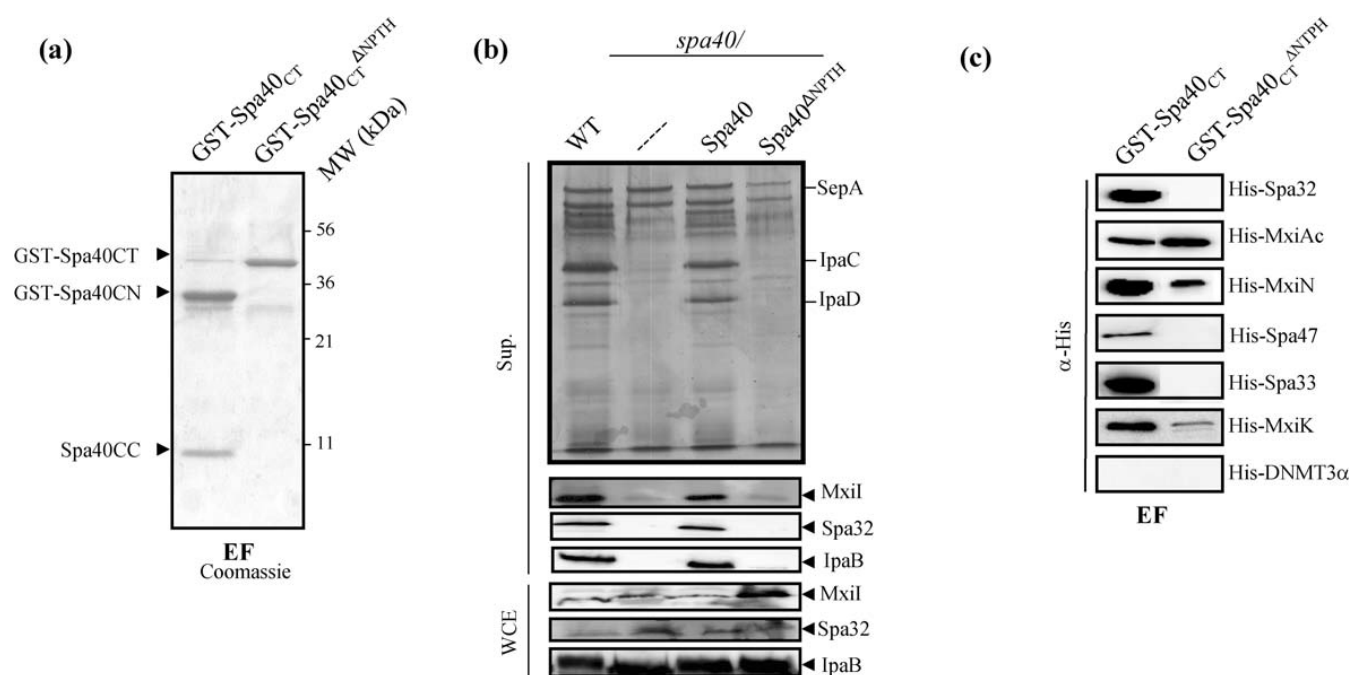


Fig. 6. Deletion of the NPTH motif abolishes Spa40 cleavage, assembly of the T3SA and binding to Spa32, Spa33 and Spa47. (a) Analysis of eluted fractions (EF) of GST-Spa40_{CT} and GST-Spa40_{CT}^{ΔNPTH} by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. (b) Proteins present in culture supernatants (Sup.) and whole cell extracts (WCE) of M90T (wild-type; WT), *spa40* mutant, *spa40*/Spa40 or *spa40*/Spa40^{ΔNPTH} were analysed by immunoblotting with antibodies directed against MxiI, Spa32, IpaB, IpaC and IpaA. (c) SDS-PAGE and immunoblotting analysis of eluted fractions (EF) from beads coated with GST-Spa40_{CT} or GST-Spa40_{CT}^{ΔNPTH} after incubation with the cleared extract of *E. coli* producing His-Spa32, His-MxiA_C, His-MxiN, His-MxiK, His-Spa47 or His-Spa33. His-DNMT3α, negative control.

which could consequently generate a misfolded protein. However, the inclusion of GST-Spa40_{CT}^{ΔNPTH} in our analysis is supported by the fact that certain interactions with MxiA_C, MxiK and MxiN are maintained. In conclusion, Spa40 processing is likely to reflect a cytoplasmic conformational change that defines its binding specificity.

DISCUSSION

The assembly of the T3SA needle is a carefully orchestrated multi-step process that requires the coordination of many proteins located in the cytosol, in membranes and on the bacterial cell surface. In the present study, we investigated the role of Spa40, and report structural and functional evidence that supports the concept that Spa40 processing directs selective molecular interactions with several T3SA components, such as Spa32, Spa33, Spa47, MxiK, MxiN and MxiA (Table 2). To get insight into Spa32 function in the switch, we first searched for its interacting partners and identified a domain encompassing residues 309–342 of Spa40 that is sufficient for Spa32 binding. The *spa40* mutant lacks a dense region at the central base of the NC basal body, which may reflect the position of Spa40 in this structure, confirming earlier work that established that

Spa40 is a minor component of the central inner-membrane export apparatus (Zenk *et al.*, 2007).

To characterize further the role of the C-terminal domain, we examined the effect of single amino acid residue mutations within Spa40. Mutations of L310 or V320, both of which are conserved among Spa40 homologues, abolished the needle assembly and Spa32 binding. L310 is part of a conserved consensus sequence LARXLY, located near a positively charged patch mapped to helix α3, which lies directly below the NPTH loop region (Deane *et al.*, 2008). This position suggests that it may play a role in the recruitment of T3SA components (Deane *et al.*, 2008). Indeed, we found that Spa40 interacts with Spa33, Spa47, MxiN, MxiK and MxiA_C. These interactions, except those with Spa47 and MxiK, involve the last 33 residues of Spa40, suggesting that some competition may occur during the assembly process. We have previously reported that a *Shigella* strain mutated in *spa47*, *mxiN* or *mxiK* does not assemble the needle substructure because of the instability of MxiH and MxiI in the bacterial cytoplasm, suggesting that the preliminary function of the Spa47 ATPase is to ensure the transit of the needle components. In line with this hypothesis, the FliH–FliI interaction with FlhB_C (Zhu *et al.*, 2002) facilitates the initial entry of exported substrates into the gate, with the energy of ATP hydrolysis

Table 2. Summary of interactions identified between Spa40 and T3S components

Equivalent interactions with YscU from *Yersinia* or with FlhB of *Salmonella* are also indicated. –, No interaction; +, interaction; +/–, reduced interaction; ND, not determined.

T3S component	YscU	T3S component	FlhB	T3S component	Spa40						
					CT	CN	CC	CC*	CT ^{L310A}	CT ^{V320K}	CT ^{ANPTH}
YscP	–	FliK	+	Spa32	+	–	+	+	–	–	–
YscQ	+	FliN	ND	Spa33	+	–	+	+	+	+	–
YscN	–	FliI	+	Spa47	+	+	–	–	+	+	–
†		†		MxiK	+	+/–	–	–	–	+	+
YscL	+	FliH	ND	MxiN	+	–	–	+	–	+	+
YscV	ND	FlhA	+	MxiA _C	+	–	+	+	+	–	+

†MxiK has no counterpart in *Yersinia* or *Salmonella*.

being used to disassemble and release the FliH–FliI complex from the protein to be exported (Minamino & Namba, 2008). Recently, the large cytoplasmic domains of YscU have been defined as necessary for the recruitment of the YscN ATPase regulatory complex, YscK–YscL–YscQ, in *Yersinia* (Riordan & Schneewind, 2008). The interaction identified here between the Spa40_{CN} domain and Spa47 and MxiK may permit the correct positioning or movement of the Spa40_{CC} domain and its recruitment of needle subunits or other components. The L310A mutation drastically reduced Spa40–MxiN binding, while the V320K mutation reduced the Spa40–MxiA_C interaction, suggesting that the binding domain of Spa40 is part of the last α -helix. Based on these results, we propose that the specific interaction of Spa40 with MxiA_C or MxiN is essential for the early events of needle assembly.

We investigated the role of Spa40 cleavage per se by constructing an Spa40 variant lacking the NPTH motif. Spa40^{ANPTH} was not functional and was no longer able to interact with Spa32, Spa33 and Spa47, but still bound MxiA, MxiN and MxiK. The interaction of MxiA_C or MxiN with Spa40^{ANPTH} was not seen with Spa40^{L310A} and Spa40^{V320K} variants, which were also uncleaved, suggesting that residues L310 and V320 are directly part of the binding site. Therefore, our results strongly suggest that the altered function of the unprocessed form of Spa40 results from loss of binding or recognition of other T3SS components. Studies on EscU and SpaS, the Spa40 counterparts of EPEC and *Salmonella*, highlight the importance of the cleavage in T3S function (Zarivach *et al.*, 2008). Structural and *in vivo* analysis of specific mutations within EscU illustrate the conformational effects of auto-cleavage in modulating the EscU region involved in interactions with other T3SS components at the inner membrane (Zarivach *et al.*, 2008).

One intriguing result that we obtained concerns the intracellular accumulation of the minor needle component MxiI in strain *spa40/Spa40*^{ANPTH}. This suggests that Spa40 processing controls MxiI secretion before the assembly of the NC basal body. In comparison, a recent study has

highlighted the critical role of the inner rod protein YscI, the *Yersinia* MxiI counterpart, in the substrate specificity switch. Indeed, it was reported that the formation of the inner rod, not the needle, is critical for substrate specificity switching, and that YscP and YscU exert their effects on substrate export by controlling YscI secretion (Wood *et al.*, 2008). Thus, as suggested for PrgI/YscI (Marlovits *et al.*, 2004), MxiI may form a rod-like structure inside the base that is required for needle stability and may function as a platform for the initiation of needle polymerization (Marlovits *et al.*, 2006; Wood *et al.*, 2008).

In conclusion, based on our results and on accumulating data from the literature, we propose a model in which the cleaved form of Spa40 interacts with MxiK and MxiN, leading to the recruitment of the ATPase Spa47 at the T3S basal body structure. In addition, the novel conformation of Spa40_{CC}, within the MxiK–Spa47–MxiN complex, exposes certain residues that facilitate its interaction with Spa33, which is known to interact with the two inner-membrane T3S components MxiG and MxiJ. This configuration permits the transit of the needle components MxiI and MxiH. Later, once the needles reach 50 nm, Spa32 could compete with MxiN for interaction with the Spa40_{CC} domain to stop MxiH secretion, leading to the switch to translocator secretion. Consequently, a conformational change in the ATPase Spa47 would control the switch in substrate specificity from needle components to effectors, as has been suggested for the switch from translocators to later effectors (Botteaux *et al.*, 2009).

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported in part by grants from the Belgian FRSM (Fonds National de la Recherche Scientifique Médicale, Convention: 3.4623. 06). A. B. is supported by a fellowship from the Fonds de la Recherche Scientifique (FRS-FNRS) (Belgium). L. B. was supported by a grant from the FNRS-FRS. Part of this work was supported by grants from Emile Defay (Université libre de Bruxelles; ULB) and from the Alice and David Van Buuren foundations (ULB). We would like to thank M. Chamekh for helpful discussion and for A.B.'s

laboratory training in 2004. We finally thank D. Lakhoulfi for technical assistance.

REFERENCES

- Aizawa, S. I. (2001). Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol Lett* **202**, 157–164.
- Allaoui, A., Mounier, J., Prevost, M. C., Sansonetti, P. J. & Parsot, C. (1992a). *icsB*: a *Shigella flexneri* virulence gene necessary for the lysis of protrusions during intercellular spread. *Mol Microbiol* **6**, 1605–1616.
- Allaoui, A., Sansonetti, P. J. & Parsot, C. (1992b). MxiJ, a lipoprotein involved in secretion of *Shigella* Ipa invasins, is homologous to YscJ, a secretion factor of the *Yersinia* Yop proteins. *J Bacteriol* **174**, 7661–7669.
- Allaoui, A., Menard, R., Sansonetti, P. J. & Parsot, C. (1993a). Characterization of the *Shigella flexneri* *ipgD* and *ipgF* genes, which are located in the proximal part of the *mxi* locus. *Infect Immun* **61**, 1707–1714.
- Allaoui, A., Sansonetti, P. J. & Parsot, C. (1993b). MxiD, an outer membrane protein necessary for the secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins. *Mol Microbiol* **7**, 59–68.
- Allaoui, A., Woestyn, S., Sluiter, C. & Cornelis, G. R. (1994). YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. *J Bacteriol* **176**, 4534–4542.
- Allaoui, A., Sansonetti, P. J., Menard, R., Barzu, S., Mounier, J., Phalipon, A. & Parsot, C. (1995). MxiG, a membrane protein required for secretion of *Shigella* spp. Ipa invasins: involvement in entry into epithelial cells and in intercellular dissemination. *Mol Microbiol* **17**, 461–470.
- Andrews, G. P. & Maurelli, A. T. (1992). *mxiA* of *Shigella flexneri* 2a, which facilitates export of invasion plasmid antigens, encodes a homolog of the low-calcium-response protein, LcrD, of *Yersinia pestis*. *Infect Immun* **60**, 3287–3295.
- Barzu, S., Nato, F., Rouyre, S., Mazie, J. C., Sansonetti, P. J. & Phalipon, A. (1993). Characterization of B-cell epitopes on IpaB, an invasion-associated antigen of *Shigella flexneri*: identification of an immunodominant domain recognized during natural infection. *Infect Immun* **61**, 3825–3831.
- Björnfot, A. C., Lavander, M., Forsberg, A. & Wolf-Watz, H. (2009). Autoproteolysis of YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* is important for regulation of expression and secretion of Yop proteins. *J Bacteriol* **191**, 4259–4267.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P. J. & Allaoui, A. (2001). Structure and composition of the *Shigella flexneri* “needle complex”, a part of its type III secretion. *Mol Microbiol* **39**, 652–663.
- Blocker, A., Komoriya, K. & Aizawa, S. (2003). Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3027–3030.
- Botteaux, A., Sani, M., Kayath, C. A., Boekema, E. J. & Allaoui, A. (2008). Spa32 interaction with the inner-membrane Spa40 component of the type III secretion system of *Shigella flexneri* is required for the control of the needle length by a molecular tape measure mechanism. *Mol Microbiol* **70**, 1515–1528.
- Botteaux, A., Sory, M. P., Biskri, L., Parsot, C. & Allaoui, A. (2009). MxiC is secreted by and controls the substrate specificity of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus. *Mol Microbiol* **71**, 449–460.
- Dale, C., Young, S. A., Haydon, D. T. & Welburn, S. C. (2001). The insect endosymbiont *Sodalis glossinidius* utilizes a type III secretion system for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1883–1888.
- Dale, C., Plague, G. R., Wang, B., Ochman, H. & Moran, N. A. (2002). Type III secretion systems and the evolution of mutualistic endosymbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12397–12402.
- Deane, J. E., Graham, S. C., Mitchell, E. P., Flot, D., Johnson, S. & Lea, S. M. (2008). Crystal structure of Spa40, the specificity switch for the *Shigella flexneri* type III secretion system. *Mol Microbiol* **69**, 267–276.
- Edqvist, P. J., Olsson, J., Lavander, M., Sundberg, L., Forsberg, A., Wolf-Watz, H. & Lloyd, S. A. (2003). YscP and YscU regulate substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system. *J Bacteriol* **185**, 2259–2266.
- Ferris, H. U., Furukawa, Y., Minamino, T., Kroetz, M. B., Kihara, M., Namba, K. & Macnab, R. M. (2005). FlhB regulates ordered export of flagellar components via autocleavage mechanism. *J Biol Chem* **280**, 41236–41242.
- Fraser, G. M., Hirano, T., Ferris, H. U., Devgan, L. L., Kihara, M. & Macnab, R. M. (2003). Substrate specificity of type III flagellar protein export in *Salmonella* is controlled by subdomain interactions in FlhB. *Mol Microbiol* **48**, 1043–1057.
- Jouihri, N., Sory, M. P., Page, A. L., Gounon, P., Parsot, C. & Allaoui, A. (2003). MxiK and MxiN interact with the Spa47 ATPase and are required for transit of the needle components MxiH and MxiI, but not of Ipa proteins, through the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* **49**, 755–767.
- Journet, L., Agrain, C., Broz, P. & Cornelis, G. R. (2003). The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* **302**, 1757–1760.
- Kane, C. D., Schuch, R., Day, W. A., Jr & Maurelli, A. T. (2002). MxiE regulates intracellular expression of factors secreted by the *Shigella flexneri* 2a type III secretion system. *J Bacteriol* **184**, 4409–4419.
- Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S. I. & Galan, J. E. (2000). Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10225–10230.
- Kutsukake, K., Minamino, T. & Yokoseki, T. (1994). Isolation and characterization of FliK-independent flagellation mutants from *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**, 7625–7629.
- Macnab, R. M. (1999). The bacterial flagellum: reversible rotary propeller and type III export apparatus. *J Bacteriol* **181**, 7149–7153.
- Macnab, R. M. (2004). Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 207–217.
- Magdalena, J., Hachani, A., Chamekh, M., Jouihri, N., Gounon, P., Blocker, A. & Allaoui, A. (2002). Spa32 regulates a switch in substrate specificity of the type III secretion of *Shigella flexneri* from needle components to Ipa proteins. *J Bacteriol* **184**, 3433–3441.
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D. R., Galan, J. E. & Unger, V. M. (2004). Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* **306**, 1040–1042.
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Lara-Tejero, M., Thomas, D., Unger, V. M. & Galán, J. E. (2006). Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature* **441**, 637–640.
- Martinez, E., Bartolome, B. & de la Cruz, F. (1988). pACYC184-derived cloning vectors containing the multiple cloning site and *lacZ* alpha reporter gene of pUC8/9 and pUC18/19 plasmids. *Gene* **68**, 159–162.
- Menard, R., Sansonetti, P. J. & Parsot, C. (1993). Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J Bacteriol* **175**, 5899–5906.
- Minamino, T. & Macnab, R. M. (2000). Domain structure of *Salmonella* FlhB, a flagellar export component responsible for substrate specificity switching. *J Bacteriol* **182**, 4906–4914.

- Minamino, T. & Namba, K. (2008).** Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature* **451**, 485–488.
- Morita-Ishihara, T., Ogawa, M., Sagara, H., Yoshida, M., Katayama, E. & Sasakawa, C. (2005).** *Shigella* Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. *J Biol Chem* **281**, 599–607.
- Page, A. L., Fromont-Racine, M., Sansonetti, P., Legrain, P. & Parsot, C. (2001).** Characterization of the interaction partners of secreted proteins and chaperones of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* **42**, 1133–1145.
- Parsot, C. (2009).** *Shigella* type III secretion effectors: how, where, when, for what purposes? *Curr Opin Microbiol* **12**, 110–116.
- Penno, C., Hachani, A., Biskri, L., Sansonetti, P., Allaoui, A. & Parsot, C. (2006).** Transcriptional slippage controls production of type III secretion apparatus components in *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* **62**, 1460–1468.
- Phalipon, A., Arondel, J., Nato, F., Rouyre, S., Mazie, J. C. & Sansonetti, P. J. (1992).** Identification and characterization of B-cell epitopes of IpaC, an invasion-associated protein of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* **60**, 1919–1926.
- Pilgram, G. S., Engelsma-van Pelt, A. M., Oostergetel, G. T., Koerten, H. K. & Bouwstra, J. A. (1998).** Study on the lipid organization of stratum corneum lipid models by (cryo-) electron diffraction. *J Lipid Res* **39**, 1669–1676.
- Riordan, K. E. & Schneewind, O. (2008).** YscU cleavage and the assembly of *Yersinia* type III secretion machine complexes. *Mol Microbiol* **68**, 1485–1501.
- Sani, M., Allaoui, A., Fusetti, F., Oostergetel, G. T., Keegstra, W. & Boekema, E. J. (2007).** Structural organization of the needle complex of the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Micron* **38**, 291–301.
- Sansonetti, P. J., d’Hauteville, H., Formal, S. B. & Toucas, M. (1982).** Plasmid-mediated invasiveness of “*Shigella*-like” *Escherichia coli*. *Ann Microbiol (Paris)* **133**, 351–355.
- Sasakawa, C., Komatsu, K., Tobe, T., Suzuki, T. & Yoshikawa, M. (1993).** Eight genes in region 5 that form an operon are essential for invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri* 2a. *J Bacteriol* **175**, 2334–2346.
- Schuch, R. & Maurelli, A. T. (2001).** Spa33, a cell surface-associated subunit of the Mxi-Spa type III secretory pathway of *Shigella flexneri*, regulates Ipa protein traffic. *Infect Immun* **69**, 2180–2189.
- Tran Van Nhieu, G., Ben-Ze’ev, A. & Sansonetti, P. J. (1997).** Modulation of bacterial entry into epithelial cells by association between vinculin and the *Shigella* IpaA invasin. *EMBO J* **16**, 2717–2729.
- Viprey, V., Del Greco, A., Golinowski, W., Broughton, W. J. & Perret, X. (1998).** Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol Microbiol* **28**, 1381–1389.
- Wiesand, U., Sorg, I., Amstutz, M., Wagner, S., Van den Heuvel, J., Lührs, T., Cornelis, G. R. & Heinz, D. W. (2009).** Structure of the type III secretion recognition protein YscU from *Yersinia enterocolitica*. *J Mol Biol* **385**, 854–866.
- Williams, A. W., Yamaguchi, S., Togashi, F., Aizawa, S. I., Kawagishi, I. & Macnab, R. M. (1996).** Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **178**, 2960–2970.
- Wood, S. E., Jin, J. & Lloyd, S. A. (2008).** YscP and YscU switch the substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system by regulating export of the inner rod protein YscI. *J Bacteriol* **190**, 4252–4262.
- Zarivach, R., Deng, W., Vuckovic, M., Felise, H. B., Nguyen, H. V., Miller, S. I., Finlay, B. B. & Strynadka, N. C. (2008).** Structural analysis of the essential self-cleaving type III secretion proteins EscU and SpaS. *Nature* **453**, 124–127.
- Zenk, S. F., Stabat, D., Hodgkinson, J. L., Veenendaal, A. K., Johnson, S. & Blocker, A. J. (2007).** Identification of minor inner-membrane components of the *Shigella* type III secretion system ‘needle complex’. *Microbiology* **153**, 2405–2415.
- Zhu, K., Gonzalez-Pedrajo, B. & Macnab, R. M. (2002).** Interactions among membrane and soluble components of the flagellar export apparatus of *Salmonella*. *Biochemistry* **41**, 9516–9524.

Edited by: D. L. Gally

1.2. Etude de la protéine Spa32

L'étude du rôle de la protéine Spa32 a fait l'objet d'une publication en tant que co-premier auteur dans la revue *Molecular Microbiology*. (Botteaux A., Sani M., **Kayath C.**, Boekema E., and A. Allaoui. **“Spa32 interaction with the inner-membrane Spa40 component of the type III secretion system of *Shigella flexneri* is required for the control of the needle length by a molecular tape measure mechanism”**. Publié (2008).

Des travaux réalisés dans notre laboratoire ont montré que le produit du gène *spa32* est nécessaire au contrôle de la taille de l'aiguille ainsi qu'au changement de spécificité du substrat de la sécrétion des protéines MxiH vers la sécrétion des protéines translocatrices et effectrices [115]. En effet, le mutant *spa32* présente des aiguilles anormalement longues et il est incapable d'envahir des cellules HeLa *in vitro*.

Afin d'identifier les domaines fonctionnels de Spa32, nous avons généré onze mutants par délétion interne du gène *spa32* (D1 à D11) et nous avons ensuite analysé leurs capacités à contrôler la longueur de l'aiguille, à restaurer la sécrétion des protéines Ipas, et à rétablir l'invasion de cellules en culture. L'analyse de toutes ces constructions nous a permis de déduire que seules les protéines tronquées des résidus internes 37-94 et 130-159 restent totalement fonctionnelles.

Les résidus 206 à 280 de la protéine Spa32 partagent un certain degré d'homologie avec un domaine décrit précédemment comme étant nécessaire et suffisant au changement de spécificité de substrats chez les protéines homologues de *Yersinia* et *Salmonella* [125, 284]. Nous avons montré, par des expériences de co-purification, que ce domaine de Spa32 interagit avec le domaine cytoplasmique de la protéine Spa40, (voir chapitre 1.1.). Cette interaction, longtemps suggérée dans tous les systèmes homologues, est mise en évidence pour la première fois grâce à notre travail.

Nos résultats indiquent clairement que les délétions introduites dans Spa32 affectent le contrôle de la taille de l'aiguille de manière similaire à celles obtenues avec le mutant *spa32*. Ceci va à l'encontre de différentes études publiées sur les protéines homologues FliK et YscP, dans lesquelles un mécanisme de « molecular ruler » a été proposé pour expliquer la fonction de ces protéines [113]. De plus, nous avons montré que la fonction de Spa32 peut être substituée par les protéines YscP de *Yersinia* ou InvJ de *Salmonella*.

Nos travaux montrent que contrairement à ce qui a été proposé dans la littérature, les mécanismes impliqués dans la régulation de la longueur de l'aiguille sont conservés parmi plusieurs espèces bactériennes.

Spa32 interaction with the inner-membrane Spa40 component of the type III secretion system of *Shigella flexneri* is required for the control of the needle length by a molecular tape measure mechanism

Anne Botteaux,^{1†} Musa Sani,^{2†} Christian A. Kayath,^{1†} Egbert J. Boekema² and Abdelmounaïm Allaoui^{1*}

¹Laboratoire de Bactériologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles (ULB), Route de Lennik, 808, 1070, Bruxelles, Belgium.

²Biophysical Chemistry, Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute, University of Groningen, Groningen, The Netherlands.

Summary

The effectors of enterocyte invasion by *Shigella* are dependent on a type III secretion system that contains a needle whose length average does not exceed 50 nm. Previously, we reported that Spa32 is required for needle length control as well as to switch substrate specificity from MxiH to Ipa proteins secretion. To identify functional domains of Spa32, 11 truncated variants were constructed and analysed for their capacity (i) to control the needle's length; (ii) to secrete the Ipa proteins; and (iii) to invade HeLa cells. Deletion at either the N-terminus or C-terminus affect Spa32 function in all cases, but Spa32 variants lacking internal residues 37–94 or 130–159 retained full Spa32 function. Similarly, a Spa32 variant obtained by inserting of the YscP's ruler domain retained Spa32 function although it programmed slightly elongated needles. Using the GST pull-down assay, we show that residues 206–246 are required for Spa32 binding to the C-terminus of Spa40, an inner membrane protein required for Ipa proteins secretion. Our data clearly demonstrate that shortening Spa32 affects the length of the needle in a comparable manner to the *spa32* mutant, indicating that the

control of needle length does not require a molecular ruler mechanism.

Introduction

Shigella flexneri is the aetiological agent of the endemic form of bacillary dysentery. This Gram-negative bacterium causes disease by invading the colonic mucosa (Hale, 1991). The pathogenesis of *Shigella* is attributed to the organism's ability to invade, replicate and spread intercellularly within the colonic epithelium. The invasion of host cells by *Shigella* spp. is a complex multifactorial event that involves many different bacterial proteins. Many of the genes for key *Shigella* virulence proteins are located on a 214 kb plasmid and are conserved in all *Shigella* spp. All bacterial genes necessary for entry into host cells have been identified (Parsot *et al.*, 2005). They are clustered within a 30 kb region of a large virulence plasmid. This region carries two types of genes: the *ipa* and *ipg* encoding the entry-mediating proteins and their individual intrabacterial chaperones (Parsot *et al.*, 2005; Espina *et al.*, 2006; Sani *et al.*, 2007a), and the *mxi* and *spa* genes that code for proteins forming a type III secretion system (T3SS) (Blocker *et al.*, 2001). This system is found in many other pathogenic Gram-negative bacterial species that have developed diverse survival strategies within their hosts (Hueck, 1998). Upon contact with host cells, a major function of the T3SS is to transport proteins from the bacterial cytoplasm either into the cytosol or to the cytosolic face of the membrane (Cornelis, 2006). Kubori *et al.* (1998) and Blocker *et al.* (1999; 2001) identified and biochemically isolated the macromolecular structure formed by the *Salmonella* and *Shigella* type III secretions. They described this organelle as a cylindrically symmetrical object composed of two parts: a 7–8 nm wide and 50 nm long needle emanating from the bacterial surface and a shorter cylinder, formed by a succession of plates (20–40 nm in diameter) presumed to span the inner and outer bacterial membranes and the peptidoglycan. Analysis of electron microscopy (EM) images of the 'needle complex' (NC) from *Shigella* indicated that the needle and

Accepted 8 October, 2008. *For correspondence. E-mail aallaoui@ulb.ac.be; Tel. (+32) 2 5556251; Fax (+32) 2 5556116. †Present address: Division of Tumour Biology, the Netherlands Cancer Institute-Antoni van Leeuwenhoek Hospital, Plesmanlaan 121, 1066 CX, Amsterdam, The Netherlands. ‡These authors contributed equally to this work.

base contain a central 2–3 nm canal (Blocker *et al.*, 2001; Sani *et al.*, 2007b). Six major NC components, MxiD, MxiG, MxiJ, MxiH, MxiI and MxiM (Blocker *et al.*, 2001; Sani *et al.*, 2007b), have so far been identified to form the NC.

One of the remarkable features of all described type III secretion apparatus (T3SA) is that the length of the needle, a hollow tubular structure, is fairly well controlled at approximately 50 nm in *Shigella*, 60 nm in *Yersinia enterocolitica* and 55 nm in the SPI1-encoded T3SA of *Salmonella* (Blocker *et al.*, 1999; Kimbrough and Miller, 2000; Kubori *et al.*, 2000; Journet *et al.*, 2003). Similarly, the hook length in the flagellar structure is also controlled at around 55 nm in wild-type *Salmonella* (Hirano *et al.*, 1994). The length of the T3SS needle was genetically investigated by mutations in *spa32* from *Shigella* (Magdalena *et al.*, 2002; Tamano *et al.*, 2002), in *invJ* from *Salmonella* (SPI1) (Kubori *et al.*, 2000) and in *yscP* from *Y. enterocolitica* (Journet *et al.*, 2003). The length of the flagellum hook was also investigated by mutation in *fliK* from *Salmonella* (Williams *et al.*, 1996). All mutants exhibit abnormal long needles or hooks that are up to 20 times longer than those observed in wild-type strains. In addition, *invJ*, *yscP* and *spa32* mutants are unable to secrete the Sip, Yop or Ipa substrates respectively (Kubori *et al.*, 2000; Magdalena *et al.*, 2002; Journet *et al.*, 2003).

At least three models were proposed to explain how the needle/hook length is controlled (Minamino and Pugsley, 2005; Marlovits *et al.*, 2006). The first one is related to *Salmonella* flagellar hook length control. FliK, believed to be the hook length sensor, interacts with FlhB, an integral membrane export apparatus component, to change its export specificity upon hook completion at approximately 55 nm in wild-type flagella. Makishima *et al.* (2001) proposed the measuring-cup model in which the hook length is determined by the capacity of the C-ring, which somehow measures the exported amount of FlgE, the hook component. The second major length control model comes from the study of YscP of *Yersinia*, which determines the length of the needle protein YscF by acting as a molecular ruler (Journet *et al.*, 2003). The length of the *Yersinia* injectisome is controlled by *yscP*, a homologue of *fliK* (Journet *et al.*, 2003). Indeed, lengthening or shortening the central part of YscP by amino-acid insertion or deletion causes concomitant changes in needle length (Journet *et al.*, 2003; Cornelis, 2006). More recently, Moriya *et al.* (2006) suggested that FliK acts as a flexible tape measure, but that hook length is also dependent on the hook elongation rate and a switch timing mechanism. In this model, the size of the hook structure depends on the rate of hook polymerization (governed by FlgE concentration) and the frequency of FliK export (in turn, governed by the interaction rate of FliK with FlgE and FlgD). The diameter of the central channel of the flagellum is

only 2 nm, so according to this model FliK must be in an extended conformation in the central channel and functions as a hook-length controller only during its infrequent export process. This may explain why the hook length is not strictly controlled but has a relatively broad distribution. The third model is exemplified by InvJ of *Salmonella*, which is required to stabilize the conformation of the socket located within the basal part of the NC (Marlovits *et al.*, 2006; Sani *et al.*, 2007b). This socket, located within the lower rings of the basal body (Galan and Wolf-Watz, 2006; Marlovits *et al.*, 2006; Sani *et al.*, 2007b), is hypothesized to function as an anchoring platform for the assembly of the inner rod, whose completion would result in the firm anchoring of the needle to the base. This triggers conformational changes that will consequently reprogram the secretion apparatus to halt secretion of the needle and inner rod proteins.

We have previously shown that the length of the Mxi-Spa T3SA needle substructure is fairly well controlled at approximately 50 nm by the Spa32 protein (Magdalena *et al.*, 2002). Here, we address the question of whether Spa32 also functions as a molecular ruler in the control of the needle length by examining the phenotypes of Spa32 variants obtained by deletions in the N-terminus, central and C-terminus part of the full-length *spa32* gene or by insertion of the YscP's ruler domain. Generated Spa32 variants were tested for their capacity to restore needle length control, Ipa proteins secretion and HeLa cells invasion. Moreover, we identified a molecular interaction between Spa32 and Spa40, a component of the type III secretion machinery.

Results

Functional analysis of Spa32 domains in Ipa secretion and HeLa cell invasion

In a previous study, we reported that Spa32 is required for Ipa proteins secretion upon T3SA induction (Magdalena *et al.*, 2002). To identify domains of Spa32 involved in secretion, in-frame deletions within *spa32* gene were constructed on the pMJ8 plasmid encoding His-Spa32 (see *Experimental procedures*; Table S1; Fig. 1A). pMJ8 was previously shown to restore the wild-type secretion phenotype when expressed in $\Delta spa32$ (Magdalena *et al.*, 2002). His-Spa32 variants lacking either the N-terminal domain residues: $\Delta 2$ –10 (pAB34 encoding D1 protein), $\Delta 2$ –36 (pAB36: D2), $\Delta 37$ –94 (pAB66: D3); central domain residues: $\Delta 94$ –187 (pAB35: D4), $\Delta 94$ –159 (pAB47: D5), $\Delta 130$ –187 (pAB46: D6), $\Delta 130$ –159 (pAB38: D7), $\Delta 206$ –280 (pAB65: D8); or the C-terminal domain residues $\Delta 239$ –292 (pAB37: D9) or $\Delta 264$ –292 (pAB39: D10) were constructed, and production of His-Spa32 variants (D1 to D10) was assessed by Western blot using the anti-His or

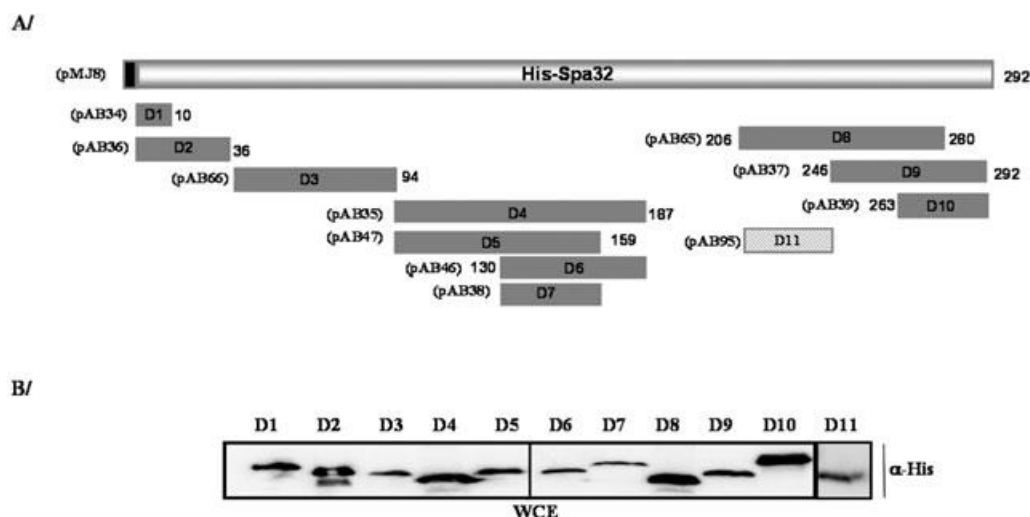


Fig. 1. Construction and production of His-Spa32 truncated derivatives.

A. Schematic representation of the deletions made within *his-spa32* gene harboured on the pMJ8 plasmid. These plasmids were constructed by PCR as indicated in *Experimental procedures*. Dark boxes represent the regions deleted within the Spa32 protein. Position of amino acid residues and the plasmid names are indicated. D1 to D10 represent the name given to truncated His-Spa32 variants.

B. Production of truncated His-Spa32 variants. Whole-cell extracts of Δ *spa32* harbouring plasmids encoding D1 to D11 were prepared from bacteria grown to log phase. Equivalent amounts, 0.3 OD₆₀₀ of each sample, were loaded on SDS-PAGE and probed using the anti-His monoclonal antibody.

the anti-Spa32 antibodies (Fig. 1B and data not shown). Next, the His-Spa32 variants were analysed for their capacity to restore the wild-type secretion of Δ *spa32*. Bacteria grown to exponential growth phase were incubated with Congo red to induce Ipa proteins secretion (see *Experimental procedures*). Cultures supernatants of Δ *spa32* expressing His-Spa32 variants were analysed by SDS-PAGE, Coomassie blue-stained (Mab) against IpaC. As a control we loaded proteins from the supernatant of

Δ *spa32* expressing the entire His-Spa32 protein. As shown in Fig. 2A, secretion of IpaC was seen only in Δ *spa32* strain expressing parental His-Spa32, D3 and D7 but not from Δ *spa32* expressing D1, D2, D4 to D6 and D8 to D10 proteins. The lack of secretion was not due to the lack of IpaC synthesis by the various strains (Fig. 2B).

To investigate the ability of Δ *spa32* strains expressing His-Spa32 variants to enter HeLa cells, we performed quantitative gentamicin protection assay as described in

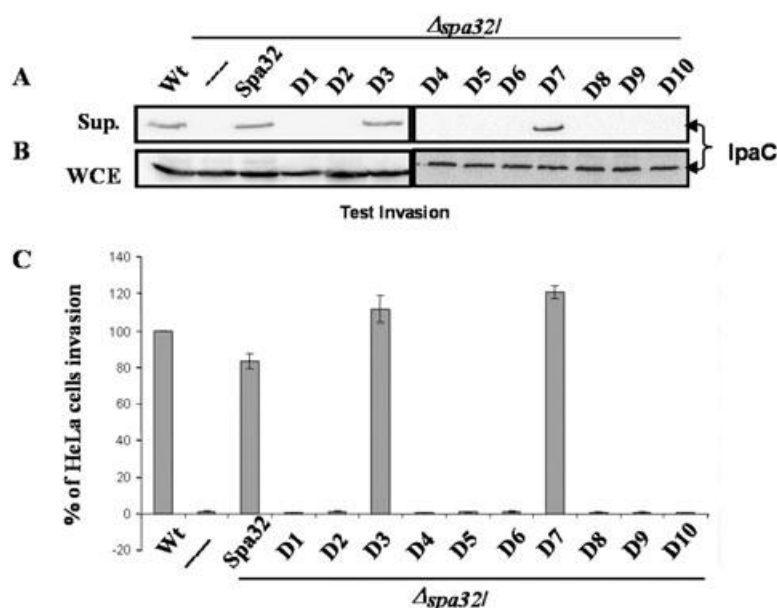


Fig. 2. IpaC secretion and invasion of HeLa cells by His-Spa32 derivatives.

A. IpaC production and secretion. Whole-cell extracts of Δ *spa32* strain harbouring pAB plasmids encoding D1 to D10 were prepared from bacteria grown to log phase. An OD₆₀₀ of 0.3 of each sample was loaded on SDS-PAGE and probed using the anti-IpaC monoclonal antibody. For the supernatant, bacteria grown to log phase were centrifuged, and the pellet was incubated with Congo red to induce proteins secretion via the T3SA. Secreted proteins were then separated on SDS-PAGE and immunoblotted using the IpaC specific Mab.

B. Invasion of HeLa cells by the Δ *spa32* strain expressing His-Spa32 or its derivatives D1 to D10. *Shigella* strains grown to log phase were incubated with HeLa cell cultures. After cells lysis, bacterial counting was performed by spreading bacteria on plates containing selective antibiotics.

the *Experimental procedures*. As indicated in Fig. 2C, quantification of the number of intracellular bacteria clearly demonstrates that most His-Spa32 variants, except parental His-Spa32, D3 and D7, were not able to restore the entry defect of $\Delta spa32$. This indicates that residues 36–94 (D3) and 130–159 (D7) are dispensable in both lpa proteins secretion and HeLa cell invasion.

Needle length is not controlled by a molecular ruler mechanism

Electron microscopy examination of wild-type strain shows that it possesses needles of normal length that ranges between 34 and 90 nm, with a peak around 45 nm (Fig. 3). Most of the needles were attached to the surface of the bacteria. Our measurements were based on attached needles, but a comparison of detached and attached needles did not show any significant differences (data not shown). In contrast, examination of $\Delta spa32$ shows that the needle length is distributed over a broad range from 100 to 900 nm, with a peak around 314 nm (Fig. 3). Complementation of the $\Delta spa32$ by pMJ8, expressing parental His-Spa32, restored the length to a range between 18 and 78 nm with a peak at around 44 nm, similar to wild-type phenotype (Fig. 3). To test whether Spa32 deletions affect needle length, $\Delta spa32$ strains expressing the 10 His-Spa32 variants (D1 to D10) were examined by EM. We found that mutations in both N-terminal (D1 or D2) and C-terminal (D9 or D10) domains of Spa32 affected needle length control, with production of shorter needles ranging between 152 and 217 nm compared with $\Delta spa32$ (314 nm) (Table 1). This indicates that both Spa32 terminal regions are required for precise length control. When $\Delta spa32$ -expressing His-Spa32 variants with internal mutations were examined, only D3 and D7 proteins restored wild-type needle length, 45.6 and 46 nm, respectively, while D4, D5, D6 and D8 programmed needles of 165, 194, 210 and 147 nm respectively (Fig. 3D and Table 1). This indicates that needle length is not proportional to the size of the Spa32 protein.

Spa32 interacts, via residues 206–246, with the C-terminal domain of Spa40

FliK was shown to interact with the soluble carboxyl-terminal domain of FlhB (FlhB_c) (Minamino and Macnab, 2000). This interaction plays a crucial role in the switch from hook to filament secretion in the flagellum system. To test whether Spa32 interacts with *Shigella*'s FlhB counterpart (Spa40), we constructed plasmid pAB51 encoding GST-Spa40CT. The latter contains GST fused to the cytoplasmic Spa40 domain composed of residues 205–342. Soluble extracts of $\Delta spa32$ producing parental His-Spa32

were incubated with GST-Spa40CT or GST bound to glutathione sepharose beads, and proteins retained on the beads were eluted with glutathione. SDS-PAGE analysis of eluted proteins indicated that His-Spa32 interacted with GST-Spa40CT but not with GST alone (Fig. 4A). To investigate the interaction of GST-Spa40CT with native Spa32, beads carrying GST-Spa40CT were incubated with a concentrated culture supernatant preparation of wild-type *S. flexneri* containing Spa32 (Magdalena *et al.*, 2002). Analysis of eluted fractions by Western blot using an anti-Spa32 polyclonal antibody indicated that native Spa32 binds to GST-Spa40CT (Fig. 4B). As a control, lpaD, which is present in the culture supernatant fraction, does not interact with GST-Spa40CT (Fig. 4B).

To localize the domain of Spa32 that interacts with Spa40, we performed a similar GST pull-down assay by taking advantage of the 10 His-Spa32 variants. Soluble *E. coli* extracts producing His-Spa32 parental or variant proteins were incubated with GST-Spa40CT or GST alone bound to glutathione sepharose. Analysis of eluted fractions indicates that GST-Spa40CT was able to interact, although at different levels, with the five His-Spa32 variants D2, D3, D4, D9 and D10, which are the most representative Spa32 truncated derivatives (Fig. 4C). However, variant D8, in which residues 206–280 were deleted from His-Spa32, was no longer able to interact with GST-Spa40CT (Fig. 4C). The absence of interaction was not due to the lack of D8 production, as it was produced at similar levels compared with wild-type His-Spa32 (Fig. 4C). The fact that D9 contains a deletion of residues 246–292 but still interacts with Spa40CT although at reduced level, and that D8 has residues 206–280 deleted, and cannot interact with Spa40CT, suggests that residues 206–246 are required for Spa40 binding. To test this hypothesis, we constructed variant D11 by deleting residues 206–246. Here we show that this Spa32 variant, although expressed, was no longer able to interact with Spa40CT (Fig. 4C). Thus, we conclude that the Spa32 domain, encompassing residues 206–246, is essential for Spa40 binding. Moreover, we found that D11 was unable to restore the $\Delta spa32$ defect in HeLa cell invasion, lpa proteins secretion or needle length control (data not shown and Fig. 4D).

Spa32 is interchangeable with Salmonella InvJ and Y. enterocolitica YscP

The three proteins Spa32, InvJ of *Salmonella* and YscP of *Y. enterocolitica* share very low sequence similarity and are required for needle length control of their respective T3SA (Fig. 5). To test whether the expression of InvJ or YscP could complement the lack of lpa secretion of $\Delta spa32$, we constructed pDR1 and pAB75; plasmids derivatives of pTZ18R vector that constitutively express

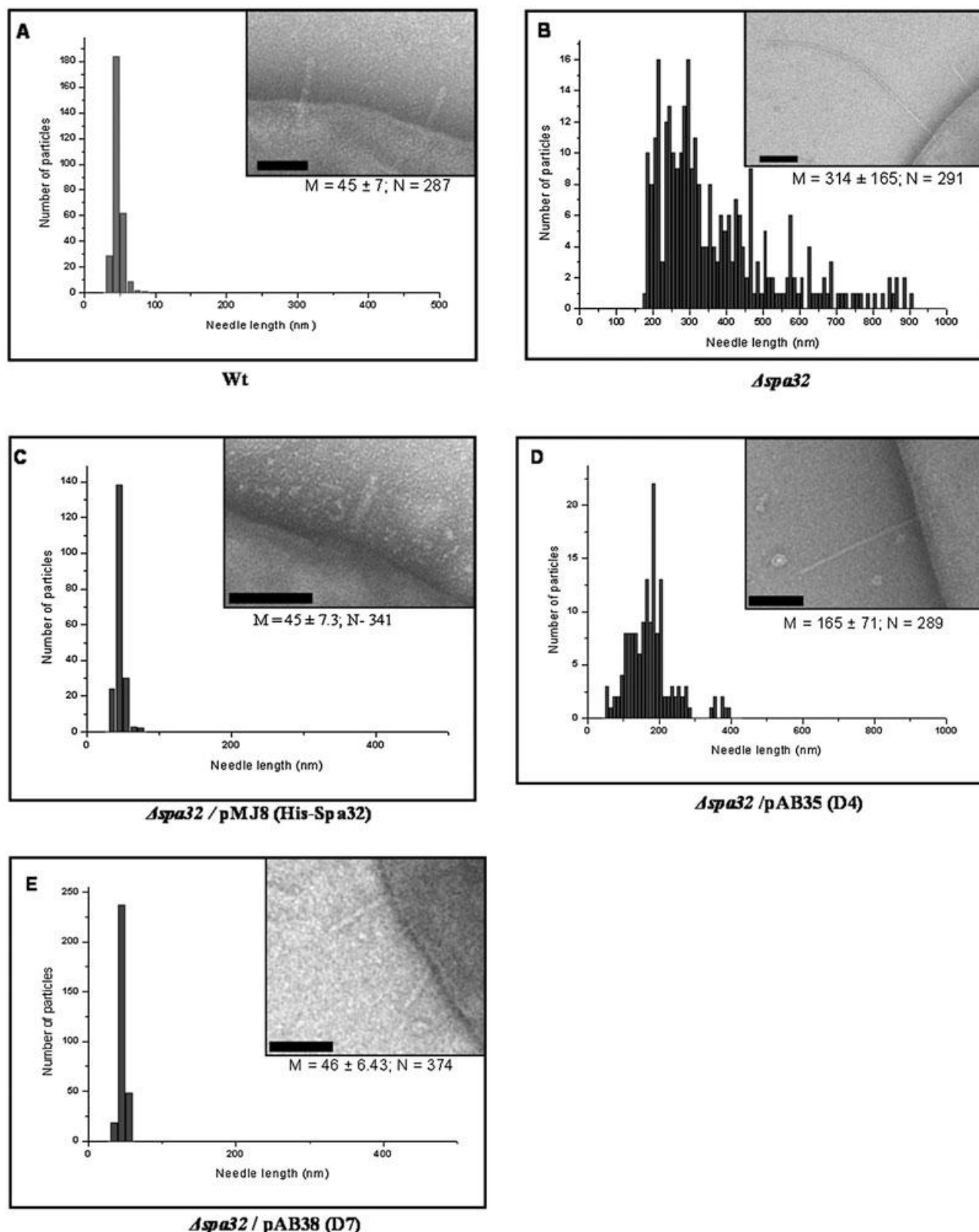


Fig. 3. Effects of *spa32* deletions on needle length. Histogram of needle length measurements and electron micrographs of *S. flexneri* wild-type (A); $\Delta spa32$ mutant expressing needles of random length that sometimes span $0.9 \mu\text{m}$ (B); $\Delta spa32$ mutant complemented with pMJ8 (His-Spa32) showing restoration of wt phenotype (C); D4 deletion variant producing long needles (D); and D7 deletion variant producing needles of wt phenotype length (E). M, median with standard deviation (in nm); N, number of needle particles measured. Scale bars, 50 nm.

Table 1. Needle length control by Spa32 and its derivatives.

Strains	# of aa	M	SD	N
Wt	292	45	7	287
$\Delta spa32$	90 ^a	314	165	291
$\Delta spa32+$ His-Spa32	292	44	8	341
D1	282	187	85	177
D2	256	152	82	233
D3	233	45.6	5	303
D4	198	165	71	289
D5	226	194	87	116
D6	234	210	84	257
D7	262	46	11	554
D8	207	147.3	68	173
D9	237	183	103	119
D10	262	182	91	152
D11	250	182	75	190
YscP	515	53.7	13	131
InvJ	336	46.2	13	174
Spa32 Ω	396	<u>97</u>	36	192

a. Spa32 N-terminal residues that are still produced by the $\Delta spa32$ mutant (Magdalena *et al.*, 2002).

Number in bold indicates when the length of the needle is fairly controlled around 50 nm. Spa32 Ω corresponds to the hybrid Spa32_{1–145}YscP_{202–306}Spa32_{146–292} protein. The number underlined in the lower part of the Table indicates that the length of the needle is slightly elongated (twofold) compared with the wild-type strain.

Needle length measurements: # of aa, number of amino acids of Spa32; M, median of the lengths (nm); SD, standard deviation (nm); N, number of needle particles measured.

InvJ of *Salmonella* or YscP of *Y. enterocolitica*. These plasmids were introduced into $\Delta spa32$ and the resulting strains were first checked for their ability to secrete IpaB and IpaC. Induced culture supernatants of $\Delta spa32$ strain expressing InvJ or YscP were analysed by SDS-PAGE, Coomassie blue stained or immunoblotted using Mab against IpaB and IpaC. Interestingly, we found that both InvJ and YscP restored IpaB and IpaC secretion by $\Delta spa32$ (Fig. 6A). Likewise, ectopic expression of InvJ and YscP in $\Delta spa32$ restored the entry into HeLa cells (Fig. 6B). Lastly, we found that $\Delta spa32$ strains expressing InvJ or YscP also restored the capacity of $\Delta spa32$ to control needle length at 46 and 53 nm respectively (Table 1 and Fig. 6C and D). We conclude from these experiments that Spa32 function is interchangeable with InvJ and YscP homologues.

To investigate YscP or InvJ interaction with Spa40CT, we constructed pAB103 and pAB104 two pTZ18R derivative plasmids encoding His-YscP and His-InvJ and performed GST-Spa40CT pull-down assay. We found that neither of the two hybrid proteins was able to interact with GST-Spa40CT (data not shown). This result can be associated to the reduced amounts of His-YscP and His-InvJ constitutively expressed from the *lacZ* promoter of the pTZ18R vector (data not shown). To test further the interaction of InvJ and YscP with GST-Spa40CT, in a similar condition used to detect His-Spa32 interaction, we con-

structed two plasmids, derivative of the pQE60 vector, producing InvJ-His (pCAK-J) and YscP-His (pCAK-P). Soluble extracts of *E. coli* producing InvJ-His and YscP-His were incubated with GST-Spa40CT or GST bound to glutathione sepharose beads, and proteins retained on the beads were eluted with glutathione. SDS-PAGE analysis of eluted proteins indicated that InvJ-His and YscP-His, like His-Spa32, interacted with GST-Spa40CT but not with GST alone as a control (Fig. 6E).

We conclude from these results that InvJ or YscP can fully replace Spa32 in all tested assays including proteins secretion, HeLa cells invasion, needle length control and Spa40 interaction.

The insertion of the YscP_{202–306} ruler domain of Yersinia within Spa32 affects the needle length of Shigella but not the secretion and the invasion processes

It was reported that a central domain of YscP encompassing residues 202–306 contains a ruler domain (Journet *et al.*, 2003). When this domain was duplicated in YscP of *Y. enterocolitica* itself or inserted within FliK, the length of the needle or the hook was enhanced (Journet *et al.*, 2003; Shibata *et al.*, 2007). To test whether the insertion of the YscP_{202–306} ruler domain within Spa32 affect the MxiH needle length, we constructed plasmid pAB106 expressing Spa32_{1–145}YscP_{202–306}Spa32_{146–292} (Spa32 Ω) by fusing in-frame residues 202–306 of YscP between residues 145 and 146 of Spa32 (Fig. 7A). To avoid any effect on Spa32 function, the ruler domain was inserted within the central part of the D7 domain, which is disposable for Spa32 functioning (Figs 2 and 7A). Spa32 Ω was able to complement the lack of secretion and invasion of the *spa32* mutation in a comparable manner to the wild-type strain (Fig. 7B and C), indicating that the insertion of the YscP's ruler domain does not affect the function of Spa32. To test whether the insertion of the YscP's ruler domain affect needle length, $\Delta spa32$ strains expressing Spa32 Ω variant were examined by EM and were found to program needles of approximately 97 nm (Fig. 7D). Comparatively, the needles are controlled at wild-type level by the unmodified Spa32 protein (45 nm). We conclude from these results that the insertion of the ruler domain of YscP within Spa32 enhanced the length of the needle by twofold.

Discussion

Pathogenic bacteria use a type III secretion nanomachine to deliver virulence proteins into the cytosol of their eukaryotic host cells. Most NCs possess a stiff needle-like structure of a genetically defined length. The needle may be required for triggering T3S, and its length could have

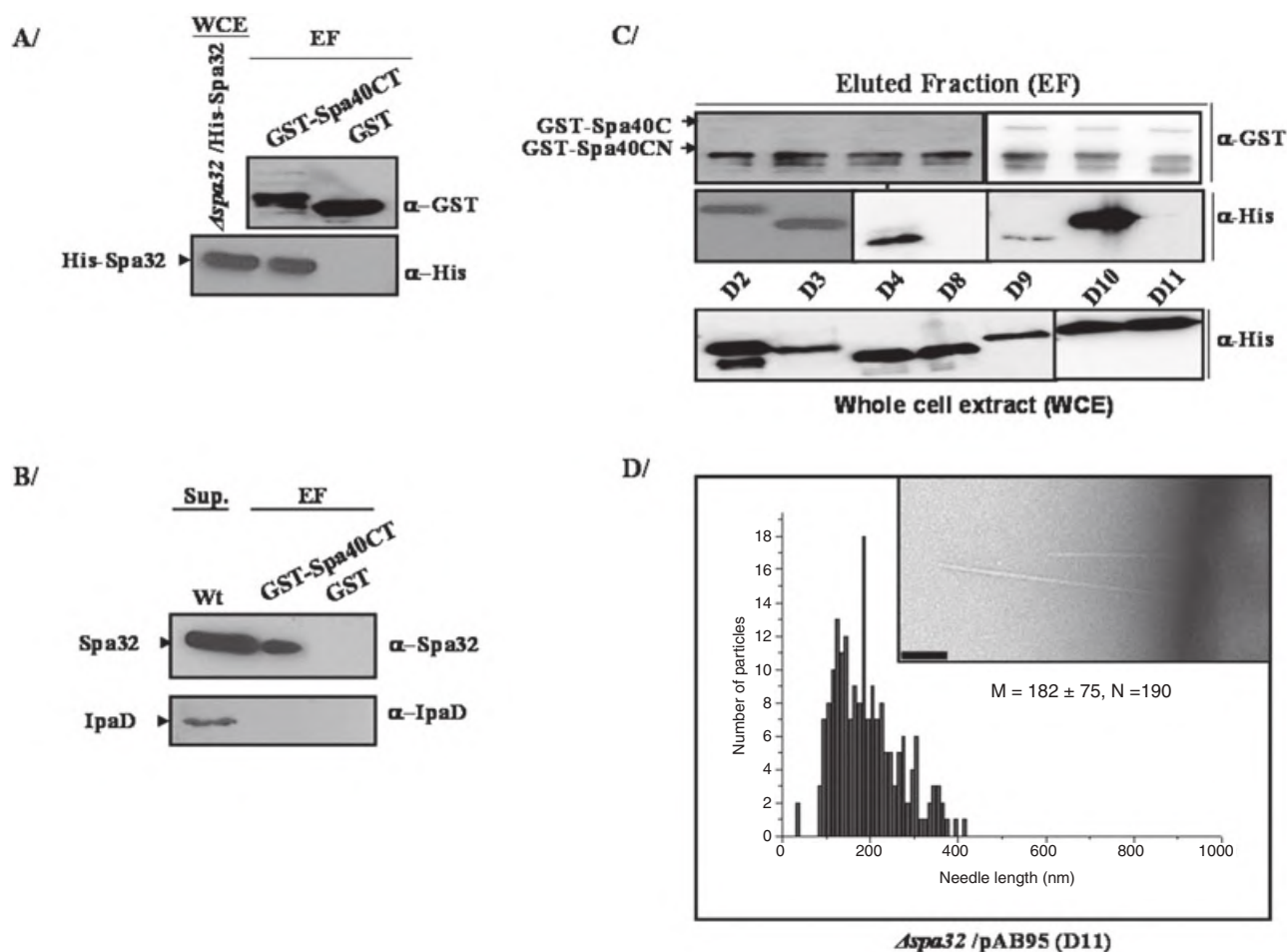


Fig. 4. Spa32 interacts with the integral inner-membrane protein Spa40. Soluble *E. coli* extracts producing His-Spa32 parental or variant proteins were incubated with GST-Spa40CT or GST alone bound to glutathione sepharose.

A. Analysis of eluted fractions (EF) separated on SDS-PAGE and probed with anti-GST (to detect GST derivatives) or Mab anti-His (to detect His-Spa32 derivatives) indicates that GST-Spa40CT was able to interact with parental His-Spa32 but not with the GST alone.

B. Spa40CT interacts with native Spa32. Soluble proteins from the supernatant of wild-type *Shigella* were incubated with GST-Spa40CT or GST alone bound to glutathione sepharose. EF were separated on SDS-PAGE and probed with the polyclonal antibodies anti-Spa32 or anti-IpaD.

C. Identification of the minimal Spa32 domain required for Spa40 binding. Soluble *E. coli* extracts producing the most representative His-Spa32 variant proteins (D2-D4, D8-D10) or variant D11 were incubated with GST-Spa40CT bound to glutathione sepharose. Analysis of EF separated on SDS-PAGE and probed with anti-GST (to detect GST derivatives) or Mab anti-His (to detect His-Spa32 derivatives).

D. Histogram of needle length measurements and electron micrographs of *S. flexneri* $\Delta spa32$ complemented with plasmid pAB106.

evolved to match specific structures at the bacterial and host cell surfaces. Molecular rulers are generally involved in length determination of such long macromolecules (Cornelis, 2006). The importance of needle length control of the T3SS was previously emphasized by two major reports by West *et al.* (2005) and Mota *et al.* (2005). West *et al.* demonstrated that shortening the lipopolysaccharide molecule by around half in *Shigella* enhances T3SS invasion function by allowing the T3SS to be more exposed on the bacterial surface. Mota *et al.* found that a minimal needle length was required for efficient functioning of the *Y. enterocolitica* injectisome. It was later shown that this minimal needle length correlate with the length of

the YadA adhesin on the bacterial surface (Cornelis, 2006).

The goal of this study was to determine how Spa32 acts to regulate overall MxiH needle length. We characterized the function of 11 Spa32 variants with deletions within the N-terminal domain, the central domain or at the C-terminus by testing Ipa secretion, HeLa cell invasion and needle length control. We showed that with the exception of residue deletions 36–94 (D3) and 130–159 (D7), which still generate functional His-Spa32 proteins, all other Spa32 variants were not functional (Fig. 8). Proteins truncated within the first 10 (D1) or 36 residues (D2), which contain the type III predicted secretion signal, or

CLUSTAL 2.0.5 multiple sequence alignment



Fig. 5. Sequence alignment of the Spa32 family using Clustal (2.0.5). Alignment of the amino-acids sequence of Spa32 (*S. flexneri*) and InvJ (*Salmonella*) and YscP (*Y. enterocolitica*). Residues that are identical are indicated by stars, while similar residues are indicated by simple or double dots. The boxes represent domains of Spa32 that are required for its function. The D3 and D7 domains that are dispensable for Spa32 function are indicated by horizontal arrows. The D11 domain that is required for Spa32 binding to Spa40 is represented in the lower part by an horizontal dashed arrow shown in bold.

with a deletion of the last 29 residues (D10) were unable to control the length of the needle, even though the needles produced were shorter than with $\Delta spa32$. Similarly, large truncations within the internal region, D4 or D6, produced similar needle length as variants with N-terminus and C-terminus truncations. In contrast, single deletions of 58 residues in D3, or 29 residues in D7, produced needles of comparable size to the wild-type strain. Collectively, our data suggest that Spa32 does not act as a molecular ruler to regulate the needle length because mutants with large deletions within Spa32 do not produce shorter needles than those generated by variants with minimal deletions.

Length of the needle or hook is regulated at around 50–55 nm in *Shigella* and *Salmonella* and around 60 nm in *Y. enterocolitica*, by proteins that have varying sizes.

Spa32 contains 292 residues, while InvJ, YscP and FliK are composed of 336, 515 and 409 residues respectively. We show that Spa32 and InvJ or YscP are functionally interchangeable. We confirmed the complementation reported of the $\Delta spa32$ by InvJ (Tamano *et al.*, 2002), and showed in addition that YscP can replace Spa32 functions. The latter result contrasts with the lack of $\Delta spa32$ complementation by YscP reported by Tamano *et al.* (2002). While YscP contains 117 residues more than Spa32, the length of the needle, however, was not proportionally longer when it was produced in $\Delta spa32$. In contrast, the insertion of YscP's ruler domain within Spa32 does not affect the Spa32 function but produced needles whose length were enhanced twice compared with wild-type strain (97 versus 45 nm). This finding corroborates previously reported data obtained with YscP or

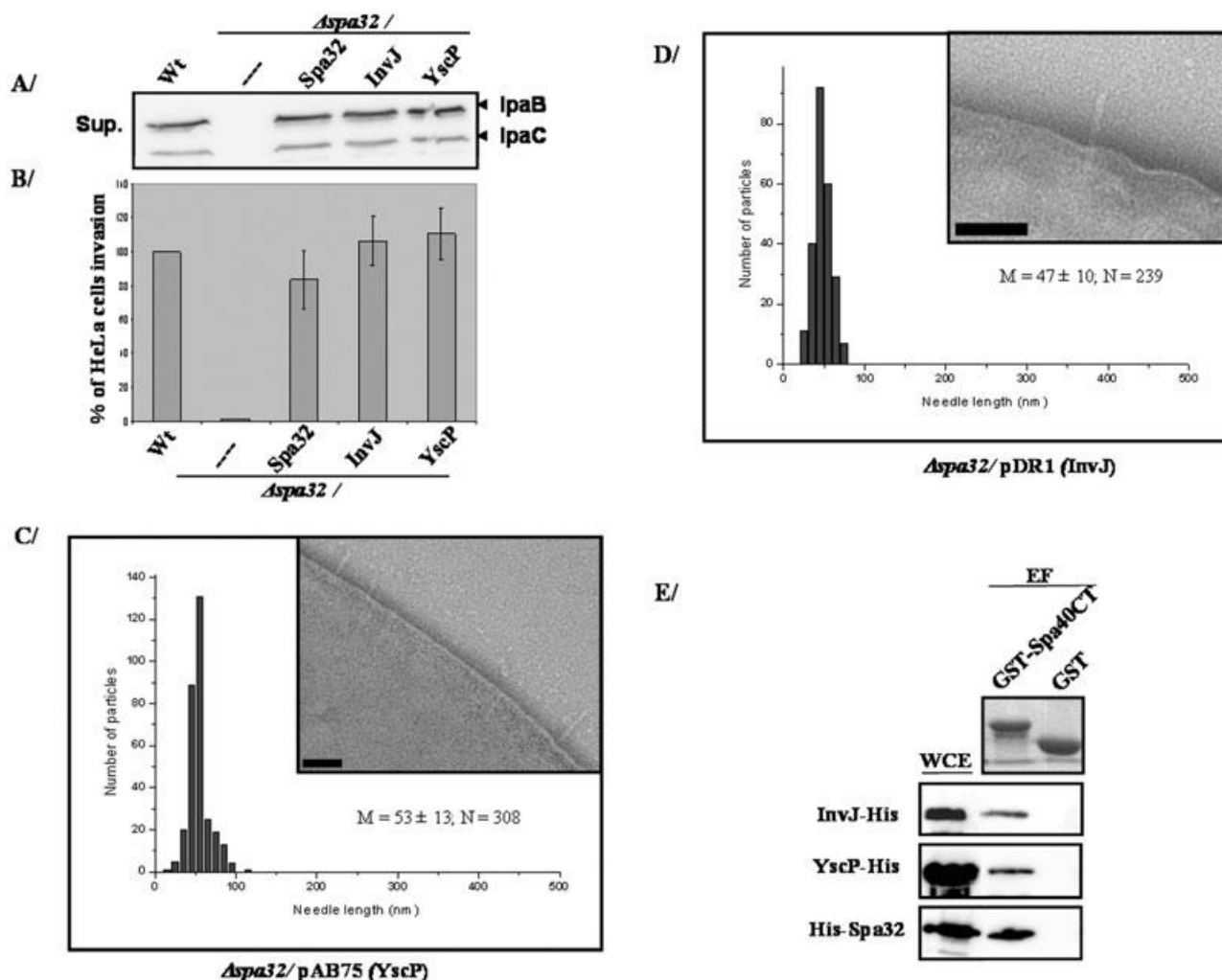


Fig. 6. Spa32 is interchangeable with *Salmonella* InvJ and *Y. enterocolitica* YscP. Bacteria grown to log phase were centrifuged and the pellet was incubated with Congo red to induce proteins secretion via the T3SA (see *Experimental procedures*).

A. Secreted proteins were then separated on SDS-PAGE and immunoblotted using IpaB and IpaC Mabs.

B. HeLa cells invasion by the *spa32* mutant expressing InvJ from *Salmonella* or YscP from *Y. enterocolitica*. *Shigella* strains grown to log phase were incubated with HeLa cells culture (see *Experimental procedures*). After cells lysis, bacterial counting was performed by plating bacteria on plates containing selected antibiotics.

C and D. Histograms of needle length measurement and electron micrographs of Δ *spa32* complemented with InvJ or YscP producing normal needles. M, median of the lengths (nm); N, number of needles measured. Scale bars, 50 nm.

E. InvJ and YscP interact with Spa40. Soluble *E. coli* extracts producing YscP-His and InvJ-His were incubated with GST-Spa40CT or GST alone bound to glutathione sepharose. Analysis of eluted fractions (EF) separated on SDS-PAGE was done by Coomassie blue staining (upper part) or by probing with a Mab anti-His (lower part).

FliK fused to the YscP ruler domain that produced elongated needle or hook substructures. Thus, in contrast to Spa32 and probably to FliK, YscP functions as a molecular ruler because of the presence of its ruler domain (Journet *et al.*, 2003).

In a previous work by Shibata *et al.* (2007), it was reported that FliK contains three ruler domains, which are dispensable for its function (Fig. 1S). When compared with Spa32, one of these FliK domains that match the region deleted in D3 variant remains functional. However, in contrast to FliK, D5 and D6 variants deleted from the

sequence that match the two other ruler domains of FliK abolished Spa32 function (Figs. 2 and 1S). We conclude that despite their similarity, both Spa32 and FliK proteins might have their own functional specificity within their corresponding T3SS.

We identified a molecular interaction between Spa32, InvJ or YscP and the soluble cytoplasmic domain of Spa40, a well-conserved inner-membrane T3S component whose crystal structure was recently reported (Deane *et al.*, 2008). To our knowledge, this is the first report of such an interaction in the T3SS besides the

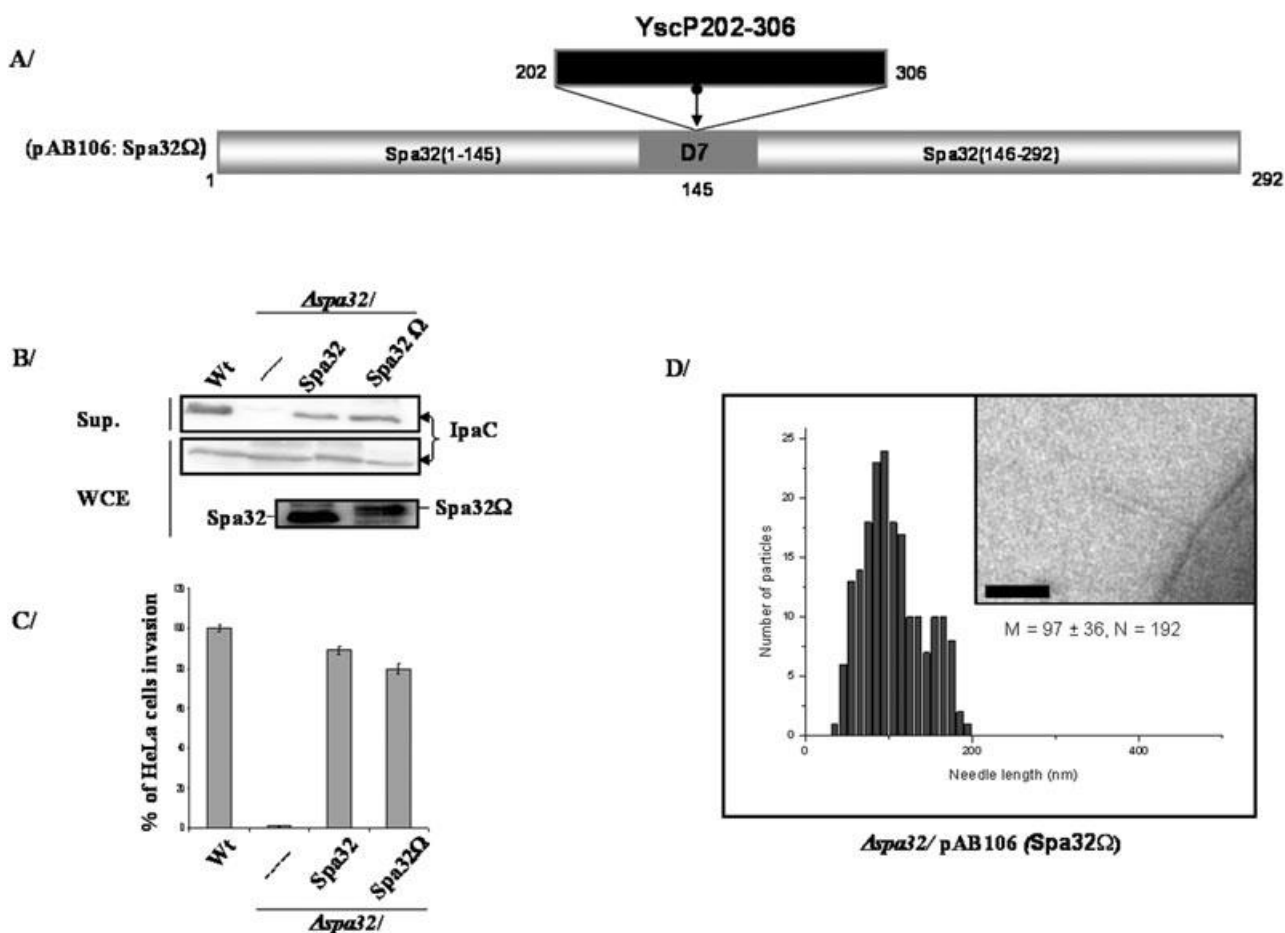


Fig. 7. The insertion of the ruler domain of YscP within Spa32 enhances needle length but does not affect secretion and HeLa cells invasion. A. Schematic representation of the plasmid pAB106 encoding Spa32Ω: the ruler domain of YscP (black box) from residues 202–306 was inserted in-frame between residues 145 and 146 of Spa32.

B. Bacteria strains: wild-type, $\Delta spa32$ alone or complemented either with the unmodified Spa32 or Spa32Ω were grown to log phase, centrifuged and the pellet was incubated with Congo red to induce proteins secretion via the T3SA (see *Experimental procedures*). Whole-cell extract and secreted proteins were then separated on SDS-PAGE and immunoblotted using an anti-IpaC Mab or an anti-Spa32 polyclonal antibodies.

C. HeLa cells invasion by the *spa32* mutant expressing Spa32Ω. *Shigella* strains grown to log phase were incubated with HeLa cells culture (see *Experimental procedures*). After cells lysis, bacterial counting was performed by plating bacteria on plates containing selected antibiotics.

D. Histograms of needle length measurement and electron micrographs of $\Delta spa32$ complemented with Spa32Ω making slightly elongated needles. M, median of the lengths (nm); N, number of needles measured. Scale bars, 50 nm.

flagellum. Several studies have reported the importance of the FliK/FliH interaction in mediating the switch in substrate specificity (from hook protein to flagellin) upon completion of hook assembly (Minamino and Macnab, 2000). Comparatively, in *Yersinia*, there is indirect evidence that suggests a dual role for YscP/YscU, in the switch from the needle YscF secretion to that of Yops (Edqvist *et al.*, 2003). Taking advantage of truncated Spa32 variants, we identified the Spa32 domain required for Spa40 binding, which is located between residues 206 and 246. Interestingly, protein D11, lacking residues 206–246, was not functional, suggesting that the Spa32/Spa40 interaction is crucial for the switch from MxiH to Ipa proteins secretion. Sequence analysis revealed that residues

206–280, encompassing the Spa40 interaction domain, share features with the previously described T3S4 switch domain of YscP and FliK (Agrain *et al.*, 2005; Minamino *et al.*, 2006; Fig. 8; data not shown). FliK variants, lacking the T3S4, were not able to interact with FliH_c and were not functional (Minamino *et al.*, 2004). Thus, one could consider that Spa32's binding to Spa40 may serve to regulate the conformation of Spa40CT in the cytosol of the bacterial cell. Likewise, the controlled switch in the flagellum system is believed to be mediated by conformational changes in the structure of FliH_c.

Spa32 variants such as D1, D2 and D4, which still contain the T3S4 domain, were not functional. This contrasts with reported data on YscP variants harbouring

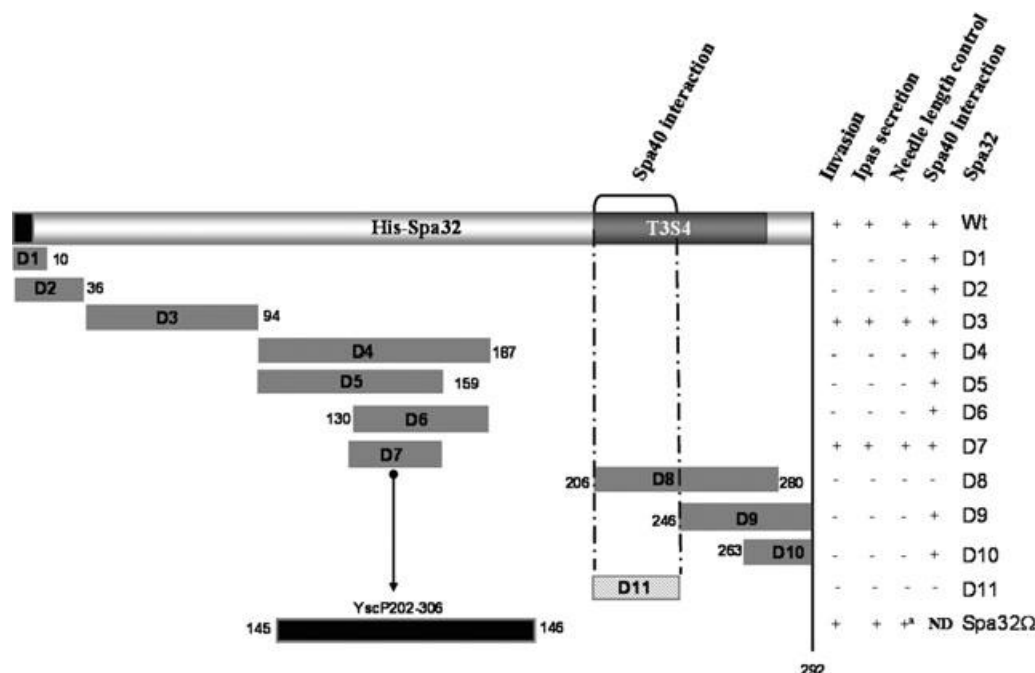


Fig. 8. Summary of the phenotypes obtained with His-Spa32 derivatives. All His-Spa32 variants (D1 to D11) were tested for their ability to restore the capacity of the $\Delta spa32$ mutant: (i) to invade HeLa cells; (ii) to secrete the Ipa proteins; (iii) to control the needle length; and (iv) to interact with the T3S component Spa40. The symbol '+' indicates restoration and '-' indicates that the variants do not restore the studied phenotypes. ND, not tested. Residues 260–280 of Spa32 share features of the type III secretion switch domain also called T3S4, which is conserved in YscP and FliK homologues. Dashed box, which is part of the T3S4, represents the identified Spa32 minimal domain required for Spa40 binding. Dark Box represents the YscP's ruler domain that was inserted between residues 145 and 146. *The length of the needle is doubled in the $\Delta spa32$ mutant expressing Spa32 Ω (97 versus 45 nm in the wild-type strain).

each the T3S4 domain, which were still able to switch to Yop secretion even though they have lost their capacity to control the YscF needle length (Agrain *et al.*, 2005). Here, we demonstrate that needle length control and the switch to Ipa proteins secretion are coupled in *Shigella*, similar to hook control by FliK (Williams *et al.*, 1996). Accordingly, our data are most likely in agreement with the molecular tape measure model previously reported for FliK (Moriya *et al.*, 2006), rather than the molecular ruler model of YscP (Journet *et al.*, 2003). When FliK_N is within the central channel of the growing hook-basal body structure, it temporarily binds to the hook-cap. Secretion is then paused to allow FliK_C to interact with FlhB_C, altering the export specificity from hook to filament. When the hook is very short, FliK_C is not in close proximity to FlhB_C during the secretion pause, and a successful interaction does not occur efficiently. In contrast, when the hook length is within the pre-set range, FliK_C is in the correct position to interact with FlhB_C, causing its conformational change that results in the switch of export specificity. According to this model, Spa32 molecules deleted in the N-terminus domain (D1 and D2), lacking the T3S signal, are probably no longer able to interact with other T3S components required for Spa32 export to the bacterial surface. Likewise, Spa32 variants with deletions of the C-terminal domain (D9 and D10) are not well placed in the needle

and so cannot interact at the right time with Spa40CT, even if the Spa32 domain that interacts with Spa40 is physically present. Consequently, D1, D2, D9 and D10 mutants still produce very long needles and do not switch from MxiH to Ipa proteins secretion. Proteins D8 and D11 are probably correctly placed in the needle structure but they lack the Spa40 interaction domain so, in this way, they also cannot switch to Ipa secretion. Proteins D4, D5 and D6 were not functional, although they do contain the C- and N-terminus domains as well as the Spa40 interacting domain. We hypothesize that two additional domains of Spa32, corresponding to residues 94–130 and 159–187, might be required for an additional Spa32 function, probably by an interaction with other as yet unidentified T3S components. Lastly, proteins D3 and D7, which remain fully functional, have the two anchors points, the 94–130 and 159–187 domains, and the entirety of the T3S4 domain to enable them to interact with Spa40.

In conclusion, our results indicate that Spa32 does not serve as a molecular ruler in determining the length of the needle. It appears instead that Spa32 may function as a molecular tape measure. Because deletions affecting both N- and C-termini of Spa32 lead to a loss of length control, we hypothesize that the two ends of Spa32 act as anchors. One end of Spa32 would be attached to the basal body, probably by its interaction with Spa40, leading

to the formation of the socket and the other end would be connected to the growing tip of the needle. As Spa40/Spa32, YscU/YscP, SpaS/InvJ and FlhB/FlhK protein pairs have counterparts in all bacteria with flagella and/or T3SSs, one can consider that mechanisms involved in regulation of inducible secretion, hook length control, and switching to filament assembly share common regulatory pathways.

Experimental procedures

Bacterial strains and growth media

Shigella flexneri strains are derivatives of the wild-type strain M90T (serotype 5) (Allaoui *et al.*, 1992). The M90T-Sm (Sm^r) and the *spa32* mutant ($\Delta spa32$) have been described previously (Allaoui *et al.*, 1992; Magdalena *et al.*, 2002). *Escherichia coli* strains are K-12 strain derivatives. The M15 strain harbouring the pREP4 plasmid was transformed with pQE30 derivatives. Bacteria were grown in tryptic casein soy broth (TSB) (Sigma) at 37°C. Antibiotics were used at the following concentrations: ampicillin 100 µg ml⁻¹, kanamycin 50 µg ml⁻¹, streptomycin 100 µg ml⁻¹ and gentamicin 50 µg ml⁻¹.

Plasmids construction

Deletions were generated by inverse polymerase chain reaction (iPCR) using the pMJ8 (pQE30-Spa32; Magdalena *et al.*, 2002) plasmid as template, followed by a ligation. pMJ8 derivatives carrying deletion mutations on *his-spa32* gene are listed in Table S1. Primers used in this study are listed in Table S2. pMJ8 derivatives were first checked by DNA restriction analysis and all *spa32* deletions were further confirmed by DNA sequencing. Production of pMJ8 derivatives plasmid encoding His-Spa32 (full or truncated proteins) was checked by immunoblot using the His-tag monoclonal antibody. pMJ8 derivatives were further introduced into $\Delta spa32$ to study the virulence properties of the resulting strains. Plasmid pDR1 expressing the *Salmonella* InvJ protein was constructed by cloning *EcoRI*-*SmaI* *invJ* PCR DNA digested product, obtained using InvJs and InvJas primers, into the corresponding sites of pTZ18 vector. Plasmid pAB75 expressing YscP from *Yersinia enterocolitica* was constructed by cloning *EcoRI*-*SmaI* *yscP* PCR DNA digested product, obtained using YscP1s and YscPas primers, into the corresponding sites of the pTZ18 vector. In both pDR1 and pAB75, the constitutive expression of InvJ and YscP is under the control of the *plac* promoter of the vector. Plasmid pAB106 was constructed by inserting in-frame a 312 bp PCR DNA fragment encoding residues 202–306 of YscP between residues 145 and 146 of Spa32 (Fig. 7). This plasmid encodes the chimerical Spa32_{1–145}YscP_{202–306}Spa32_{146–292} protein also called Spa32Ω. Plasmids pAB103 and pAB104 expressing His-YscP and His-InvJ were constructed by inserting *his-yscP* and *his-invJ* PCR DNA fragments into pTZ18R vector. Plasmids pCAK-P and pCAK-J expressing YscP-His and InvJ-His were constructed by inserting *yscP* and *invJ* PCR DNA fragments into pQE60 expression vector.

Plasmid pAB51, expressing GST-Spa40CT, was constructed by inserting a 411 bp *Bam*HI-*Sall* PCR DNA frag-

ment (obtained using primers Spa40–15 and Spa40–16) into the corresponding sites of pGEX4T1. In pAB51, the GST was inserted in-frame with the last 137 C-terminus residues of Spa40.

Proteins preparation and analysis

Crude extracts and concentrated culture supernatants of *S. flexneri* strains were prepared as described (Allaoui *et al.*, 1993; Magdalena *et al.*, 2002) and analysed by SDS-PAGE stained with Coomassie blue or Western blot. Briefly, overnight cultures at 37°C were diluted to an OD₆₀₀ of 0.02 in 10 ml TSB and grown at 37°C to an OD₆₀₀ of 2. The culture supernatant was discarded by centrifugation (10 000 g for 10 min) and bacterial pellets were re-suspended in 500 µl of PBS containing 100 µg of Congo red (Serva) and incubated at 37°C for 15 min to induce Ipa proteins secretion. Immunodetections were carried out using monoclonal antibodies anti-IpaB (Barzu *et al.*, 1993), anti-IpaC (Phalipon *et al.*, 1992), and anti-His (Sigma) and polyclonal antibodies anti-Spa32 (Magdalena *et al.*, 2002), anti-IpaD (Menard *et al.*, 1993) and anti-GST (Amersham).

GST pull-down assay

The GST-Spa40CT derivatives bound to glutathione sepharose 4B (50 µl) were mixed with cleared extract of $\Delta spa32$ strain harbouring pMJ8 (expressing His-Spa32) or with ammonium sulphate precipitated culture supernatant proteins prepared from wild-type *S. flexneri* and incubated overnight at 4°C. Supernatants were removed by centrifugation and beads were washed with bead-binding buffer (1% Triton X-100 in Tris-buffered saline, pH 7.4) four times. After the final wash, elution was performed with 40 µl of glutathione and 10 µl of SDS-PAGE sample buffer was added to each sample. Bound proteins were analysed by immunoblotting using anti-His Mab, and polyclonal antibodies against Spa32 and IpaD (Ménard *et al.*, 1993; Magdalena *et al.*, 2002).

Invasion assay

The gentamicin protection assay to assess bacterial invasion in HeLa cells was described previously (Sansone *et al.*, 1986). Briefly, 2 ml of wild-type *Shigella* or $\Delta spa32$ mutant (Magdalena *et al.*, 2002) either alone or complemented with plasmids producing His-Spa32, wild-type or variants, was grown to exponential growth phase (OD₆₀₀ = 0.4) and centrifuged onto plates containing 2×10^5 HeLa cells at 2000 g for 10 min. After 1 h incubation at 37°C, cells were washed three times with 2 ml EBSS and incubated during 1 h with the 2 ml MEM milieu containing gentamicin at 50 µg ml⁻¹ final concentration. After three washes with 2 ml EBSS, plates were incubated for 15 min with a solution of desoxycholate 0.5% to allow cells lysis. Bacterial solutions were then diluted and plated on agar plates containing selective antibiotics for colony-forming unit counting.

Electron microscopy analysis

The various strains expressing different *spa32* deletion genes were grown overnight in TSB supplemented with kana-

mycin (50 µg ml⁻¹) at 30°C to an optical density (OD) of 1.3 at 600 nm. The strains were diluted to OD₆₀₀ of 0.1 and grown for a further 4 h at 37°C. Cultured cells were harvested at 2000 *g* and re-suspended in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). Bacteria samples were applied to freshly glow-discharged carbon-coated grids and negatively stained with 2% (w/v) uranylacetate. Visualization of the cells was performed on a Philips CM120FEG operating at 120 kV. Images were recorded with a Gatan 4000 SP 4K slow-scan CCD camera at various magnifications. Needle sizes were measured with the 'Groningen Image Processing' software packages (W. Keegstra, unpublished).

Acknowledgements

This study was supported in part by grants from the Belgian FRSM (Fonds National de la Recherche Scientifique Médicale, Convention: 3.4623. 06). A.B. was supported by a fellowship from Fonds National de la Recherche Industrielle et Agronomique (Belgium). Part of this work was supported by grants from the Fonds of Emile Defay (ULB) and from the Alice and David Van Buuren foundation (ULB). We thank A. Marty for critical reading of this manuscript and R. Dagci for technical assistance.

References

- Agrain, C., Callebaut, I., Journet, L., Sorg, I., Paroz, C., Mota, L.J., and Cornelis, G.R. (2005) Characterization of a Type III secretion substrate specificity switch (T3S4) domain in YscP from *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **56**: 54–67.
- Allaoui, A., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (1992) MxiJ, a lipoprotein involved in secretion of *Shigella* Ipa invasins, is homologous to YscJ, a secretion factor of the *Yersinia* Yop proteins. *J Bacteriol* **174**: 7661–7669.
- Allaoui, A., Menard, R., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (1993) Characterization of the *Shigella flexneri* *ipgD* and *ipgF* genes, which are located in the proximal part of the *mxi* locus. *Infect Immun* **61**: 1707–1714.
- Barzu, S., Nato, F., Rouyre, S., Mazie, J.C., Sansonetti, P., and Phalipon, A. (1993) Characterization of B-cell epitopes on IpaB, an invasion-associated antigen of *Shigella flexneri*: identification of an immunodominant domain recognized during natural infection. *Infect Immun* **61**: 3825–3831.
- Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Niebuhr, K., Cabiaux, V., Parsot, C., and Sansonetti, P. (1999) The tripartite type III secretin of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J Cell Biol* **147**: 683–693.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., *et al.* (2001) Structure and composition of the *Shigella flexneri* 'needle complex', a part of its type III secretin. *Mol Microbiol* **39**: 652–663.
- Cornelis, G.R. (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**: 811–825.
- Deane, J.E., Graham, S.C., Mitchell, E.P., Flot, D., Johnson, S., and Lea, S.M. (2008) Crystal structure of Spa40, the specificity switch for the *Shigella flexneri* type III secretion system. *Mol Microbiol* **69**: 267–276.
- Edqvist, P.J., Olsson, J., Lavander, M., Sundberg, L., Forsberg, A., Wolf-Watz, H., and Lloyd, S.A. (2003) YscP and YscU regulate substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system. *J Bacteriol* **185**: 2259–2266.
- Espina, M., Olive, A.J., Kenjale, R., Moore, D.S., Ausar, S.F., Kaminski, R.W., *et al.* (2006) IpaD localizes to the tip of the type III secretion system needle of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* **74**: 4391–4400.
- Galan, J.E., and Wolf-Watz, H. (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**: 567–573.
- Hale, T.L. (1991) Genetic basis of virulence in *Shigella* species. *Microbiol Rev* **55**: 206–224.
- Hirano, T., Yamaguchi, S., Oosawa, K., and Aizawa, S. (1994) Roles of FlhK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**: 5439–5449.
- Hueck, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379–433.
- Journet, L., Agrain, C., Broz, P., and Cornelis, G.R. (2003) The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* **302**: 1757–1760.
- Kimbrough, T.G., and Miller, S.I. (2000) Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11008–11013.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., *et al.* (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**: 602–605.
- Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S.I., and Galan, J.E. (2000) Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 10225–10230.
- Magdalena, J., Hachani, A., Chamekh, M., Jouihri, N., Gounon, P., Blocker, A., and Allaoui, A. (2002) Spa32 regulates a switch in substrate specificity of the type III secretin of *Shigella flexneri* from needle components to Ipa proteins. *J Bacteriol* **184**: 3433–3441.
- Makishima, S., Komoriya, K., Yamaguchi, S., and Aizawa, S.I. (2001) Length of the flagellar hook and the capacity of the type III export apparatus. *Science* **291**: 2411–2413.
- Marlovits, T.C., Kubori, T., Lara-Tejero, M., Thomas, D., Unger, V.M., and Galán, J.E. (2006) Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature* **441**: 637–640.
- Menard, R., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (1993) Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J Bacteriol* **175**: 5899–5906.
- Minamino, T., and Macnab, R.M. (2000) Domain structure of *Salmonella* FlhB, a flagellar export component responsible for substrate specificity switching. *J Bacteriol* **182**: 4906–4914.
- Minamino, T., and Pugsley, A.P. (2005) Measure for measure in the control of type III secretion hook and needle length. *Mol Microbiol* **56**: 303–308.
- Minamino, T., Saijo-Hamano, Y., Furukawa, Y., Gonzalez-Pedrajo, B., Macnab, R.M., and Namba, K. (2004) Domain

- organization and function of *Salmonella* FliK, a flagellar hook-length control protein. *J Mol Biol* **341**: 491–502.
- Minamino, T., Ferris, H.U., Moriya, N., Kihara, M., and Namba, K. (2006) Two parts of the T3S4 domain of the hook-length control protein FliK are essential for the substrate specificity switching of the flagellar type III export apparatus. *J Mol Biol* **362**: 1148–1158.
- Moriya, N., Minamino, T., Hughes, K.T., Macnab, R.M., and Namba, K. (2006) The type III flagellar export specificity switch is dependent on FliK ruler and a molecular clock. *J Mol Biol* **359**: 466–477.
- Mota, L.J., Journet, L., Sorg, I., Agrain, C., and Cornelis, G.R. (2005) Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science* **307**: 1278.
- Parsot, C., Ageron, E., Penno, C., Mavris, M., Jamoussi, K., d'Hauteville, H., *et al.* (2005) A secreted anti-activator, OspD1, and its chaperone, Spa15, are involved in the control of transcription by the type III secretion apparatus activity in *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* **56**: 1627–1635.
- Phalipon, A., Arondel, J., Nato, F., Rouyre, S., Mazie, J.C., and Sansonetti, P.J. (1992) Identification and characterization of B-cell epitopes of IpaC, an invasion-associated protein of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* **60**: 1919–1926.
- Sani, M., Botteaux, A., Parsot, C., Sansonetti, P., Boekema, E.J., and Allaoui, A. (2007a) IpaD is localized at the tip of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus. *Biochim Biophys Acta* **1770**: 307–311.
- Sani, M., Allaoui, A., Fusetti, F., Oostergetel, G.T., Keegstra, W., and Boekema, E.J. (2007b) Structural organization of the needle complex of the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Micron* **38**: 291–301.
- Sansonetti, P.J., Ryter, A., Clerc, P., Maurelli, A.T., and Mounier, J. (1986) Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infect Immun* **51**: 461–469.
- Shibata, S., Takahashi, N., Chevance, F.F., Karlinsey, J.E., Hughes, K.T., and Aizawa, S. (2007) FliK regulates flagellar hook length as an internal ruler. *Mol Microbiol* **64**: 1404–1415.
- Tamano, K., Katayama, E., Toyotome, T., and Sasakawa, C. (2002) *Shigella* Spa32 is an essential secretory protein for functional type III secretion machinery and uniformity of its needle length. *J Bacteriol* **184**: 1244–1252.
- West, N.P., Sansonetti, P., Mounier, J., Exley, R.M., Parsot, C., Guadagnini, S., *et al.* (2005) Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS. *Science* **307**: 1313–1317.
- Williams, A.W., Yamaguchi, S., Togashi, F., Aizawa, S.I., Kawagishi, I., and Macnab, R.M. (1996) Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **178**: 2960–2970.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

1.3. Etude des protéines Spa24, Spa9 et Spa29

L'étude de la fonction des gènes *spa24*, *spa9*, et *spa29* dans la virulence de *Shigella flexneri* fait l'objet d'un article en préparation en tant que premier auteur : **“Contribution of *Shigella flexneri* type III conserved cytoplasmic domain of Spa24 to needle complex formation”**. Aimé Christian Kayath, Abdelmoughit Kaoukab-Raji, Abderrahman Hachani, Latefa Biskri, Abdelmounaïm Allaoui and Anne Botteaux. *Microbiology*. (2010)

Les gènes *spa24*, *spa9*, et *spa29* n'ont jamais fait l'objet d'une étude individuelle. Nous avons inactivé ces gènes de manière non-polaire, par insertion d'une cassette *aphA-3* (conférant la résistance à la kanamycine) pour les gènes *spa24* et *-29*, ou pour le gène *spa9*, par insertion de la cassette *ble* (conférant la résistance à la zéocine).

L'analyse du phénotype des souches de *S. flexneri*, inactivés aux gènes *spa24*, *-9* et *-29*, indique que ces mutants sont incapables de sécréter *in vitro* les protéines Ipa/Ipg et qu'ils ont perdu leur capacité d'envahir des cellules cultivées *in vitro*. Nous avons démontré que la perte de la virulence de ces souches mutées était imputable à l'instabilité de la protéine MxiH, composant majeur de l'aiguille du SST3. Le phénotype de la souche sauvage a été restauré par l'introduction dans ces mutants de plasmides portant les gènes respectifs.

Par des expériences de co-purification, nous avons également identifié des partenaires d'interaction de Spa24 tels que MxiA_C, Spa40_C, Spa33, Spa47, MxiN, MxiK et Spa32. Spa9 interagit avec Spa40_C, MxiA_C, Spa33 et MxiN; et nous avons également montré que Spa29 interagit avec MxiA_C et MxiN.

La protéine Spa24 contient un domaine soluble de 80 résidus strictement conservés dans la famille de FliP. Afin de mieux caractériser le rôle de Spa24, nous avons effectué une série de délétions et de mutations dirigées de résidus situés dans son domaine soluble (Spa24_{SD}). Toutes les délétions touchant ce domaine affectent la sécrétion des protéines Ipa. De plus, Spa24_{SD} interagit avec MxiA_C, Spa40_C, Spa33, MxiN, MxiK et Spa32 mais pas avec Spa47. Nous avons également établi que Spa24_{SD} interagit avec les résidus 206 à 246 de Spa32.

Le fonctionnement du système de sécrétion nécessite l'assistance des chaperons cytoplasmiques. Quatre chaperons sont connus pour leur rôle dans la stabilisation des substrats du SST3 (IpgA, Spa15, IpgC et IpgE). Enfin, nous avons également montré que Spa24_{SD} n'interagit qu'avec Spa15 et non pas avec IpgA, IpgC ou IpgE. Ce résultat suggère l'implication de Spa24 dans la régulation postranscriptionnelle de l'assemblage et la sécrétion d'effecteurs.

Contribution of *Shigella flexneri* type III conserved cytoplasmic domain of Spa24 to needle complex formation

Christian Aimé Kayath[†], Abdelmoughit Kaoukab-Raji[†], Abderrahman Hachani^{†‡}, Latéfa Biskri, Abdelmounaaim Allaoui^{§*} and Anne Botteaux[§]

[†]: Laboratoire de Bactériologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles (ULB), Route de Lennik, 808, 1070, Bruxelles, Belgium.*: To whom correspondence should be addressed: aallaoui@ulb.ac.be, Phone: +32 2 555 6251; Fax: +32 555 6116. + Three authors are equal contributors. § Co-last author. [‡]Present address. Division of Cell and Molecular Biology, Imperial College London, Centre for Molecular Microbiology and Infection, South Kensington Campus, Flowers Building, SW7 2AZ London, UK.

Abstract

Type III secretion (T3S) systems play key roles in the assembly of flagella and the translocation of bacterial effectors into eukaryotic host cells. The build up of the basal structure of the T3S system, that spans both inner and outer bacterial membranes, is a carefully orchestrated multi-step process that requires the coordination of many conserved proteins. We studied three conserved proteins, termed Spa24, Spa9 and Spa29, predicted to reside in the inner membrane of *Shigella*. Spa24 contains a large 80 residues hydrophilic domain (Spa24_{SD}) predicted to reside in the cytoplasm. We show that Spa24_{SD} interacts with several T3S components including Spa40, Spa33, MxiN, MxiK, and MxiA. Spa24 interacts also with the needle length regulator Spa32 at residues 206 and 280. Genetic and functional analysis revealed the crucial role of residues F115, L138, P140 and A141 in Spa24 function. Lastly, Spa24_{SD} was found to interact with chaperone Spa15. Our results provide the first functional analysis of Spa24 homologous in the secretion process which will aid in elucidating the needle complex assembly process.

Introduction

Shigella flexneri invades colonic epithelial cells and causes bacillary dysentery, a severe form of gastroenteritis, which leads to over 1 million deaths per year worldwide (Kotloff *et al.*, 1999; Philpott *et al.*, 2000). The *Shigella* pathogenesis process requires a functional type III secretion system (T3SS) as well as many other gram-negative bacteria that are pathogens of mammals and plants (Hueck, 1998). T3SS is a major virulence device for invasion of, and dissemination within, the gut epithelial lining (Parsot, 2009) and is encoded by the *mxi* and *spa* genes localized on a 31-kb fragment of the virulence plasmid, pWR100 (Parsot, 2009; Buchrieser *et al.*, 2000). The region, necessary for entry of *S. flexneri* into epithelial cells, contains two sets of genes. The first one corresponds to the *mxi-spa* operon (Allaoui *et al.*, 1992; 1993; 1995; Parsot, 2009) and the second one corresponds to *ipa-ipg* locus which encodes secreted effectors such as IpaA, IpaB, IpaC, IpaD, IpgB1 and IpgD and their dedicated cytoplasmic chaperones IpgE, IpgC,

IpgE and Spa15 (Buchrieser *et al.*, 2000; Parsot, 2009). Contact of the bacterium with the host cell membrane induces the activity of the Mxi-Spa T3SS (Ménard *et al.*, 1994), which leads to insertion of the IpaB and IpaC (named the translocators) into the cell wall. These two proteins form a 25 Å pore (Blocker *et al.*, 1999) used for translocation of effectors directly into the host cell cytoplasm to modulate cell signaling and allow entry of *Shigella* (Bourdet-Sicard *et al.*, 1999; Niebuhr *et al.*, 2000). Among the battery of T3SA substrates, three classes can be defined based on their order of transit through the T3SA: first, the needle subunits, MxiH and MxiI, then the translocators IpaB, IpaC and IpaD and, finally late effectors such as IpgB1, IpgB2, IpgD and IpaA (Botteaux *et al.*, 2009). The first switch in secretion from needle subunits to translocators is regulated by the Spa32 protein (Magdalena *et al.*, 2002).

Nonflagellar T3S systems are encoded by 20-25 genes (Parsot, 2009). Many structural components are conserved among pathogenic and symbiotic bacteria and are strictly required to build up a functional secretion system. Nine components of the apparatus are conserved

between nonflagellar T3SS and the flagellar export apparatus (He et al., 2004; Nguyen et al., 2000). The broadly conserved proteins are believed to localize in the cytoplasm or constitute the inner ring structure of the secretion apparatus. Among them six integral membrane proteins constitute the inner core of the T3SA which probably acts as a secretion pore (Aizawa, 2001; Pühler et al., 2004; Tampakaki et al., 2004). The flagellar counterparts of five of them FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ and FliR have been shown to constitute the flagellar export apparatus (Fan et al., 1997; Minamino & Macnab, 2000). The related nonflagellar T3S proteins also show manifold interactions with each other, thus suggesting similar multiprotein complexes for flagella and nonflagellar T3SS (Creasey et al., 2003). This conclusion is supported by low-resolution electron microscopy which demonstrated that the morphology of the nonflagellar T3SA is remarkably similar to that of the flagellar hook-basal body complex (Kubori et al., 1998; Sekiya et al., 2001 et Tammano et al., 2000).

Electron microscopy analysis revealed that the T3SA of the *Shigella* is composed of three parts; an internal cytoplasmic bulb, a transmembrane domain, and an external needle (Blocker et al., 1999; 2001). The transmembrane domain is made of two pairs of rings, the first one in the inner membrane is composed of MxiG and MxiJ proteins and is supposed to be linked to the cytoplasmic bulb by interacting with the soluble component Spa33 (Morita-Ishara et al., 2006). The proteins that constitute the bulb are very well conserved between different T3SSs and the flagellar export apparatus. These include, the ATPase Spa47 and integral inner-membrane proteins Spa9, Spa24, Spa29, Spa40 and MxiA (Blocker et al., 2003, Aizawa et al., 2001). Spa40 and MxiA family of proteins contain large cytoplasmic domains that take part to the needle complex assembly (Botteaux et al., 2010). MxiK and MxiN, the ATPase co-factors, are required for the transit of MxiH and MxiI, the needle major components; through the basal body (Jouihri et al., 2003). In *Shigella* the needle is made up by a helical arrangement of MxiH and is controlled at ~50 nm in length by Spa32 (Magdalena et al., 2002; Blocker et al., 1999, 2001; Cordes et al., 2003). Comparatively, in the

flagellar system free associated cytoplasmic proteins such as FliH, FliJ and the ATPase FliI were extensively studied (Macnab, 2003).

Here we studied the role of the three *Shigella* contiguous genes *spa24*, *spa9* and *spa29* in the assembly of the T3S apparatus which are well conserved with the *fliP*, *fliQ* and *fliR* flagellar genes, with the *spaP*, *spaO* and *spaR* of the T3SS-SPI.1 of *Salmonella* (Collazo and Galan, 1996); with the *yscR*, *yscS*, and *yscT* of *Yersinia*. The three proteins are predicted to form a universal structure for membrane channeling (Aizawa et al., 2001).

In silico analysis revealed that Spa24 contains a signal peptide followed by four predicted transmembrane (TM) domains. Spa24 contains a notable internal large hydrophilic domain of 80 residues predicted to be lied into cytoplasm (Spa24_{SD}) (Fig. 2a). The latter contains a coiled-coil domain, suggesting its implication in protein-protein interaction during the assembly of the basal body structure. Beside, Spa9 and Spa29 are integral membrane proteins with two and six predicted TM domains, respectively. While the role of Spa9,24 and 29 in Ipa proteins secretion has been genetically proven (Sasakawa et al., 1993), their implication in the secretion process remains poorly understood. In this study, we investigated their molecular role in the assembly/function of the T3SA with a special focus on Spa24.

Methods

Media and growth conditions

S. flexneri strains are derivatives of the wild-type strain M90T (serotype 5) (Sansonet et al., 1982). The M90T-Sm (Sm^r) has been described previously (Allaoui et al., 1992). *Escherichia coli* strains are derivatives of K-12 strain; the Top10 and BL21 strains were transformed with pQE30, pBAD18 or pGEX4T1 derivatives; DH5 α (λ pir) was transformed with derivatives of the suicide vector pGP704, and SM10- λ pir was used to transfer derivatives of pGP704 to *S. flexneri*. Bacteria were grown in tryptic soy broth (TSB) at 37°C (Merck). Antibiotics were used at the following concentrations: ampicillin; 100 μ g ml⁻¹, kanamycin; 50 μ g ml⁻¹, and streptomycin; 100 μ g ml⁻¹.

Construction of the *spa24*, *spa9*, *spa29* null strain

All non-polar mutants were constructed by allelic exchange of wild-type gene carried by pWR100 with a muted gene cloned into a suicide vector (pGP704). Genes of interest were disrupted by the non-polar zeocin cassette (*ble*) or *aphA-3* cassette (Botteaux *et al.*, 2008; Ménard *et al.*, 1993). In each case, the mutator plasmid was transferred to *S. flexneri* M90T-Sm by conjugal mating and transconjugants were selected on plates containing either streptomycin and zeomycin or streptomycin and kanamycin (Table 1). Clones in which a double recombination event had exchanged the wild-type gene by the inactivated gene harboured by mutators suicide vectors (pHA8: *spa24::aphA3*; pHA10: *spa29::aphA3*; pHA17: *spa9::ble*) (Table 1) were identified by screening for ampicillin sensitivity and further confirmed by PCR. For the construction of a non-polar mutant of *spa24* and *spa29*, we used the *aphA-3* cassette (Ménard *et al.*, 1993) while the *ble* cassette encoding resistance to zeocin was used to inactivate *spa9* (Botteaux *et al.*, 2009). In *spa24*, *spa9* mutants, codons 41 to 216, 37 to 66 were deleted respectively while in *spa29* mutant, Spa29 was interrupted at residues 53.

Construction of plasmids

Plasmids and primers used in this study are listed in Table I and II. *spa24*, *spa9* and *spa29*, *spa33* DNA fragments were amplified from pWR100 (virulence plasmid of *Shigella flexneri* 5) by PCR using PrimeSTAR DNA polymerase (Takara), digested by *Bam*HI and *Xho*I and inserted into the corresponding sites of pGEX-4T-1 vector. The resulting plasmids were named pCAK50 (GST-Spa9), pCAK67 (GST-Spa29), pCAK71 (GST-Spa24_{ASP}: GST fused to Spa24 deleted from its signal sequence), and pCAK77 (GST-Spa24_{SD}: GST fused to residues 73 to 154 that constitute the large cytoplasmic domain of Spa24 (see Table 1). Plasmids pHA9 (Spa24), pCAK90, pCAK91, pCAK92, pCAK93, pCAK94, pCAK95 were used for the complementation of the *spa24* mutant. Plasmids pHA12 (Spa29) and pHA18 (Spa9) were used to complement the *spa29* and *spa9* mutants,

respectively. Substitutions of residues: F115L, L138R, P140S, and A141V in Spa24_{SD} were made on plasmid pHA9 or pCAK98. Site-directed mutagenesis was carried out according to the procedure of the Quick Change Mutagenesis Kit (Stratagene). A restriction site was created in each couple of primers (see Table 1S) to confirm introduced mutations. Deletions of soluble domain (SD) and each of the four helices (H1, H2, H3, H4) were generated by inverse polymerase chain reaction (iPCR) using plasmid pAH9 as a template. The resulting plasmids were confirmed by DNA sequencing and were named pCAK101 through pCAK108.

Expression and purification of GST-hybrid proteins

For purification of GST fusion proteins, an overnight culture of *E. coli* BL21 strain carrying pKAC50, pKAC66, pKAC67, pKAC68, pKAC69, pKAC71, pKAC72, or pKAC82, was subcultured 1:100 into 300 ml of L-broth and grown with vigorous shaking (180 rpm) at 37°C until an optical density at 600 nm of 0.6 is reached. IPTG was then added at 0,2 mM final concentration, and bacterial growth was continued for additional 4 h. Cells were harvested by centrifugation and pellets were thawed on ice, resuspended in 10 ml of lysis buffer (50 mM sodium phosphate, pH 7,5, NaCl 250 mM, glycerol 20%), sonicated, and centrifuged at 6,000 × g to pellet unbroken cells and inclusion bodies. The supernatant was then centrifuged at 100,000 × g for 1h30 min. Pellets (crude membrane fractions) were retained and resuspended by homogenization in 10 ml of solubilization buffer PBS with Triton X-100 2% (vol/vol). The suspension was stirred at 4°C for 1 h and then subjected to centrifugation at 100,000 × g for 45 min. This solubilized membrane fraction was retained as the supernatant.

Cell lysates preparation of His-tagged proteins

E. coli Top10, BL21 or M15, harbouring the pBADhisA::mxIAc or pBADhisB::spa47 or pBAD::spa33-mycA-his or pQE30::spa40c, pQE30::mxIN, pQE30::spa15, pQE30::mxIK, were cultured in L-broth with 100 µg/ml of ampicillin for 2 h at 37°C. Arabinose (0.2%) or IPTG (0,1 mM) was then added and growth at 37°C was continued for additional 4 h. Bacteria

were then harvested, the pellet collected and sonicated in 4 ml of PBS, pH 7.4. Lysates (whole cell extract) were then centrifuged at 6,000 x g for 15 min at 4 °C, unbroken cells were discarded and the supernatants were collected for GST pull-down assay.

GST Pull-down Assay

GST-fused proteins bound to 50 µl of glutathione-Sepharose 4B beads were mixed, during 1 h at room temperature, with a cleared extracts prepared from *E.coli* strains (BL21 or Top10) expressing: Spa33-His, His-Spa40_{CT}, His-MxiA_C, His-Spa47, His-MxiN, His-MxiK, His-Spa15, His-IpgE, His-IpgA, His-IpgC. Supernatants were removed by centrifugation, and beads were washed ten times with PBS, pH 7.4. After the final wash 50 µl of L- glutathione was used to elute GST-fused proteins. 10 µl of each samples were analysed by SDS-PAGE stained with Coomassie-blue or immunoblotted using anti-GST or anti-His, antibodies.

Proteins analysis

Crude extracts and culture supernatants of *S. flexneri* strains were prepared as described (Allaoui *et al.*, 1993 and Botteaux *et al.*, 2008) and analysed by SDS-PAGE and immunoblotting using antibodies against: MxiH (Jouihri *et al.*, 2003); IpaB (Barzu *et al.*, 1993) and IpaC (Phalipon *et al.*, 1992).

Results

spa24, *spa9* and *spa29* mutants are defectives in Ipas secretion

To assess the individual role of *spa24*, *spa9* and *spa29* in secretion, we inactivated these three genes in the *S. flexneri* wild-type strain M90T (see Methods). To investigate the ability generated mutants to secrete IpaB and IpaC proteins, whole cell extracts and proteins secreted upon Congo red induction (Bahrani *et al.*, 1997) were analysed by Coomassie blue stained SDS-PAGE and by western blot using anti-IpaB and anti-IpaC monoclonal antibodies (Fig. 1a). IpaB and IpaC were secreted by the wild-type strain but not by the *spa24*, *spa9* or *spa29* mutants. The type III deficient secretion mutant *mxiD* mutant was used here as control. Similar amounts of IpaB and IpaC were detected

in whole cell extracts of all tested strains, indicating that the lack of secretion in the *spa24*, -9 and -29 mutant was not due to the absence of their production (Fig. 1c). IpaB and IpaC secretion was restored upon complementation of the *spa24*, *spa9*, and *spa29* mutants with plasmids pHA9 (Spa24), pHA12 (Spa9) and pHA18 (Spa29), respectively (Fig. 1a and Table 1).

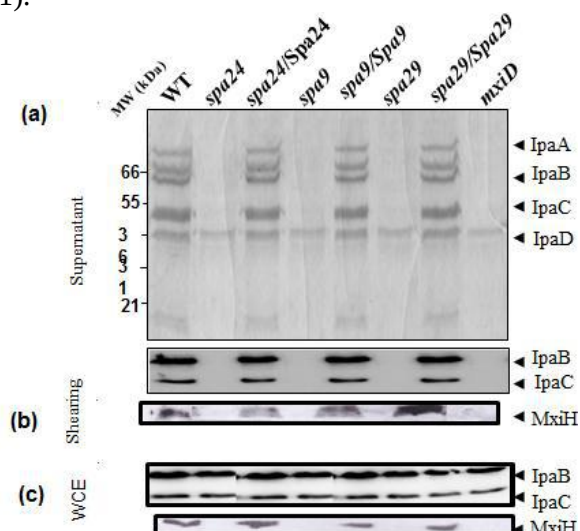


Fig. 1. *spa24*, *spa9* and *spa29* mutants are defectives in Ipas secretion and exhibit a needless structure. (a) Analysis of Ipa proteins secretion in the *spa24*, *spa9* and *spa29* mutants. Culture supernatants of *S. flexneri* wild-type strain M90T (WT), the *spa24*, *spa9* and *spa29* mutants, and mutants complemented with pAH9, pAH12 and pAH18 expressing native Spa24, Spa9 and Spa18, respectively, were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining or by immunoblotting using IpaB and IpaC monoclonal antibodies. (b) Secretion of MxiH was monitored by analyzing shearing fractions of the WT strains, the *spa24*, *spa9* and *spa29* mutants, and mutants complemented with pAH9, pAH12 and pAH18 by SDS-PAGE and immunoblot using anti-MxiH polyclonal antibodies. (c) Analysis of whole cell extract (WCE) of the WT strain, the *spa24*, *spa9* and *spa29* mutants, and the mutants complemented with pAH9, pAH12 and pAH18 by SDS-PAGE and immunoblot using antibodies against IpaB, IpaC and MxiH. The *mxiD* mutant was used as a control.

To further characterize the *spa24*, *spa9* and *spa29* mutants, production and secretion of the needle component MxiH were monitored by SDS-PAGE and immunoblotting using anti-MxiH polyclonal antibodies. MxiH was detected in whole cell extracts of wild-type and complemented strains but not in the corresponding fractions of the three mutants

(Fig. 1c). In addition, no MxiH was detected in the shearing fractions of the three mutants (Fig. 1b), suggesting that the needle is not assembled. To confirm this result we investigated the T3SA structure of the *spa9*, 24 and 29 mutants upon extensive purified needle complexes (NCs) and transmission electron microscopy (TEM) analysis. The three mutants exhibit needleless structure since they all lack the needle portion (data not shown). Lastly, not surprisingly given, *spa24*, -9 and *spa29* mutants were unable to enter HeLa cells (data not shown) a phenotype that was restored upon complementation with plasmids encoding native Spa24, Spa9 or Spa29 protein (data not shown).

Mutational and functional analysis of the large cytoplasmic domain of Spa24 (Spa24_{SD})

Spa24 is a 216 amino acid long protein with four putative transmembrane domains. It contains a signal peptide. Using PredictProtein program (<http://www.predictprotein.org/>) (Fig. 2a), we identified four helices motifs in the soluble domain of Spa24 (called Spa24_{SD}) that are probably part of a coiled coil domain (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_for_m.html). To assess the individual role of these domains, we constructed five pHA9 derivatives producing Spa24_{Δ74-154} (deletion of residues 74-154 corresponding to the entire SD domain); Spa24_{Δ85-94} (Δ helix1: ΔH1); Spa24_{Δ99-106} (ΔH2); Spa24_{Δ111-119} (ΔH3); and Spa24_{Δ141-149} (ΔH4) (Fig. 2b) and performed complementation experiments. Spa24_{ΔSD} was no longer able to restore the secretion defect of the *spa24* mutant (Fig. 2c). Similarly, none of the four generated variants (ΔH1 to ΔH4) was able to restore the secretion defect of the *spa24* mutant. These results indicate that Spa24_{SD} plays a crucial role in secretion. We reasoned that deletion of several residues may affect the conformation of Spa24_{SD} and consequently the secretion function. Therefore, to overcome this limitation, we generated punctual mutation upon substitution of selected residues that are 100% conserved among all Spa24 homologous. Sequence alignment of members of Spa24 family including FlhR from the flagellum of *S. Typhimurium*; SpaP from Spa1.1 T3SS of *S. Typhimurium*; EscR/EsaR of Enteropathogen *E.coli*; YscR/YsaR T3SSs of *Y. enterocolitica*, pointed to a number of conserved

residues (Fig. 2b). The large cytoplasmic domain Spa24_{SD} is highly conserved among various T3S components (Fig. 2b). Notably, the motif LLPA and residues F115 are almost 100% conserved in all aligned proteins (Fig. 2b). To assess the role of these conserved residues on Spa24 function, we constructed four derivatives plasmids of pHA9 encoding Spa24F115L, -L138R, -P140S, and -A141V. Next, to test their ability to secrete IpaB and IpaC, plasmids expressing Spa24 variants were introduced in the *spa24* mutant. Our results show that the four generated mutations abolish IpaB and IpaC secretion without affecting their production (Fig. 2c).

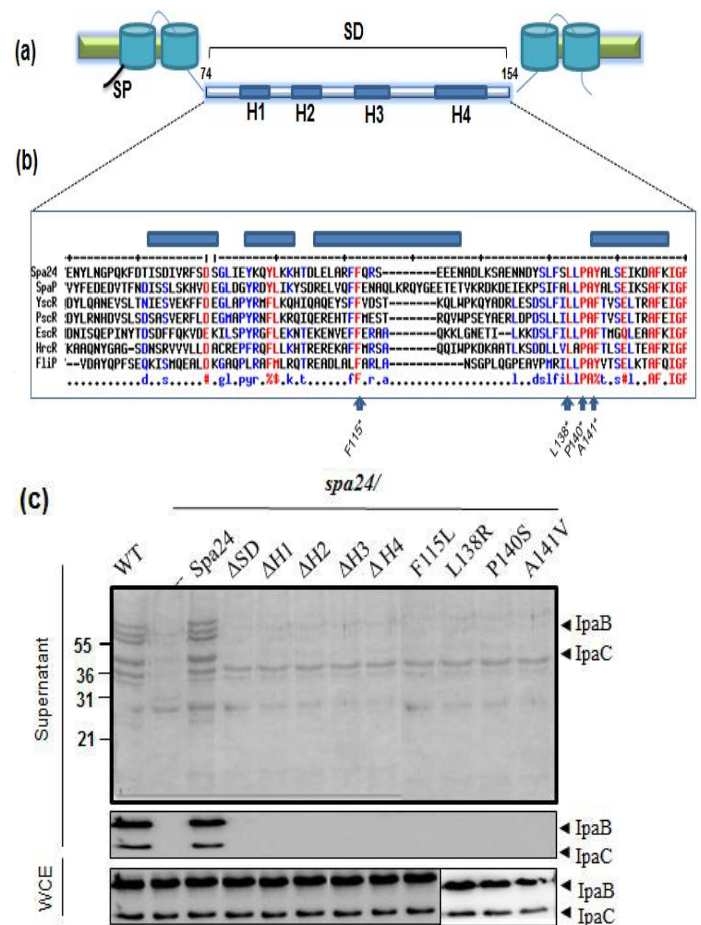


Fig. 2. Mutational and functional analysis of soluble domain of Spa24 (Spa24_{SD}). (a) Schematic representation of the topology of Spa24 based on *in silico* analysis (<http://www.predictprotein.org/>): four transmembrane domains separated by a large soluble domain (SD) lying in the cytoplasm. This SD domain is composed of four helices (H1 to H4). SP = peptide signal. (b) Sequence alignment using MultAlin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>) of *S. flexneri* Spa24_{SD} with its homologues

YscR from *Y. enterocolitica* and SpaP/Flp from *S. typhimurium*, EscR from EPEC, PscR from *Pseudomonas aeruginosa*, HrcR from *Xanthomonas campestris* using identical residues are coloured in red and arrows pointed residues particularly studied in this work. C: Supernatants of *S. flexneri* wild-type strain M90T (WT), the *spa24* mutants complemented with pAH9 (native Spa24) or with variants (Spa24 Δ SD, Δ H1, Δ H2, Δ H3 and Δ H4) were analysed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining or by immunoblotting using monoclonal antibodies specific for IpaB and IpaC.

Spa24 interacts with Spa32, Spa40, Spa33, MxiA, MxiN, MxiK and Spa47

Spa24 was reported to be a minor component of the basal body of extensively purified NCs (Zenk *et al.*, 2007). The inactivation of the *spa24* gene prompted us to hypothesize that its phenotype could be attributable to the absence of Spa24's interaction with other T3S components. To test this hypothesis, we performed a GST-Spa24 pull-down assay by targeting some Mxi-Spa components whose corresponding mutated strains exhibit, like *spa24*, a needleless phenotype such as *mxiA*, *mxiN*, *mxiK*, *spa47*, *spa33*, and *spa40* genes (Jouihri *et al.*, 2003; Botteaux *et al.*, 2008; Botteaux *et al.*, 2010). Assuming that it controls the needle length at 50 nm, we also add Spa32 in our binding assay (Magdalena *et al.*, 2002; Tamano *et al.*, 2002). We first constructed plasmid pCAK71 (Spa24 Δ SP) by fusing GST to residues 24 to 216 of Spa24. In this construct, residues 1 to 23 of Spa24 containing the potential signal peptide (SP) were removed to facilitate its solubility and also to avoid the loss of recombinant GST protein upon Spa24 cleavage. GST-pull down assay was performed by incubating glutathion sepharose beads precoated with GST-Spa24 Δ SP or GST alone with bacterial lysates prepared from *E. coli* strains expressing His-tagged versions of Spa33, Spa47, MxiN, MxiK, Spa32, Spa40_{CT} (6His fused to residues 205 to 342 of Spa40 encoding the entire C-terminal soluble cytoplasmic domain), or His-MxiA_C (6His fused to last 160 residues of MxiA encoding a part of its large C-terminal cytoplasmic domain). As a negative control, we used His-DNMT3a (encoding His-DNA methyltransferase-3- α). Analysis of eluted fractions with glutathione indicates that Spa24 Δ SP interacts with the six tested proteins (Fig. 3a) but not with His-

DNMT3a. Interestingly, all interactions were detected in *E. coli*, indicating that they do not require intermediates T3S components.

Except for Spa47, Spa24SD is sufficient for Spa24 interaction with identified T3S partners

Remarkably, Spa24 contains a sizable hydrophilic central domain from residues 73 to 154 (Fig. 2a) which contains a coiled-coil domain that may be responsible for protein-protein interactions. To test whether this domain is sufficient for Spa24 interaction with identified T3S partners, we created a GST-Spa24₇₃₋₁₅₄ (Spa24_{SD}) (GST fused to residues 73 to 154) (Fig. 3b) and performed a GST-pull down assay as described above. Except for His-Spa47, Spa24_{SD} was found to interact with all other tested proteins (Fig. 3b). We conclude from this experiment that Spa24_{SD} is sufficient for proteins interaction but is dispensable for Spa47 binding.

Assuming that each of the four residues: F115, L138, P140 and A141 play a crucial in secretion, we further investigate the potential correlation between proteins interaction and the function of Spa24 in secretion. To do that, we generated four GST-Spa24_{SD} variants (F115L, L138R, P140S and A141V) and performed a GST pull-down assay. Western blot analysis of eluted fraction, using anti-His antibodies, revealed that GST-Spa24_{SD} variants were able to associate although at slightly different levels with MxiA, Spa40, MxiK and Spa33. Spa24_{SD} binding to MxiA, Spa33 and MxiN was reduced upon A141V or L138R mutation. In addition, these mutations completely abolish Spa24_{SD}/Spa32 interaction without affecting Spa40 or MxiK binding. A weaker interaction was however still observed between Spa24_{SD}^{F115L} and Spa40_{CT}. Lastly, no effect on Spa32, Spa33 or MxiN interaction was detected with the L115F mutation (Fig. 3c). The observed defect or reduced interaction could not be associated with the level of proteins production since all Gst-Spa24_{SD} variants were produced and purified in equal manner (Fig. 3c). We conclude from these experiments that mutations F115L and P140S have no effect on protein interactions while a notable reduced binding effect is associated with A141V and L138V mutations.

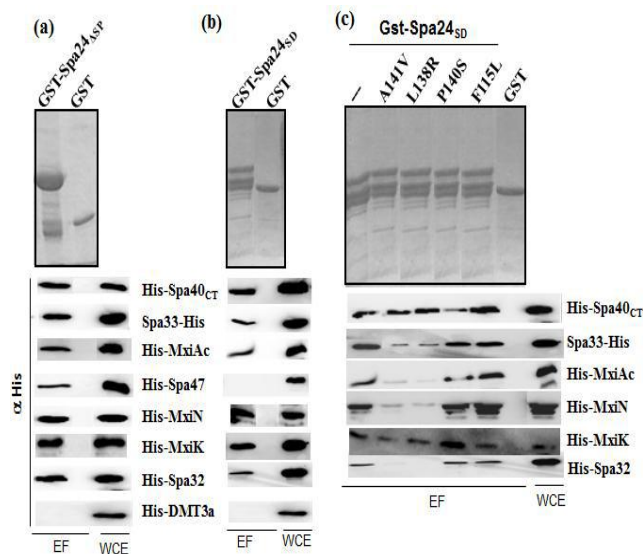


Fig. 3. Interaction partners of Spa24. (a) *Spa24* interacts with *Spa32*, *Spa40_{CT}*, *Spa33*, *MxiA_C*, *MxiN* and *Spa47* proteins. Interactions of GST-Spa24_{ΔSP} with His-Spa40_{CT}, Spa33-His, His-MxiA_C, His-MxiN, His-Spa32, and His-Spa47 were analyzed by pull-down assay. The bound proteins were analyzed by immunoblotting with anti-His tagged antibody. (b) Soluble domain of Spa24 (Spa24_{SD}) encompassing residues 73 to 157 is sufficient for Spa24 interaction. Interactions of GST-Spa24_{SD} with, His-Spa40_{CT}, Spa33-His, His-MxiA_C, His-MxiN, His-Spa32, or His-Spa47 were analyzed by pull-down assay. The bound proteins were analyzed by immunoblotting with anti-His tagged antibody. (c) Mutations A141V and L138R affect GST-Spa24_{SD} interaction with MxiA_C, Spa32, Spa33 and MxiN but not with Spa40_{CT}. Interactions of GST-Spa24_{SD} variants (Spa24_{F115L}, L138R, P140S, and A141V) with His-Spa40_{CT}, Spa33-His, His-MxiA_C, His-MxiN and His-Spa32 were analyzed by pull-down assay. The bound proteins were analyzed by immunoblotting with anti-His tagged antibody.

Residues 206 to 246 of *Spa32* are required for *Spa24* binding

Spa32 controls the length of the needle, by switching the specificity of the T3SA from secretion of needle components to that of *Ipas* proteins (Magdalena *et al.*, 2002; Tamano *et al.*, 2002). We have recently shown that residues 206 to 280 are involved in *Spa32* interaction to *Spa40* and proposed that this interaction could be required for the switch of substrate secretion from needles to translocators/effectors (Botteaux *et al.*, 2008). To identify the *Spa32* interacting domain to *Spa24_{SD}*, we performed a GST-pull down assay using bacterial lysates prepared from *E. coli* expressing six His-*Spa32* variants deleted from residues (1-36; 36-94; 206-246; 130-187;

246-292; 206-280 (Botteaux *et al.*, 2008). Except for *Spa32*_{Δ206-246}, *Spa24_{SD}* interacts with all other *Spa32* variants, suggesting that this domain represents either the binding domain or at least a part of it (Fig. 4). Remarkably, we have recently reported that the 206-246 domain is required for *Spa40* binding (Botteaux *et al.*, 2008).

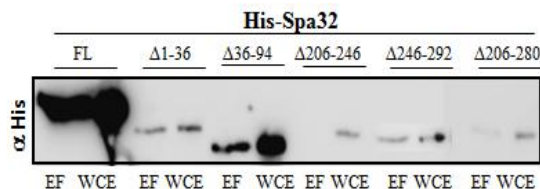


Fig.4: Residues 206 to 280 of *Spa32* are necessary for *Spa24_{SD}* interaction. Interactions of GST-Spa24_{SD} with His-*Spa32* variants (His-*Spa32*_{Δ1-36}, His-*Spa32*_{Δ36-94}, His-*Spa32*_{Δ206-246}, His-*Spa32*_{Δ246-292}, His-*Spa32*_{Δ206-280}) were analyzed by pull-down assay. The bound proteins were analyzed by immunoblotting with anti-His tagged antibody.

Spa24_{SD} interacts with *Spa15* but not with chaperones *IpgA*, *IpgE* or *IpgC*

During the course of our GST pull down assay, we used His-*Spa15* as non-binding control and were surprised to detect *Spa15* interaction with GST-Spa24_{SD} (Fig. 5). Four molecular T3SS chaperones (*IpgC*, *IpgE*, *IpgA* and *Spa15*) have been so far described in *Shigella* (Parsot, 2009). To investigate whether *Spa24_{SD}* could also interact with *IpgC*, *IpgE* and *IpgA*, we performed a GST-Spa24_{SD} pull-down assay upon incubation with bacterial lysates prepared from *E. coli* expressing His-tagged: *IpgE*, *IpgC*, or *IpgA*. Bound proteins were analyzed by western blot using anti-his monoclonal antibody. Although with an extent varied expression level of His-tagged proteins, *Spa24_{SD}* strongly associate with *Spa15*, but not with any of other tested chaperones (Fig. 5).

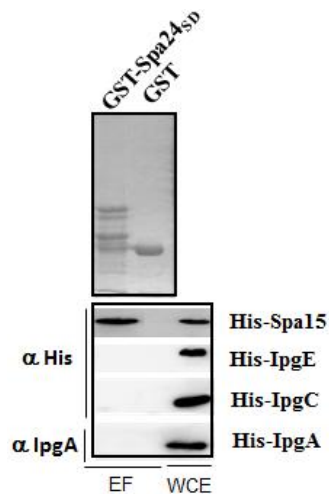


Fig. 5. Spa24_{SD} interacts with Spa15 but not with IpgE, IpgA and IpgC. Interactions of GST-Spa24_{SD} with, His-Spa15, His-IpgE, His-IpgC, and His-IpgA were analyzed by pull-down assay. The bound proteins were analyzed by immunoblotting with anti-His tagged antibody for Spa15, IpgE and IpgC and a polyclonal antibody against IpgA.

Interaction of Spa9 and Spa29 with T3S components

The flagellum FliP/Q/R triplet; Spa24/9/29 in *S. flexneri*, forms a primitive and universal structure called proto-channel. The inactivation of *spa9* and *spa29* genes prompted us to hypothesize that the defective secretion phenotype associated with the inactivation of *spa9* and *spa29* is most likely attributable to the lost in one hand of their mutual interactions and in other hand to the loss of their individual interaction with proteins involved in NC formation. To test this hypothesis, we initially attempted to investigate the capacity of physical interaction inside Spa24/9/29 triplet and failed to get soluble Spa24-His, Spa9-His and Spa29-His proteins (data not shown). Next, to test for interactions with other export components, we generated GST-Spa9 and GST-Spa29 and performed GST-pull down assay using bacterial lysates, solubilised using triton X-100 2%) (see Method) prepared from *E. coli* strains expressing Spa and Mxi his-tagged proteins. GST-Spa9 interacts with MxiA_{CT}, Spa40_{CT}, MxiN, and Spa33, but not His-Spa47 nor His-Spa32 (Fig. 6a and data not shown). Likewise, Gst-Spa29 interacts with MxiA_C and MxiN but not with

His-Spa47, Spa33-His, His-Spa32 nor His-Spa40_{CT} (Fig. 6b and data not shown).

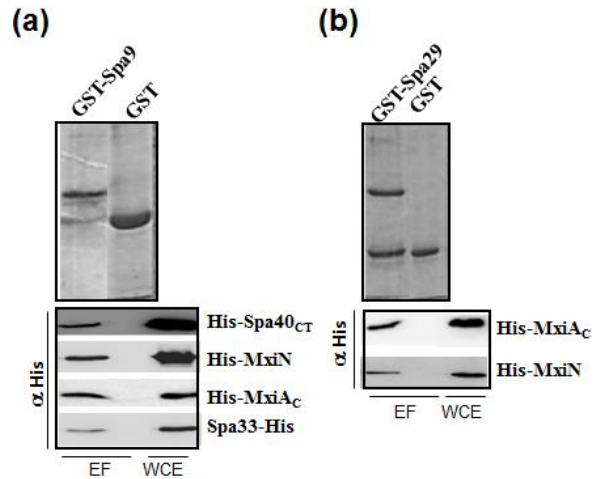


Fig.6: Spa9 interacts with Spa40_{CT}, MxiA_C, Spa33 and MxiN. (a) Interactions of GST-Spa9 with His-Spa40_{CT}, His-MxiN, His-MxiA_C, Spa33-His, His-Spa47 were analyzed by pull-down assay. The bound proteins were analyzed by immunoblotting with anti-His tagged antibody. (b) Spa29 interacts with MxiA_C and MxiN. Interactions of GST-Spa29 with His-Spa40_{CT}, His-MxiN, His-MxiA_C were analyzed by pull-down assay. The bound proteins were analyzed by immunoblotting with anti-His tagged antibody.

Discussion

The assembly of the T3SA needle is a carefully orchestrated multi-step process that requires the coordination of many proteins located in the cytosol, in both membranes and on the bacterial cell surface. In the present study, we investigated the role of Spa24; Spa9 and Spa29; three widely conserved integral membrane proteins and report functional evidences supporting that Spa24 directs selective molecular interaction with several T3SA components, such as Spa32, Spa33, Spa47, MxiK, MxiN and MxiA. In addition we report for the first time that Spa24 stability requires preassembled basal body structure with MxiG, -J and D as major components of it.

To investigate the role these genes, we generated three *spa24*, *spa9* and *spa29* mutants and showed that they exhibit T3SA substructures lacking the needle component. In particular, we demonstrated that the loss of T3S function is attributable to MxiH's instability, a phenotype

that has been previously reported in *Shigella* strain lacking Spa47, Spa33, MxiK, MxiN or MxiA (Jouihri et al., 2003). Likewise, a similar phenotype was previously reported for *spaP*, *spaQ*, and *spaR* genes of *Salmonella* (Collazo et Galan, 1996; Sukhan et al. 2001).

Spa24 contains an internal large cytoplasmic domain (Spa24_{SD}), which exhibits 60% identity with the Flp protein family. Moreover, Spa24 has been shown to restore the deficient invasive phenotype of the *Salmonella spaP* mutant (Groisman and Ochman, 1993). Spa24_{SD} cytoplasmic orientation was confirmed using the PhoA reporter gene fusion at residue 110 of Spa24, which exhibits a very low enzymatic activity (data not shown). Moreover, this prediction is reinforced by reported topology of YscrR, the *Y. enterocolitica* Spa24 counterpart (Fields et al., 1994). Residues 73 to 157 of Spa24 contain four helices predicted to form a coil-coiled structure. Spa24 variant lacking each of these helices abolished secretion, probably as a consequence of the loss of correct conformation of this domain. To characterize further the role of the SD domain, we examined the effect of single amino-acid residue mutations within Spa24. The four generated mutations (F115L, L138R, P140S, and A141V), which are conserved among all Spa24 homologues abolished Ipa proteins secretion.

The instability of Spa24 in some *mxi* mutants, and the presence of the coiled-coil domain prompt us to search for interacting partners among T3S components. As Spa24 lacks the needle portion we specifically target proteins that took part to the NC assembly. Spa24, when deleted from its signal peptide, interacts individually with Spa47, MxiN, Spa33, MxiA and with Spa40. Interestingly, except for Spa47, Spa24_{SD} domain was found to be sufficient for those interactions. The fact that Spa24_{SD} was no longer able to interact with Spa47 suggests that Spa47 would interact with one of the four transmembrane domains or with the short c-terminal of Spa24. The significance of the Spa24 interaction to Spa47, MxiN, MxiK, or Spa33 could be linked to the participation to the correct positioning of the ATPase complex to recruit and facilitate the transit of needle subunits. Mutation Spa24^{A141V} or Spa24^{L138R} affects the interaction with Spa32, MxiA, MxiN

and Spa33 without affecting Spa40_{CT} binding. In contrast Spa24^{P140S} and Spa24^{F115L}, even if they are not functional in term of secretion, were still able to interact with MxiA, Spa40, MxiN, and Spa33. These unexpected results could be explained by the fact that even if all interactions are still effective, the dynamic or the affinity of these interactions may be impaired.

One feature in *Shigella* is that the poor expression of the Spa proteins compared to the Mxi ones since they were hardly detectable within extensively purified NCs. Here we found that the stability of Spa24 is very complex and requires MxiG, MxiJ and MxiD. Although we could expect that Spa24 is unstable in these mutants because Spa24 has to interact with preassembled integral membrane proteins such as MxiJ, MxiD and MxiI, although it is difficult to understand why Spa24 is instable in the *mxiH* mutant background. We have previously shown that EM structure of the *mxiH* mutant still contains the neck domain composed at least by MxiG, MxiJ and MxiD. Spa24 could induce its stability upon interaction with T3S components; however our data in *E. coli* clearly show that Spa24 is correctly produced. Exceptionally, both Spa24 and Spa40 were reported minor components of the central inner-membrane export apparatus (Zenk et al., 2007). We show here that Spa24_{SD} interacts with the same domain of Spa32 that is required for Spa40 binding (Botteaux et al., 2008), suggesting that some competition in proteins interaction could happen during the assembly/switch process. Besides its role in the switch process (Botteaux et al., 2008), the crucial role of Spa40 processing, at the NP_{TH} motif, in the T3SA assembly was recently highlighted in our laboratory (Botteaux et al., 2010). Comparatively, Creasey et al. (2003) reported that in the EPEC, EscR (Spa24) interacts with EscU (Spa40). Moreover, in the flagellar system, the FlhR-FlhB (Spa24-Spa40) and FlhA_C-FlhB_C (MxiA-Spa40) interactions were reported (Minamino & Macnab, 2000; Van Arnem et al., 2004). Spa24 interacts separately with both soluble extreme C-terminus domains of Spa40 and MxiA that interact also to each other (Botteaux et al., submitted), suggesting the existence of a transitory Spa24_{SD}-Spa40_{CT}-MxiA_{CT} complex, that may recruit T3S actors.

The role of chaperones is central to the

function of the T3S pathway, as these proteins are involved in the storage of effectors within the bacterial cytoplasm (Huek *et al.*, 1998), which allows the delivery of effectors to target cells immediately upon contact of the bacterium with the host cells. Spa15 belongs to the class IB chaperones and was reported to associate with at least six effectors: IpaA, IpgB1, IpgB2, OspC3, OspD1 and probably with OspB (Page *et al.*, 2001; 2002; Parsot *et al.*, 2003, Hachani *et al.*, 2008). Here, the molecular interaction between Spa24 and Spa15 is reported for the first time. However no interaction was seen with chaperones IpgA, IpgC or IpgE. Spa24 may, via its SD domain, play a role as a sensor by interacting with T3SS component and with chaperone Spa15 to assist effectors secretion (Page *et al.*, 2001; 2002). Very recently, Spa15 by itself was found to be secreted in a type III secretion system-dependent fashion, and contributes to the intracellular survival of *Shigella* by blocking apoptosis in the infected host cell (Faherty *et al.*, 2009). Thus, Spa15 with its particular “status” has a multi-function and could use its interaction to Spa24 to balance between assembly and proteins secretion.

Spa24 is part of a triplet of proteins with Spa29 and Spa9, suggesting a common role and probably interactions with each other's. Creasey *et al.* reported that in *EPEC*, EscR (Spa24) interacts with EscS (Spa9). Unfortunately, here we failed to show physical interaction between Spa24, Spa9 and Spa29 because they are very insoluble proteins that form aggregates even in harsh detergent conditions as it was also reported (Fan *et al.*,

1997, Van Arnem *et al.*, 2004). We therefore limited our investigation by searching for Spa9 and Spa29 T3S partners. Soluble Gst-Spa9 interacts with MxiA, Spa40, MxiN and Spa33 but not with Spa47. Gst-Spa29 interacts with MxiA_C and MxiN but not with Spa40_{CT}. The lack of Spa29/Spa40 interaction could be due to the use of only Spa40CT in the binding assay. Comparatively, the transmembrane domains of FlhB (Spa40) are required for FliR (Spa29) binding (Minamino *et al.*, 2003), suggesting that the Spa40 physically interact with Spa29.

In conclusion, in this work, we highlighted, for the first time, the role of T3S export components; Spa24, Spa9 and Spa29. We clearly show that Spa24, Spa9 and Spa29 are necessary for needle assembly. We also demonstrate that the soluble domain of Spa24 acts as a platform by binding to several T3S components. Lastly, the detected interaction between Spa24 and Spa15 may reveal a possible role in the secretion hierarchy process.

Acknowledgments

We are grateful to C. Parsot for helpful discussions of data prior to publication. ACK was supported by a fellowship from the CUD (ULg) and from A and D. Van Buuren foundation. This work was partly supported by a grant from the FNRS (convention F 3.4623.06). A.K.R is supported by a fellowship from the FRIA (Fonds Régional Industriels et Agronomique ; Belgium). LB and A.B were/are supported by a research fellowship from the FNRS.

Table I: Strains and plasmids used in this study.

Strains or plasmids	Characteristics	Reference
E. coli, TOP10	For overproduction of proteins	Invitrogen
E. coli BL21	For overproduction of proteins	Invitrogen
DH5αpir	for cloning into mutase vector pGP704	Miller <i>et al.</i> , (1988)
Sm10λpir	For conjugation mating with <i>S. flexneri</i>	Miller <i>et al.</i> , (1988)
M90T-Sm	Spontaneous derivative SmR of M90T (<i>Shigella flexneri</i>)	Sansonetti <i>et al.</i> , (1986)
SB32	M90T-Sm <i>spa24::apha-3</i>	This study
SB33	SB323/pAH9 (native Spa24)	This study
SB38	M90T-Sm <i>spa29::apha-3</i>	This study
SB39	SB38/ pAH12 (native Spa29)	This study
SB40	M90T-Sm <i>spa9::zeo</i>	This study
SB41	SB40 /pAH18 (native Spa9)	This study
pGP704	Suicide vector used to disrupt the native gene	
pGEX-4T-1	GST fusion expression vector	GE. Health care
pBADhisA	N-terminal His tag <i>Ara</i> expression vector	Invitrogen
pBADhisB	N-terminal His tag <i>Ara</i> expression vector	Invitrogen
pBAD18	<i>Ara</i> expression vector	Invitrogen
pBAD-Myc-his	C-terminal His tag <i>Ara</i> expression vector	Invitrogen
pTZ18R	Cloning vector	This study
pWR100	Virulence plasmid (GenBank accession number AL39173)	Buchrieser <i>et al.</i> , (2001)
pHA8	<i>spa24::aphA3</i> (suicide vector)	This study
pHA10	<i>spa9::ble</i> (suicide vector)	This study
pHA17	<i>spa29::aphA3</i> (suicide vector)	This study
pHA9	pTZ18 encoding native Spa24	This study
pHA12	pTZ18 encoding native Spa9	This study
pHA18	pTZ18 encoding native Spa29	This study
pCAK50	<i>spa9</i> cloned into pGEX-4T-1	This study
pCAK67	<i>spa29</i> cloned into pGEX-4T-1	This study
pCAK71	<i>spa24</i> deleted from its signal peptide cloned into pGEX-4T-1	This study
pCAK77	<i>spa24_{SD}</i> cloned into pGEX-4T-1	This study
pCAK82	pGEX::Spa24SD _{F115L}	This study
pCAK83	pGEX::Spa24SD _{A141V}	This study
pCAK85	pGEX::Spa24SD _{P140S}	This study
pCAK88	pGEX::Spa24SD _{L138R}	This study
pCAK90	pHA9 _{L103F}	This study
pCAK91	pHA9 _{A141V}	This study
pCAK92	pHA9 _{A150I}	This study
pCAK93	pHA9 _{P140S}	This study
pHA9	Native <i>spa24</i> cloned into pTZ18R	This study
pCAK101	pHA9 _{ASD} , Spa24 deleted from soluble domain (residues 73-154)	This study
pCAK105	pHA9 _{ΔH1} expressing Spa24deleted from helix 1	This study
pCAK106	pHA9 _{ΔH2} (Spa24ΔH2) Spa24deleted from helix 2	This study
pCAK107	pHA9 _{ΔH3} (Spa24ΔH3) Spa24deleted from helix 3	This study
pCAK108	pHA9 _{ΔH4} (Spa24ΔH4) Spa24deleted from helix 4	This study
pBAL27	Cytoplasmic domain of MxiA cloned into pBADhisA	Botteaux <i>et al</i> , submitted
pQE30::His-Spa40_{CT}	Cytoplasmic domain of Spa40 cloned into pQE30	This study???
pMS019	<i>spa47</i> cloned into pBADHisB	Botteaux <i>et al</i> , 2009
pBAD::spa33-Myc-His	<i>spa33</i> cloned into pBADMyc-HisA	This study
pJN51	<i>mxiN</i> cloned into pQE30	Jouihri <i>et al.</i> , 2003
pJN79	<i>mxiK</i> cloned into pQE30	Jouihri <i>et al.</i> , 2003

Table II : Primers used in this study

Primers names	Sequences 5'
9sf	CGGGATCCTCTGATATAGTTTATATGGGTAAT
29Ashis6	CCGCTCGAGTTAATGATGATGATGATGATGTCTAACAAATAGATTTGTGAAAAAT
29FS	CGGGATCCGACATTTCAAGCTGGTTCGAAAG
29FAs	GGCCTCGAGGTTTTTTAGGTGTCGGCTTTTCTG
40fsbam1	CGGGATCCGCAAATAAAACAGAAAAGCCGAC
40hisfas	GGCCTCGAGTTAATGATGATGATGATGATGATGATGAGTGTTTGAACCTGCTC
spa33s	CGCGGATCCCTAAGAATTAACATTTTGACGC
spa33As	GGCCTCGAGGAGATTACTCCTTTACCATCC
24fS	CGGGATCCCTGAGTGACATGTCCCTCATC
Spa24fSP	CGCGGATCCACCTGTTATATAAAGTTTCTATTG
Spa24Fas	GGCCTCGAGCATTACCTCCATCATCTAAGCA
MxiAFs	CGGGATCCATCCAGTCTTTTCTTAAGCAAGTAA
MxiAFAs	GGCCTCGAGGTTACTCATATTTAAACCTCACTA
spa24sols	GGGGATCCGAAAATTATCTAAATGGCCCTC
spa24solas	CGGCTCGAGTTATTTGAACGCATCTTTGATTTCAC
L103Fs	TATAAGCAATACTTTAAAAAGCATACAGA
L103Fas	TCTGTATGCTTTTTTAAAGTATTGCTTATA
A141Vs	TTCCCTCTTGCTGGATATGCGCTAAGTG
A141Vas	CACTTAGCGCATATCCAGGCAAGAGGGAA
A150Is	GTGAAATCAAAGATATCTTCAAATAGGTTT
A150IAs	AAACCTATTTTGAAGATATCTTTGATTTCAC
L138Rs	TATTCATTGTTTTCTAGATTGCCTGCATATGC
L138Ras	GCATATGCAGGCAATCTAGAAAACAATGAATA
P140Ss	TGTTTTCCCTCTTGAGCGCTTATGCGCTAAGTGA
P140Sas	TCACTTAGCGCATAAGCGCTCAAGAGGGAAAACA
F115Ls	AGTTAGCACGTTTTCTGCAGAGGTCTGAAGAAGA
F115Las	TCTTCTTCAGACCTCTGTAGAAAACGTGCTAACT
Spa24D1s	TCTGGCTTGATGGAATATAAG
Spa24D1as	AGATATTGTATCAAATTTTGGAGG
Spa24D2s	AAGCATACAGATCTTGAGTTAGC
Spa24D2as	TTCCATCAAGCCAGAATCAGA
Spa24D3s	GAAGAAGAAAATGCTGATTAAAA
Spa24D3as	ATCTGTATGCTTTTCAAGTATTG
Spa24D4s	TTCAAATAGGTTTTTATTTATATTTG
Spa24D4as	CGCATATGCAGGCAAGAGG

Table III: Identified interactions between T3S components.

	Spa9	Spa29	Spa24	MxiAc	Spa40 _{CT}	Spa47	MxiN	MxiK	Spa33	Spa32
Spa9				+	+	-	+	?	+	-
Spa29				+	-	-	+	?	-	-
Spa24				+	+	+	+	+	+	+
MxiA _C	+	+	+		+					
Spa40 _{CT}	+	-	+	+		+	+	+	+	+
Spa47	-	-	+		+		+	+	+	
MxiN	+	+	+		+	+		+		
MxiK	?	?	+		+	+	+			
Spa33	+	-	+		+	+				
Spa32	-	-	+		+					

References

- Aizawa, S.-I. (2001) Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol Lett* **202**: 157–164.
- Allaoui, A., Mounier, J., Prevost, M.C., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (1992) *icsB*: a *Shigella flexneri* virulence gene necessary for the lysis of protrusions during intercellular spread. *Mol Microbiol* **6**: 1605–1616.
- Allaoui, A., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (1993a) MxiD, an outer membrane protein necessary for the secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins. *Mol Microbiol* **7**: 59–68.
- Allaoui, A., Woestyn, S., Sluiter, C., and Cornelis, G.R. (1994) YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. *J Bacteriol* **176**(15):4534–42.
- Bahrani, F.K., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (1997) Secretion of Ipa proteins by *Shigella flexneri*: inducer molecules and kinetics of activation. *Infect Immun* **65**: 4005–4010.
- Blocker, A., P. Gounon, E. Larquet, K. Niebuhr, V. Cabiaux, C. Parsot, and Sansonetti, P., (1999) The tripartite type III secretion of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J Cell Biol* **147**:683–693.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P., and Allaoui, A. (2001) Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretion. *Mol Microbiol* Feb;**39**(3):652–63.
- Bourdet-Sicard, R., Rudiger, M., Jockusch, B.M., Gounon, P., Sansonetti, P.J., and Tran Van Nhieu, G. (1999) Binding of the *Shigella* protein IpaA to vinculin induces F-actin depolymerization. *EMBO J* **18**: 5853–5862.
- Buchrieser C, Glaser P, Rusniok C, Nedjari H, D'Hauteville H, Kunst F, Sansonetti P, Parsot C. (2000) The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* **38**(4):760–71.
- Cordes, F.S., Komoriya, K., Larquet, E., Yang, S., Egelman, E.H., Blocker, A., and Lea, S.M. (2003) Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *J Biol Chem* **278**(19):17103–7.
- Cornelis, G.R. and Van Gijsegem, F.(2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* **54**:735–74. Review.PMID: 11018143.
- Cossart, P., and Sansonetti, P.J. (2004) Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**(5668):242–8.
- Espina, M., Olive, A.J., Kenjale, R., Moore, D.S., Ausar, S.F., Kaminski, R.W., Oaks, E.V., Middaugh, C.R., Picking, W.D., and Picking, W.L. (2006) IpaD localizes to the tip of the type III secretion system needle of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* **74**(8):4391–4400.
- Fan, F., Ohnishi, K., Francis, N.R., and Macnab, R.M. (1997) The FliP and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*, putative components of the type III flagellar export apparatus, are located in the flagellar basal body. *Mol Microbiol* **26**(5):1035–46.
- Galán, J.E., and Collmer, A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**:1322.
- Galán, J.E.(1996) Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol Microbiol* **20**(2):263–71.
- Groisman, E. A., and Ochman, H. (1993) Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cells by *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*. *EMBO J* **12**:3779–3787.
- Hueck, C. J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:379–433.
- J. Malakooti, B. Ely. P.Matsumura, Molecular characterization, nucleotide sequence, and expression of fliO, fliP, fliQ, and fliR genes of *Escherichia coli*, J. bacterial. **176** (1994) 189–197.
- Jouihri N, Sory MP, Page AL, Gounon P, Parsot C, Allaoui A. MxiK and MxiN interact with the Spa47 ATPase and are required for transit of the needle components MxiH and MxiI, but not of Ipa proteins, through the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol*. 2003 Aug;**49**(3):755–67.
- Lupas A. Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci*. 1996 Oct;**21**(10):375–82.
- Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, Adak GK, Levine MM. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ*. 1999;**77**(8):651–66.
- Kubori, T., Y. Matsushima, D. Nakamura, J. Uralil, M. Lara-Tejero, A.Sukhan, J. E. Galan, and S.-I. Aizawa. 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**:602–605.
- Minamino, T., and R. M. Macnab. 2000. Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates. *Mol. Microbiol*. **35**:1052–1064.
- Macnab R.M. How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol*. 2003;**57**:77–100. Epub 2003 May 1.
- Magdalena, J., Hachani, A., Chamekh, M.,

Jouihri, N., Gounon, P., Blocker, A., and Allaoui, A. (2002) Spa32 regulates a switch in substrate specificity of the type III secretion of *Shigella flexneri* from needle components to Ipa proteins. *J Bacteriol* **184**: 3433–3441.

Ménard R, Sansonetti P, Parsot C. The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. *EMBO J*. 1994 Nov 15;13(22):5293-302.

Ménard, R., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (1993) Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J Bacteriol* **175**: 5899–5906.

Minamino T, González-Pedrajo B, Kihara M, Namba K, Macnab RM. The ATPase FliI can interact with the type III flagellar protein export apparatus in the absence of its regulator, FliH. *J Bacteriol*. 2003 Jul;185(13):3983-8.

Minamino T, Macnab RM. Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J Bacteriol*. 1999 Mar;181(5):1388-94.

Morita-Ishihara T, Ogawa M, Sagara H, Yoshida M, Katayama E, Sasakawa C. *Shigella* Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. *J Biol Chem*. 2006 Jan 6;281(1):599-607.

Niebuhr, K., Jouihri, N., Allaoui, A., Gounon, P., Sansonetti, P., and Parsot, C. (2000) IpgD, a protein secreted by the type III secretion machinery of *Shigella flexneri*, is chaperoned by IpgE and implicated in entry focus formation. *Mol Microbiol* **38**: 8–19.

Ohnishi K, Fan F, Schoenhals GJ, Kihara M, Macnab RM. The FliO, FliP, FliQ, and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*: putative components for flagellar assembly. *J Bacteriol*. 1997 Oct;179(19):6092-9.

Olive, A.J., Kenjale, R., Espina, M., Moore, D.S., Picking, W.L. and Picking, W.D. (2007) Bile salts stimulate recruitment of IpaB to the *Shigella* surface where it co-localizes with IpaD at the tip of the type III secretion needle. *Infect. Immun*. 75:2626-2629.

Parsot C, Ménard R, Gounon P, Sansonetti PJ. Enhanced secretion through the *Shigella flexneri*

Mxi-Spa translocon leads to assembly of extracellular proteins into macromolecular structures. *Mol Microbiol*. 1995 Apr;16(2):291-300.

Pradel N, Ye C, Wu LF. A cleavable signal peptide is required for the full function of the polytopic inner membrane protein FliP of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jul 9;319(4):1276-80.

Philpott DJ, Edgeworth JD, Sansonetti PJ (2000) The pathogenesis of *Shigella flexneri* infection: lessons from in vitro and in vivo studies. *Philos Trans R Soc London B* 355: 575–586

Schuch, R., and Maurelli, A.T. (2001) Spa33, a cell surface-associated subunit of the Mxi-Spa type III secretory pathway of *Shigella flexneri*, regulates Ipa protein traffic. *Infect Immun* **69**: 2180–2189.

Szewczyk, U., Szewczyk, R., Manz, W., and Schleifer, K. H. (2000) *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 81–127.

Tamano K, Aizawa S, Katayama E, Nonaka T, Imajoh-Ohmi S, Kuwae A, Nagai S, Sasakawa C. Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J*. 2000 Aug 1;19(15):3876-87.

Tamano K, Katayama E, Toyotome T, Sasakawa C. *Shigella* Spa32 is an essential secretory protein for functional type III secretion machinery and uniformity of its needle length. *J Bacteriol*. 2002 Mar;184(5):1244-52.

Tampakaki AP, Fadoulglou VE, Gazi AD, Panopoulos NJ, Kokkinidis M. Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol*. 2004 Sep;6(9):805-16.

Van Arnam JS, McCurry JL, Kihara M, Macnab RM. Analysis of an engineered *Salmonella* flagellar fusion protein, FliR-FlhB. *J Bacteriol*. 2004 Apr;186(8):2495-8.

Zenk SF, Stabat D, Hodgkinson JL, Veenendaal AK, Johnson S, Blocker AJ. Identification of minor inner-membrane components of the *Shigella* type III secretion system 'needle complex'. *Microbiology*. 2007 Aug; 153(Pt 8):2405-15.

2. CARACTERISATION DU ROLE DE LA PROTEINE ICSB DANS LA PROTECTION CONTRE L'AUTOPHAGIE

L'étude du gène *icsB* a fait l'objet d'un article publié en tant que premier auteur dans la revue *Microbes and Infection* : « **Escape of intracellular *Shigella* from autophagy requires binding to cholesterol through the type III effector, IcsB** ». Aimé Christian Kayath, Seamus Hussey, Nargisse El hajjami, Karan Nagra, Dana Philpott and Abdelmounaïm Allaoui. (2010).

La protéine IcsB est un des effecteurs sécrétés par le SST3 de *Shigella* au contact cellulaire ou en condition d'induction au Rouge Congo [60]. IcsB est codée par le gène *icsB*, situé en amont des gènes *ipaBCD* sur le grand plasmide de 220 kb de *Shigella*. C'est une protéine de 54,3 kDa composée de 494 acides aminés. Juste à côté du gène *icsB*, se trouve le gène *ipgA* codant pour un chaperon qui stabilise IcsB. L'homologue d'IcsB (BopA) et son chaperon BicP ont été identifiés chez *Burkholderia*. IcsB et BopA sont impliquées dans la protection des bactéries contre l'autophagie. L'interaction d'IcsB avec IcsA/VirG a été rapportée comme permettant à *Shigella* d'échapper plus facilement à l'autophagie.

Dans cette étude, nous avons caractérisé la fonction de la protéine IcsB. Nous avons d'abord identifié un domaine potentiel de fixation du cholestérol dans les séquences des protéines IcsB et BopA. Ce domaine de liaison au cholestérol (CBD : Cholesterol-Binding Domain) contient deux résidus hautement conservés entre IcsB et la famille des élicitines, des petites protéines de 10 kDa des phytopathogènes du genre *Phytophthora* (Y297/Y47 et Y340/Y87).

Par chromatographie sur tamis moléculaire, nous avons montré qu'IcsB et BopA fixent le cholestérol. Par ailleurs nous avons montré que, comme pour IpgA, BicP joue un rôle dans la stabilisation de BopA. La délétion de la région CBD, ainsi que les mutations individuelles des résidus Y297, Y340 et la double mutation Y297-Y340 affectent la fixation d'IcsB au cholestérol.

Nous avons également établi que la délétion de ce domaine, ainsi que les différents variants d'IcsB (Y297F, Y340F et Y297F-Y340F) augmentent le nombre d'autophagosomes dans les cellules MDAMC et réduisent significativement le nombre de bactéries associées à l'autophagosome par rapport au type sauvage.

Enfin, nos résultats ont mis en évidence que la délétion du domaine CBD n'a pas d'effet sur l'association d'IcsA/VirG à IcsB.



Microbes and Infection xx (2010) 1–11



www.elsevier.com/locate/micinf

Original article

Escape of intracellular *Shigella* from autophagy requires binding to cholesterol through the type III effector, IcsB

Christian A. Kayath^a, Seamus Hussey^{b,c,d}, Nargisse El hajjami^{a,e},
Karan Nagra^b, Dana Philpott^b and Abdelmounaïm Allaoui^{a,*}

^aLaboratoire de Bactériologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

^bDepartment of Immunology, University of Toronto, Medical Sciences Building, Toronto, Canada

^cDivision of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition and Cell Biology Program, The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada

^dDepartment of Paediatrics, University of Toronto, Canada

^eAl Akhawayn University of Ifrane (AUI), Morocco

Received 24 March 2010; accepted 17 June 2010

Abstract

Type III secretion systems are present in many pathogenic bacteria and mediate the translocation of bacterial effectors into host cells. Identification of host targets of these effectors is crucial for understanding bacterial virulence. IcsB, a type III secretion effector, helps *Shigella* to evade the host autophagy defense system by binding to the autophagy protein, Atg5. Here, we show that IcsB is able to interact specifically with cholesterol. The cholesterol binding domain (CBD) of IcsB is located between residues 288 and 351. Specific mutations of single tyrosine residues Y297 or Y340 of IcsB by phenylalanine (F) slightly reduced cholesterol binding, whereas deletion of the entire CBD or double mutation Y297F-Y340F strongly abolished interactions with cholesterol. To determine whether *Shigella* expressing IcsB variants could evade autophagy as effectively as the wild-type *Shigella*, we infected MDAMC cells stably expressing the autophagy marker LC3 fused to GFP and bacterial autophagosome formation was quantified using fluorescence microscopy. Mutation Y297F or Y340F slightly impaired IcsB function, whereas complete removal of CBD or mutation Y297F-Y340F significantly impaired autophagy evasion. Furthermore, we report that BopA, the counterpart of IcsB in *Burkholderia pseudomallei* with similar autophagy-evading properties, contains the CBD domain and is also able to bind cholesterol.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: *Shigella*; Type III secretion effector; IcsB; Autophagy; Autophagosome; Cholesterol binding

1. Introduction

Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is an evolutionarily conserved process in eukaryotes with diverse functions, from nutrient recycling to degradation of defective proteins and organelles to microbial recognition and antigen

presentation by MHC class 2 molecules [1–5]. Autophagy is characterized by the formation of lamellar vacuoles called autophagosomes that encapsulate cytosolic targets within a portion of the cytoplasm and ultimately fuse with lysosomes, resulting in degradation and processing of autophagosome contents. Autophagosome biogenesis involves 3 steps, including initiation, elongation and maturation, and depends on a set of over 30 evolutionarily conserved proteins called autophagy related proteins (Atg) [4,6].

Autophagy depends on two conserved interacting ubiquitin-like conjugation systems. The first system is characterized by the modification and conjugation of Atg12 to Atg5 and Atg16. The second system involves the processing of microtubule-

Abbreviations: T3SA, type III secretion apparatus; CBD, cholesterol binding domain; SBD, sterol binding-like domain; RID, Rho GTPase inactivation domain; MDAMC, human breast carcinoma epithelial cells; M β CD, methyl-beta-cyclodextrin; LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3.

* Corresponding author. Tel.: +32 2 522 82 91; fax: +32 555 61 16.

E-mail address: aallaoui@ulb.ac.be (A. Allaoui).

associated protein 1 light chain 3 (LC3) to form LC3-I. In the presence of the Atg12–Atg5–Atg16 complex, LC3-I is conjugated to the lipid phosphatidylethanolamine (PE) at its carboxy-terminal to form LC3-II [4,6]. LC3-II is uniquely associated with the inner and outer membrane of autophagosomes and is used as a marker for autophagy induction. Autophagy has been shown not only to engulf and destroy pathogens within the cytoplasm but also those present within vacuoles, such as *Toxoplasma gondii* [5,7].

Although many intracellular pathogens are eliminated via autophagy, some are able to evade autophagy or even use autophagy to their advantage. In particular studies, *Shigella* evades autophagy upon the release of the T3SS effector IcsB in epithelial cells [2]. The proposed mechanism involves IcsB binding to IcsA/VirG, a surface protein that accumulates on one side of the bacteria, and which plays a major role in *Shigella* transmission and survival [8]. IcsA not only interacts with proteins involved in actin polymerization, but can also bind Atg5, resulting in *Shigella* uptake and destruction by autophagosomes [2]. A *Shigella* strain lacking the *icsB* gene is able to invade cells and to escape from vacuoles but is restricted from multiplying by autophagy [2]. The suggested role of IcsB is to prevent autophagosomal uptake by binding with higher affinity to the same region of IcsA that binds Atg5 [2].

The aim of this work was to further characterize the role of IcsB in the autophagy process. Sequence alignment indicated that IcsB shares a conserved amino acids sequence (residues 288–351) with the sterol binding-like domain (SBD) of elicitors. Elicitors molecules are 10-kDa holoproteins secreted by most *Phytophthora* species [9]. In tobacco plants, these elicitors induce both a hypersensitive response (leaf necrosis) and non-specific systemic acquired resistance [10]. Elicitors also behave like sterol carrier proteins since they bind sterols and

catalyze their transfer between artificial membranes [11]. Moreover, elicitors are able to bind sterols from plasma membranes [12]. Since residues 288–351 of IcsB are highly conserved with the SBD region, we investigated in this study whether this domain is critical for IcsB function by binding to cholesterol, which is the sterol counterpart in animal cells. Using an in vitro and a cellular approach, we report here that the ability of IcsB to bind cholesterol is coupled to its anti-autophagy function.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and cell culture

Shigella flexneri strains are derivatives of the wild-type strain M90T (serotype 5) [13]. M90T-Sm (Sm^r) has been described previously [14]. The *icsB* mutant was complemented with plasmid pAB9 and its derivative (Table 1 and [15]). *Escherichia coli* strains are derivatives of K-12 strain; the Top10 and BL21 strains were transformed with pTZ18R, or pGEX-4T-1 derivatives. Antibiotics were used at the following concentrations: ampicillin, 100 µg ml⁻¹, kanamycin, 50 µg ml⁻¹, and streptomycin, 100 µg ml⁻¹.

2.2. Plasmids construction

All the plasmids, and primers used in this study are listed (Table 1 and 1S). *icsB*–*ipgA* and *bopA*–*bicP* fragments were amplified from pWR100 (the virulence plasmid of *Shigella flexneri*) and from chromosomal (*Burkholderia pseudomallei*), respectively. PCR fragments were amplified by using PrimeSTAR DNA polymerase (Takara), and inserted in-frame with *gst* in pGEX-4T-1 digested by *Bam*HI and *Eco*RI for

Table 1
Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strains or plasmids	Characteristics	References
<i>E. coli</i> , TOP10	For overproduction of proteins	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21	For overproduction of proteins	Invitrogen
M90T-Sm	Spontaneous derivative Sm ^r of M90T (<i>Shigella flexneri</i> serotype 5)	[14]
<i>icsB</i> (mutant)	M90T-Sm <i>icsB</i> :: <i>aphA</i> -3	[15]
pGEX-4T-1	Gst fusion expression vector	GE. Healthcare
pCAK8	pGEX-4T-1 (Gst–IcsB, IpgA)	This study
pCAK17	pGEX-4T-1 (Gst–IcsB)	This study
pCAK30	pGEX-4T-1 (Gst–IpgA)	This study
pCAK38	pGEX-4T-1 (Gst–IcsB, IpgA–His)	This study
pCAK42	pGEX-4T-1 (Gst–IcsBY297F, IpgA)	This study
pCAK44	pGEX-4T-1 (Gst–IcsBY340F, IpgA)	This study
pCAK45	pGEX-4T-1 (Gst–IcsBY340F–Y340F, IpgA)	This study
pCAK49	pGEX-4T-1 (GstΔCBD, IpgA)	This study
pNC2	pGEX-4T-1(Gst–BopA, BicP)	This study
pNC3	pGEX-4T-1(Gst–BopA, BicP–His)	This study
pNC4	pGEX-4T-1(Gst–BopA)	This study
pAB9	pUC18 (IcsB, IpgA)	[14]
pAB9.1	pAB9 (IcsBY297F, IpgA)	This study
pAB9.2	pAB9 (IcsBY340F, IpgA)	This study
pAB.9.3	pAB9 (IcsBY297F–Y340F, IpgA)	This study
pAB9.4	pAB9 (IcsBΔCBD, IpgA)	This study
pHI2	pQE30 (His–IpgC, IpaB)	[17]

icsB–*ipgA*, and by *Sma*I and *Not*I for *bopA*–*bicP*. The resulting plasmids were named pCAK8; pCAK38 and pNC2; pNC3 (Table 1). Plasmid pCAK30 was constructed by inserting PCR DNA fragment of *ipgA* into *Bam*HI and *Xho*I pGEX-4T-1 digested vector.

Plasmids pAB9.1, pAB9.2, pAB9.3, and pAB9.4, used for the complementation of the *icsB* mutant, are derivatives of pAB9 that constitutively expresses native IcsB and its chaperone IpgA from the *plac* promoter. Substitutions of IcsB tyrosine residues at positions Y297 and Y340 by phenylalanine were made on plasmids pAB9 [16] or pCAK8 to obtain pCAK42, pCAK44 and pCAK45 (Table 1). Site-directed mutagenesis was carried out according to the procedure of the Quick Change Mutagenesis Kit (Stratagene). A restriction site was created in each primer (see Table 1S) to easily confirm the introduced mutations. Deletion of CBD was generated by inverse polymerase chain reaction (iPCR) using pAB9 or pCAK8 as templates, and the resulting plasmids were named pAB9.4 or pCAK49 plasmids, respectively. All constructions were checked by DNA sequencing (COGENICS) and proteins production was monitored by Coomassie blue and/or by immunoblot using antibodies against IcsB, Gst or His.

2.3. Expression and purification of Gst and His-tagged hybrid proteins

For purification of Gst-fusion proteins, an overnight culture of *E. coli* carrying pCAK8, pCAK30, pCAK38, pCAK42, pKAC43, pCAK44, pCAK45, pCAK47, pCAK49, pNC2, and pNC3 was subcultured 1:100 into 300 ml of L-broth. The culture was grown with vigorous shaking (180 rpm) at 37 °C until an optical density at 600 nm of 0.6 is reached. IPTG was then added at 0.1 mM final concentration, and growth was continued for additional 4 h. Cell pellets were incubated on ice, resuspended in 10 ml of lysis buffer (PBS supplemented with lysozyme and protease inhibitors cocktail), sonicated, and then centrifuged at 6000 × g to pellet unbroken cells and inclusion bodies. The supernatant was pooled to 100 µl of GE Healthcare's Glutathione Sepharose 4B in PBS. The lysate was added to the beads for 1 h and then centrifuged 5 min at 4 °C at 500 rpm. The supernatant is then discarded and the beads were then washed 10 times with PBS. After PBS removing, 100 µl of elution buffer (10 mM reduced glutathione in 50 mM Tris–HCl, pH 8.0) was added at 4 °C during 10 min. After centrifugation at 500 rpm at 4 °C for 5 min, the supernatant was stored and the elution was repeated 4 to 5 times. Eluted material was pooled and monitored by protein quantification assay or analyzed by SDS-PAGE.

E. coli Top10 strains harboring pCAK38 (Gst–IcsB and IpgA–His); pNC3 (Gst–BopA and BicP–His), and pHI2 (His–IpgC and native IpaB; [17]) were cultured in L-broth supplemented with appropriate antibiotics for 2 h at 37 °C, and IPTG added to a final concentration of 0.1 mM. After an additional incubation for 3 h at 30 °C, bacteria were harvested; sonicated and His-tagged proteins were purified as described by the manufacturer using Cobalt resin (PIERCE). IpgA–His and BicP–His were purified directly from the Cobalts resin while native IpaB was co-purified thanks to its chaperone IpgC fused to 6his at its C-terminus [18–22].

2.4. Cholesterol binding assay

Cholesterol (Sigma) binding was assessed as has been previously described by Hayward et al. [23]. To prepare ³H-cholesterol–MβCD (methyl-beta-cyclodextrin) complexes, 1 volume of 1 mCi/ml [1α,2α(n)-³H-cholesterol (Amersham) was incubated during 20 min with 100 volumes of 10 mM MβCD (100 µl total volume, at room temperature). To separate complexes from free MβCD, the mixture was loaded onto a 5 ml of Sephacryl S100 column (Amersham), pre-equilibrated in 20 mM Tris–Cl, pH 7.4, 150 mM NaCl (TBS). Fractions 30 × 200 µl were collected, and aliquots removed for scintillation counting (Packard 1600 TR). Cholesterol-containing fractions were pooled and the concentration calculated from the specific activity. In the absence of MβCD, ³H-cholesterol was retained on the column due to its intrinsic insolubility.

For binding assays, purified proteins Gst–IcsB, (4 mg/mL diluted from 9 mg/mL stocks in TBS), Gst–IcsBΔCBD, Gst–IcsBY297F, Gst–Y340F, Gst–IcsBY297F–Y340F, Gst–BopA, IpaB as a positive control and Gst alone were diluted in 5 mM in TBS, and mixed with ³H-cholesterol–MβCD complexes (1.25 µM diluted from >0.25 mM stocks), and incubated (200 µl total volume, 20 min, room temperature). Samples were loaded onto a 5 ml Sephacryl S100 column (Amersham), pre-equilibrated and developed in TBS, and eluted fractions collected (30 × 200 µl). Aliquots were removed for scintillation counting and the remainder of each fraction analyzed by Bio-Rad protein quantification assay and by Coomassie-stained SDS-PAGE.

2.5. Cholesterol competitive binding assay

Dehydroergosterol [ergosta-5,7,9 (11),22-tetraen-3-β-ol] (DHE, Sigma) binding was assessed in order to monitor the cholesterol binding assay. DHE is a marine sterol from the red sea sponge *Biemna fortis*, which is structurally similar to cholesterol and is quenched in the aqueous phase in a more hydrophobic (protein-bound) environment. Briefly, purified Gst–IcsB, was incubated in the presence of an excess or in the absence of DHE diluted into 10 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl and incubated under reducing light conditions (200 µl total volume, 30 min at room temperature). 1 µl of ³H-cholesterol–MβCD complexes (1.25 µM) was added in each sample. Samples were then loaded onto a 5 ml Sephacryl S100 column (Amersham), pre-equilibrated in TBS, and eluted fractions were collected (30 × 200 µl). Aliquots were removed for scintillation counting and the remainder of each fraction was analyzed by the Bio-Rad protein assay and Coomassie blue-stained SDS-PAGE.

2.6. MDAMC cell culture and infection

Human breast carcinoma epithelial cells (MDAMC cells) were cultured in Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) supplemented with 2 mM glutamine and 10% fetal calf serum (Invitrogen). These MDAMC cells were transfected to stably express the autophagy marker, green fluorescent protein-tagged LC3 (GFP–LC3). One day before infection, 5 × 10⁴ MDAMC cells were seeded onto glass cover

slips in 24 well plates and incubated overnight at 37 °C with 7% of CO₂. Bacteria were grown according to established protocols. In brief, each strain of bacteria was grown overnight in 5 ml of Luria–Bertani (LB) broth from a single colony on a freshly streaked plate. A subsequent 1:100 dilution of the bacteria was made in 3 ml of Tryptic Soy Broth and then re-incubated until the optical density (wavelength at 600 nm) was between 0.4 and 0.6. An M.O.I of 100 was used for all subsequent autophagy experiments. Rapamycin (50 µg/ml; LKT labs, CO, USA) was used as a positive control for autophagy induction. Plates were centrifuged at 1100 rpm for 10 min. After a further 30 min, the cells were washed 3 times in warm sterile PBS and media was replaced with fresh DMEM containing gentamicin (100 µg ml⁻¹) to kill extra-cellular bacteria. At 4 h post-infection, cells (including controls) were washed 3 times in cold PBS and fixed with 4% paraformaldehyde. Cells were subsequently stained with DAPI before being mounted onto glass slides.

2.7. Quantification of bacteria associated with LC3–GFP

Bacterial autophagosome formation with each strain of *Shigella* was determined by fluorescence microscopy. For each condition, ≥ 50 cells/high power field were counted and experiments were performed in triplicate. The proportion of cells harboring bacterial autophagosomes and the proportion of bacteria per cell found within autophagosomes were enumerated. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism, Version 5.

3. Results

3.1. Residues 288–351 of IcsB contain the conserved sterol binding domain of elicitins

We first identified a significant sequence similarity between elicitins and IcsB using the FASTA program found on the UCLA-DOE (Los Angeles, USA) server. 29% of identity

(50% of similarity) was detected between the 61 C-terminal residues of elicitins and the 64 residues (288–351) of IcsB (Fig. 1). The first 3D crystal structure of member of the elicitin family, the β-cryptogein (CRY) secreted by *Phytophthora cryptogea*, was previously reported [24]. This elicitin is endowed with a very high level of necrotic activity and its folding is made of six α-helices and a beak-like motif composed of an anti-parallel two stranded β-sheet and a Ω-loop. This motif named SBD for “Sterol binding domain”, conserved among the elicitins family, is assumed to be a major recognition site for a putative receptor and/or ligand [24]. It forms part of helices α3, α4, α5, α6, the β-sheet and the Ω-loop. The crystal structure showed that the peptide sequence of elicitins is a large inner non-specific hydrophobic cavity which accommodates a large panel of polysterols as well as fatty acids, which compete for binding [24].

Recent studies showed that the T3SS effector BopA of *Burkholderia pseudomallei* has a similar function to IcsB in mediating bacterial evasion of autophagy [25]. BopA exhibits 23% identity with IcsB and in particular shows conservation of the SBD motif (Fig. 1). Interestingly, the two residues Y297 and Y340 of IcsB are well conserved in BopA; Y303 and Y346, and in elicitins; Y47 and Y87, respectively (Fig. 1). The role of Y47 and Y87 in sterol binding was already reported [26,27]. Thus, we hypothesized here that IcsB and BopA are potential cholesterol binding proteins.

3.2. IcsB specifically interacts with cholesterol

To investigate the capacity of purified IcsB to bind cholesterol in vitro, we constructed plasmid pCAK8 producing Gst–IcsB (Gst fused to the entire IcsB) and its chaperone IpgA and plasmid pCAK30 producing Gst–IpgA (Gst fused to the entire IpgA) and performed gel filtration assays. Cholesterol binding to Gst–IcsB, Gst–IpgA or to Gst alone was assessed according to the method described by Hayward et al. [23]. Standard equilibrium binding analysis is limited by cholesterol insolubility in aqueous solution. A gel filtration

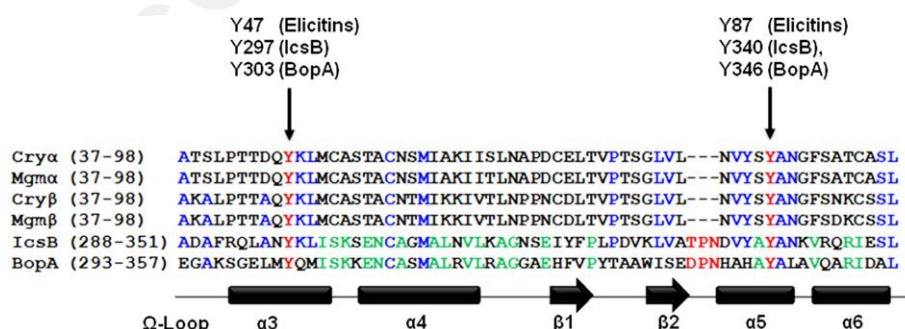


Fig. 1. IcsB and BopA contain the sterol binding domain. Amino-acid sequence alignments: elicitins (α = acidic, β = basic), symbols: Cryα and Cryβ, Cryptogeins from *Phytophthora cryptogea* and Mgmα and Mgmβ, megaspermins from *Phytophthora megasperma*; IcsB from *Shigella flexneri* and BopA from *Burkholderia pseudomallei*. Identification of a conserved domain between elicitins and IcsB using the FASTA program from the UCLA-DOE (Los Angeles, USA) server. The 61 (37–98) C-terminal residues of elicitins share 29% of identity and 50% of similarity with residues 288–351 of IcsB. IcsB residues 288–351 share 47% identity (65% of similarity) with residues 293–357 of BopA. Arrows point to two conserved tyrosine residues that are involved in sterol binding by the elicitins (in red). Conserved residues between BopA and IcsB are indicated in green; and in blue between BopA or IcsB and other elicitins. The TPN and DPN motifs, found in IcsB and BopA (indicated in red), are missing in the elicitin family of proteins. The alpha, beta and omega domains are based onto the 3D crystal structure of the elicitins family [24]. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

based assay exploiting the ability of the water-soluble saccharide methyl-cyclodextrin (M β CD) to form inclusion complexes with cholesterol was therefore employed. ^3H -cholesterol was mixed with 10 mM M β CD, radiolabelled complexes were separated from free M β CD by gel filtration chromatography, and the solubilized ^3H -cholesterol concentration was calculated by scintillation counting (Fig. 2A).

Purified Gst-IcsB or IpaB used here as a positive control, was subsequently incubated with isolated M β CD- ^3H -cholesterol followed by a gel filtration assay. M β CD- ^3H -cholesterol complexes alone were eluted in later fractions (Fig. 2B, peak fraction 23). However, when pre-incubated with purified Gst-IcsB, IpaB or Gst alone, ^3H -cholesterol co-eluted with Gst-IcsB and IpaB containing earlier fractions (Fig. 2B, peak fraction 11) but not with Gst alone. When equivalent pre-incubation was done with purified IpgA and M β CD- ^3H -cholesterol, two complexes were eluted separately (Fig. 2C), IpgA peak appears at fractions 12–13 while the M β CD- ^3H -cholesterol one is seen in fraction 23. However, we noticed that loading GST alone on the Sepharose column leads to retention of M β CD- ^3H -cholesterol on the column since no peak was seen between fractions 20 and 26 (Fig. 2B).

To confirm the formation of the IcsB-cholesterol complex, we used a competitive binding assay using DHE (see Methods). Purified Gst-IcsB was first pre-incubated either in the absence or in an excess of DHE and secondly incubated with isolated M β CD- ^3H -cholesterol complexes and analyzed by gel filtration chromatography as described above. As expected, M β CD- ^3H -cholesterol was co-eluted with Gst-IcsB containing earlier fractions in the absence of DHE but not in its presence (Fig. 2D). This result clearly indicates that IcsB specifically bound cholesterol.

3.3. BopA is chaperoned by BicP and binds cholesterol

Many of the virulence-associated proteins secreted via the T3SS have been shown to require distinct cytoplasmic chaperones. The absence of chaperones reduces secretion of the specific substrate protein(s), and the chaperone-less target protein is often rapidly degraded [18–22]. The *S. flexneri* IpgA protein, encoded by a gene located immediately downstream of *icsB*, serves as a chaperone required for IcsB stability [28]. Similarly, the *bicP* gene of *B. pseudomallei*, located downstream of *bopA*, encodes a putative chaperone [29,30]. In order to purify BopA and to check its ability or not to bind cholesterol, we first constructed plasmid

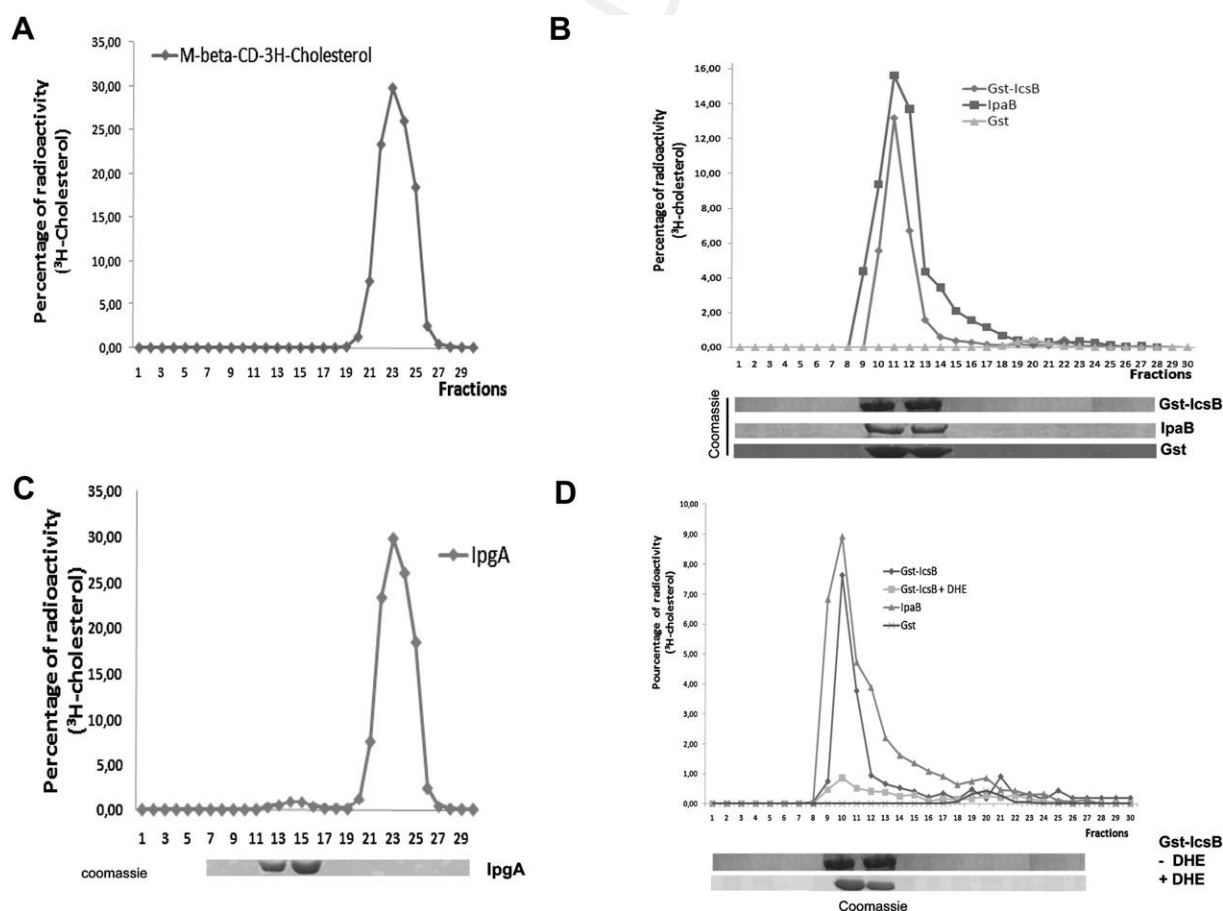


Fig. 2. IcsB binds cholesterol in vitro. (A). M β CD- ^3H -cholesterol alone, (B) after pre-incubation with purified proteins at 4 mg/ml each: Gst-IcsB, IpaB (as a positive control), and Gst (as negative control) and (C) Gst-IpgA. (D). Purified Gst-IcsB (4 mg/ml) was pre-incubated either in the absence or in the presence of an excess of Dehydroergosterol (DHE) during 30 min at room temperature and then mixed with M β CD- ^3H -cholesterol and incubated for an additional 1 h. Purified proteins were eluted from 5 ml of Sephacryl S100 column. Aliquots from each of the 30 fractions (F1–F30) were analyzed by scintillation, quantified by the Bio-Rad protein assay, and visualized on Coomassie blue-stained SDS-PAGE. Graphs show the calculated percentage of radioactivity (^3H -cholesterol) per fraction.

pNC4 producing Gst-BopA and failed to produce it since it was barely detectable (not shown). A similar result was obtained using pCAK17 producing Gst-IcsB without its chaperone IpgA (not shown). To investigate the capacity of BicP to stabilize BopA, we constructed plasmids: pNC2 (Gst-BopA and BicP and pNC3 (Gst-BopA and BicP-his)) (Fig. 3B). As a control we used pCAK8 (Gst-IcsB and IpgA) and constructed pCAK38 (Gst-IcsB and IpgA-his) (Fig. 3A). Proteins of the bacterial lysates were pulled-down with sepharose-glutathione (see Methods), separated on SDS-PAGE and analyzed either by Coomassie blue staining or by immunoblotting using anti-Gst or anti-His antibodies. As shown in Fig. 2B, BicP and BicP-His copurify with Gst-BopA. As a control IpgA and IpgA-His, were also pulled-down with Gst-IcsB (Fig. 3B). We conclude that BicP acts as a chaperone for BopA by preventing its degradation.

Since the CBD domain of IcsB is highly conserved in BopA (Fig. 1), we next assessed the ability of Gst-BopA to bind cholesterol upon incubation with isolated M β CD-³H-cholesterol and gel filtration. ³H-cholesterol co-eluted in earlier fractions (peak at fraction 11) with both Gst-BopA and Gst-IcsB while no interaction was seen with Gst alone (Fig. 3C). We conclude that BopA, like IcsB, interacts specifically with cholesterol.

3.4. Mutational and functional analysis of the IcsB-cholesterol binding domain (CBD)

To test whether the conserved domain of IcsB, akin to the SBD of elicins, is involved in cholesterol binding activity, we

generated a variant of Gst-IcsB lacking residues 297–340 (Gst-IcsB $^{\Delta$ CBD) and showed that it was unable to interact with M β CD-³H-cholesterol (Fig. 4A and B). Thus, the domain Q³ encompassing residues 297–340 was named CBD (for Cholesterol Binding Domain). The two residues Y297 and Y340 of IcsB located within CBD are conserved with Y47 and Y87 required for elicitor binding to sterol [24,31] and Fig. 1. To further test the role of these residues in cholesterol binding, we generated three Gst-IcsB variants with either single mutation Y297F (tyrosine replacement by phenylalanine) or Y340F; or a double one Y297F-Y340F. Purified Gst-IcsB variants were tested for their capacity to bind cholesterol. Single mutation of either Y297F or Y340F slightly reduces cholesterol accommodation by around 20% (Fig. 4B), whereas variant Y297F-Y340F behaves like Gst as its interaction with M β CD-³H-cholesterol was reduced by up to 80% compared to wild-type IcsB (Fig. 4B). We conclude that both tyrosine residues 297 and 340 of IcsB play a crucial role in efficient cholesterol binding.

3.5. Shigella induces autophagy in MDAMC cells

It has been previously reported that a *Shigella* *icsB* mutant does not escape autophagy, in epithelial cells, as efficiently as the wild-type strain [2]. Here we used MDAMC cells (human breast carcinoma epithelial cells) that were stably transformed to express the autophagy marker, GFP-LC3. In order to confirm the findings of Ogawa et al., cells were initially infected with the wild-type *Shigella* M90T or the *icsB* strain. At 4 h post-infection,

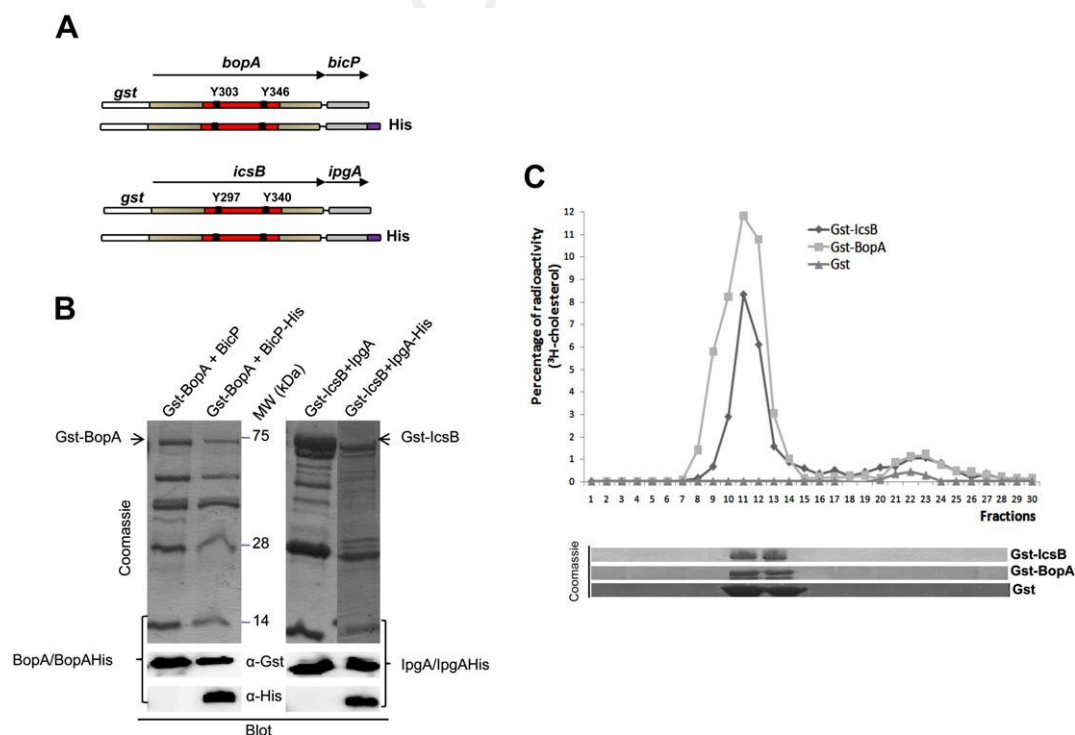


Fig. 3. BopA requires the BicP chaperone for its stability and interacts with cholesterol in vitro. (A) Schematic representation of Gst fused proteins and their corresponding chaperones: Gst-IcsB and IpgA or Gst-IcsB and IpgA-His, Gst-BopA and BicP or Gst-BopA and BicP-His. Y297 and Y340, Y303 and Y346 are conserved residues for IcsB and BopA respectively. (B) BicP is required for BopA stabilization. Coomassie blue staining of purified protein fusion (Top) and western-blot was performed using anti-Gst or anti-his antibodies. (C) 4 mg/ml of each purified protein: Gst-IcsB, Gst-BopA, or Gst were incubated with M β CD-³H-cholesterol and loaded onto 5 ml of Sephacryl S100 column. Aliquots from each eluted fraction were analyzed as described in Fig. 2.

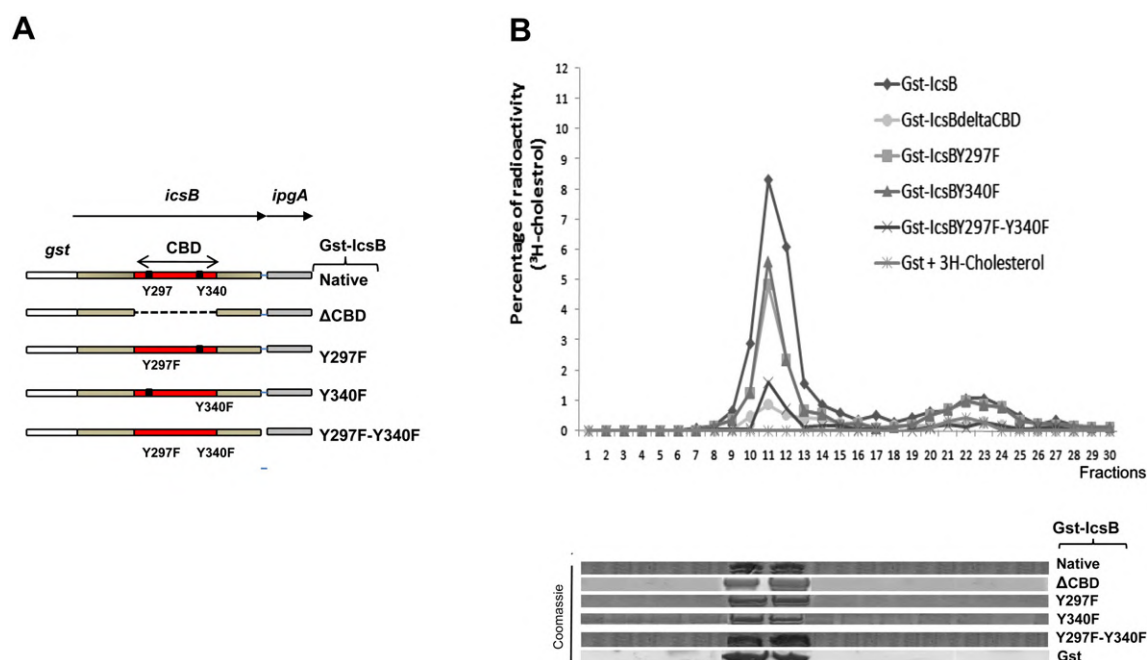


Fig. 4. Mutational and functional analysis of the cholesterol binding domain (CBD) of IcsB. (A): Schematic representation of plasmids encoding the chaperone IpgA, native Gst-IcsB or its derivatives obtained by mutations in the CBD domain. (B). 4 mg/ml of purified Gst-IcsB; Gst-IcsB Δ CBD; Gst-IcsBY297F; Gst-IcsBY340F; or Gst-IcsBY297F-Y340F were incubated with M β CD- 3 H-cholesterol, loaded and eluted from 5 ml of Sephacryl S100 column. Aliquots from each eluted fraction were analyzed as described in Fig. 2.

10.3% and 22.9% of the wild-type or *icsB* bacteria respectively were within bacterial autophagosomes (data not shown). These results confirm that the *icsB* mutant is not able to evade autophagy as efficiently as wild type. To further confirm this finding, the number of cells harboring bacterial autophagosomes was enumerated. Following infection with wild-type *Shigella*, 9.4% of cells were associated with autophagosomes, in comparison to 19.8% following *icsB* mutant infection (Fig. 5B). Rapamycin, an inhibitor of mTOR, induces autophagy and was used for each experiment as a positive control (data not shown).

3.6. Deletion of the CBD abolishes the anti-autophagy function of IcsB

We next investigated whether the ability of IcsB to bind cholesterol was coupled to its anti-autophagy function. To assess this hypothesis, we constructed pAB9.4, a derivative of a pAB9 plasmid constitutively expressing wild-type IcsB from the *lacZ* promoter ([16]; Fig. 5A) by deleting the entire CBD domain (see Methods). IcsB Δ CBD when expressed in the *icsB* mutant shows a much higher level of autophagy compared to wild-type strain (Fig. 5B). The level of pAB9.4 bacteria associated with autophagosomes was 20% which is comparable to the *icsB* mutant and twice higher than wild-type strain (Fig. 5B and C). To provide further evidence, the numbers of cells associated with autophagosomes were also calculated. The difference between pAB9 (producing native IcsB) and pAB9.4 and between M90T and pAB9.4 remained at about 8–9% indicating that CBD deletion consequently impairs the ability of the bacteria to evade autophagy.

3.7. Mutations of tyrosine residues Y297 and Y340 enhance *Shigella* autophagy

To investigate the individual role of tyrosine Y297 and Y340, in IcsB function, we generated three plasmids: pAB9.1 (IcsBY297F), pAB9.2 (IcsBY340F), and pAB9.3 (IcsBY297F-Y340F) that were used to complement the *icsB* mutant (Fig. 5A). The resulting strains were used to infect MDAMC cells. When looking at the number of cells associated with autophagosomes, infection with *icsB*/pAB9.1 or *icsB*/pAB9.2 results in 14.1% of LC3 positive cells which is higher than the WT (10%) (Fig. 5B), indicating that both targeted tyrosine residues play a notable role in autophagy. Looking at the infection with *icsB*/pAB9.3 provides more evidence for tyrosine residues playing a role in autophagy. Indeed, the level of *icsB*/pAB9.3 bacteria associated with autophagosomes is about 20% which is similar to *icsB*/pAB9.4 (IcsB Δ CBD) (Fig. 5B). We conclude that the anti-autophagy function of IcsB is directly coupled to its capacity to bind cholesterol.

3.8. Deletion of CBD domain has no effect on IcsB binding to VirG/IcsA

It was previously reported that IcsB binding to VirG/IcsA is crucial to prevent autophagy by *Shigella* [2]; however the IcsB interacting domain was not identified yet. Here, we took advantage of Gst-IcsB to study its interaction with IcsA that is constitutively secreted in the media upon *Shigella* growth. Q4 Concentrated supernatant proteins from the *icsB* mutant were passed through a Gst-IcsB pre-coated to glutathion sepharose

3

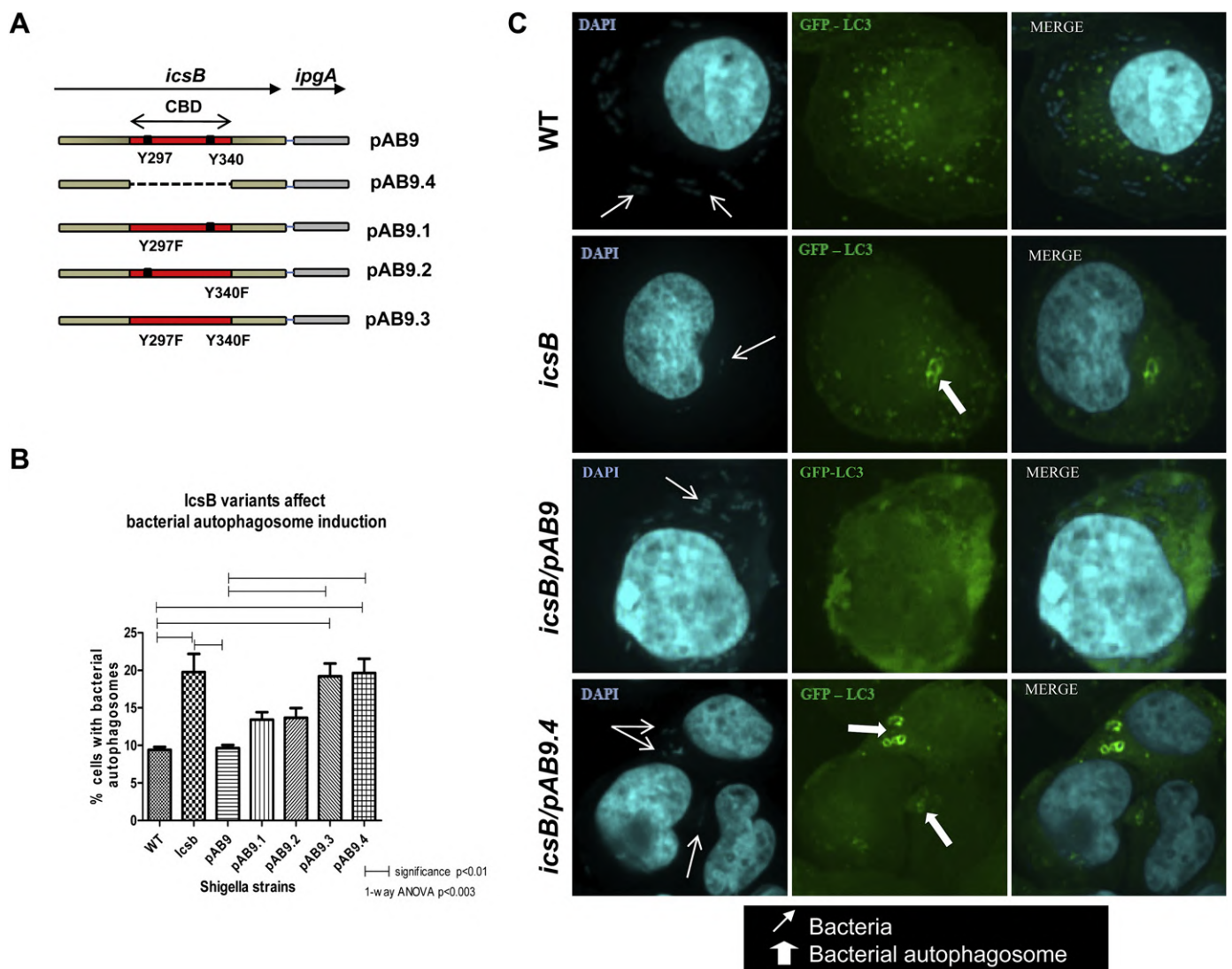


Fig. 5. The anti-autophagy function of IcsB is coupled to its ability to bind cholesterol. (A) Plasmids used for the complementation of the *icsB* mutant. (B) Quantification of bacterial autophagosome induction in cells by the different *Shigella* strains. (C) Sample images of bacterial evasion or induction of autophagy by wild-type, *icsB*, *icsB/pAB9*, and *icsB/pAB9.4* strains; blue, DAPI (DNA intercalating dye); green, GFP-LC3; thin arrows, bacteria; block arrows, bacterial autophagosomes. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

column. Upon elution, analysis of proteins eluted and monitored by western-blotting using an anti-IcsA monoclonal antibody confirm that Gst-IcsB is effectively able to interact with cleaved and secreted IcsA. As a control IcsA was not co-purified with Gst alone (Fig. 1S). To test whether our four Gst-IcsB variants (Y287F; Y340F; Y287F-Y340F; Δ CBD) retained their ability to interact with IcsA, we performed a Gst-pull down assay. As indicated in Fig. 1S, all tested variants were able to interact with IcsA although at a slightly different manner. We conclude that the CBD domain is dispensable for IcsA binding, indicating that the interacting domain to IcsA is located somewhere else on IcsB.

4. Discussion

In this study, we report for the first time that IcsB interacts with cholesterol *in vitro*. We identified the cholesterol binding domain in IcsB and report biochemical and functional evidence

demonstrating the importance of plasma membrane cholesterol in evading autophagy by *Shigella*. Moreover, a similar protein in *B. pseudomallei*, BopA, also important for autophagy evasion, can also interact with cholesterol. Deletion or mutation of the cholesterol binding domain within IcsB impacted on the ability of this virulence protein to mediate autophagy evasion by *Shigella*. These findings demonstrate the important link between cholesterol binding of these virulence factors and their ability to evade autophagosome formation by the host.

The conservation of the 61C-terminal residues of elicins, which are a family of small proteins secreted by species of *Phytophthora* that interact with sterols, and 64 residues (288–351) in IcsB leads us to postulate that one molecule of IcsB could accommodate one molecule of cholesterol. Modeling IcsB and BopA onto the 3D structure of elicins revealed that the 64 residues peptide of these proteins is located on the surface of the molecule, which has been suspected to be involved in cell toxicity, where the Y47/Y87

are located and form part of $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, β -sheet and Ω -loop [24]. Moreover, Y47, the only polar side chain amino acid lining the putative binding cavity of ergosterol [24], and Y87 are each part of the two stretches of 6 identical residues in IcsB. One possible consequence of the accommodation of cholesterol by IcsB and BopA would be the disruption of the mammalian membrane structure, allowing *Shigella* and *B. pseudomallei* to escape autophagy.

The CBD of IcsB is critical for its function, since its removal significantly increased autophagosome formation. Further evidence for this is provided by looking at the crystal structures of elicins binding to sterols and cryptogein binding to cholesterol [31,32]. Accordingly, one can see that two tyrosines play a role in binding to cholesterol. This is consistent with our results obtained upon deletion of CBD or mutation of the two tyrosine residues that impair the function of IcsB in escaping autophagy. Comparatively, previous observations revealed the crucial role played by Y47/Y87 in sterol–elicins interactions. It was proposed that, in the native cryptogein, Y87 stays in the hydrophobic cavity [31–34], whereas in the sterol-loaded cryptogein, it rotates and becomes exposed to solvent [32]. The tyrosine residue, because of its hydrophilic hydroxyl, could be in contact with the aqueous environment, whereas the hydrophobic phenylalanine residue could not. The Y87F replacement in cryptogein elicitor protein leads to the most altered interaction to sterol compared to Y47F. Comparatively, both IcsB mutations Y297F and Y340F exhibit the same cholesterol binding defect.

IcsB interaction with IcsA/VirG was reported to facilitate the ability of *Shigella* to evade autophagy. Here, we show that the CBD domain is not involved in IcsA binding, suggesting that the ability of IcsB to bind cholesterol and IcsA involves distinct domains. Comparatively, BimA, which is responsible for actin-based motility in *B. pseudomallei*, shares a very low similarity with IcsA (11% amino acid identity) [35]. Furthermore, the IcsA binding domain to Atg5 (residues 320 through 433) [2], is missing in BimA. Therefore, it appears unlikely that BopA facilitates bacterial evasion of autophagy in a manner similar to IcsB by preventing Atg5 binding to BimA. However, we cannot rule out that the role of IcsA may take part kinetically later, in other words, once IcsB has achieved its interaction with cholesterol. This could not exclude the possibility that IcsB or BopA interaction with cholesterol should involve the recruitment of other bacterial outer membrane protein(s) which are specifically targeted by Atg5 or other proteins involved in autophagy.

Interestingly, it has been recently shown that a predicted domain called RID (for Rho GTPase inactivation domain), which has been discovered in the multifunctional autoprocessing RTX toxin RtxA from *Vibrio cholera*, is also present in IcsB and BopA. The RID domain causes actin depolymerization and rounding of host cells through inactivation of the small Rho GTPases Rho, Rac, and Cdc42. It was reported that RID could adopt a circularly permuted papain-like thiol protease fold with a conserved cysteine and histidine catalytic diad [36]. RID domains could function as proteolytic enzymes or acyltransferases acting on host molecules suggesting that IcsB or BopA may promote bacterial escape from degradation

not only by the direct or indirect recruitment of Atg5, but also by interfering with eukaryotic components required in the stimulation of autophagy pathways. IcsB could help protecting VirG by proteolysis of Atg5, or via an acyltransferase activity that abolishes the interaction between VirG and Atg5. Contrary to the actin depolymerization phenotype caused by the RID domain, IcsB indirectly facilitates actin polymerization by protecting VirG from being recognized by the host autophagy machinery. Close homologs of IcsB and BopA were only identified in *Shigella* and *Burkholderia* species. The regions homologous to RID domains are located at the C-termini of these proteins while the 120N-terminal residues harbor a SicP binding domain that maintains the stability of certain bacterial proteins and assists their secretion [37]. In this study, we report the first demonstration about the chaperone role of BicP which plays a role in BopA stabilization.

Cholesterol is an important structural component of membranes and is considered as an essential organizer of membrane subdomains [38] and its accumulation in pathogenic vacuoles could represent a strategy to limit lysosomal recognition. The *Salmonella* effector SseJ, a glycerolipid–cholesterol acyltransferase, depletes cholesterol from the *Salmonella*-containing vacuole (SCV) membrane via acylation of free cholesterol [39]. SseJ and SifA regulate membrane tubulation and Sif formation [40], pointing out a crucial role for cholesterol levels in SCV membrane dynamics. Depletion of cholesterol in macrophages infected with *Mycobacterium avium* triggers phagolysosomal fusion and bacterial degradation [41]. Cholesterol depletion from the *Brucella*-containing vacuole (BCV) membrane by cyclic β -glucans presumably shed from the *Brucella* periplasm facilitates lysosomal evasion and interactions with endoplasmic reticulum [42]. Cholesterol is also an abundant component of *Chlamydia* inclusion membranes, and free cholesterol is incorporated into bacterial membranes [43]. Cholesterol levels also regulate lysosomal function. Accumulation in late endosomes/phagosomes inhibits fusion with lysosomes [44], while its depletion disrupts lysosome membrane permeability [45]. Recently it was shown that cholesterol depletion may interrupt autophagosome maturation, resulting in the accumulation of immature autophagosomes and an increase in LC3-II level [46].

In conclusion, our results bring new insights into how T3 secreted effectors bind cholesterol in order to promote evasion of bacterial autophagy. Very recently it was reported that *Shigella* phagocytic vacuolar membrane remnants participate in the cellular response to pathogen invasion and are regulated by autophagy [47,48]. Further studies are required to characterize which other molecular complexes are recruited upon IcsB–cholesterol binding and which cell signalling cascades are triggered during late *Shigella* infection. *S. flexneri* therefore offers a model system of choice for the study of how cholesterol dynamics participate in bacterial spreading.

Acknowledgments

We are grateful to P. Sansonetti and C. Parsot for their continuous encouragements and helpful discussions of data

before publication. We would like to thank P. Wattiau for providing us with chromosomal DNA of *Burkholderia* strains and C. Parsot for the generous gift of the IcsA/VirG mab. We thank Dr C. Munz for his kind gift of MDAMC cells expressing GFP-LC3. We also thank A. Sener and K. Louchami for their valuable advices and facilities and K. Sendide from the AUI for helpful discussion. This work was supported; in part, by the FNRS (convention F 3.4623.06), and by E. Defay and A and D. Van Buuren foundations. S.H. is supported by a research fellowship from the Canadian Association of Gastroenterology/Crohn's and Colitis Foundation of Canada/the Canadian Institutes of Health Research. D.P. is supported by the Canadian Institutes of Health Research and the Howard Hughes Medical Institute.

Appendix. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at [doi:10.1016/j.micinf.2010.06.006](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.06.006).

References

- [1] D.J. Klionsky, S.D. Emr, Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation, *Science* 290 (2000) 1717–1721.
- [2] M. Ogawa, T. Yoshimori, T. Suzuki, H. Sagara, N. Mizushima, C. Sasakawa, Escape of intracellular *Shigella* from autophagy, *Science* 307 (2005) 727–731.
- [3] S.B. Singh, A.S. Davis, G.A. Taylor, V. Deretic, Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria, *Science* 313 (2006) 1438–1441.
- [4] B. Levine, V. Deretic, Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 767–777.
- [5] R.M. Andrade, M. Wessendarp, M.J. Gubbels, B. Striepen, C.S. Subauste, CD40 induces macrophage anti-*Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 2366–2377.
- [6] V. Deretic, B. Levine, Autophagy, immunity, and microbial adaptations, *Cell Host Microbe* 5 (2009) 527–549.
- [7] Y.M. Ling, M.H. Shaw, C. Ayala, I. Coppens, G.A. Taylor, D.J. Ferguson, G.S. Yap, Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages, *J. Exp. Med.* 203 (2006) 2063–2071.
- [8] M.L. Bernardini, J. Mounier, H. d'Hauteville, M. Coquis-Rondon, P.J. Sansonetti, Identification of *icsA*, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 (1989) 3867–3871.
- [9] S. Kamoun, M. Young, H. Forster, M.D. Coffey, B.M. Tyler, Potential role of elicitors in the interaction between *Phytophthora* species and tobacco, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 1593–1598.
- [10] H. Keller, J.P. Blein, P. Bonnet, P. Ricci, Physiological and molecular characteristics of elicitor-induced systemic acquired resistance in tobacco, *Plant Physiol.* 110 (1996) 365–376.
- [11] V. Mikes, M.L. Milat, M. Ponchet, F. Panabieres, P. Ricci, J.P. Blein, Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245 (1998) 133–139.
- [12] S. Vauthrin, V. Mikes, M.L. Milat, M. Ponchet, B. Maume, H. Osman, J. P. Blein, Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1419 (1999) 335–342.
- [13] P.J. Sansonetti, D.J. Kopecko, S.B. Formal, Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*, *Infect. Immun.* 35 (1982) 852–860.
- [14] A. Allaoui, P.J. Sansonetti, C. Parsot, MxiJ, a lipoprotein involved in secretion of *Shigella* Ipa invasins, is homologous to YscJ, a secretion factor of the Yersinia Yop proteins, *J. Bacteriol.* 174 (1992) 7661–7669.
- [15] M. Rathman, N. Jouirhi, A. Allaoui, P. Sansonetti, C. Parsot, G. Tran Van Nhieu, The development of a FACS-based strategy for the isolation of *Shigella flexneri* mutants that are deficient in intercellular spread, *Mol. Microbiol.* 35 (2000) 974–990.
- [16] A. Allaoui, J. Mounier, M.C. Prevost, P.J. Sansonetti, C. Parsot, *icsB*: a *Shigella flexneri* virulence gene necessary for the lysis of protrusions during intercellular spread, *Mol. Microbiol.* 6 (1992) 1605–1616.
- [17] A.L. Page, M. Fromont-Racine, P. Sansonetti, P. Legrain, C. Parsot, Characterization of the interaction partners of secreted proteins and chaperones of *Shigella flexneri*, *Mol. Microbiol.* 42 (2001) 1133–1145.
- [18] P. Wattiau, G.R. Cornelis, SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in Ohe secretion of YopE, *Mol. Microbiol.* 8 (1993) 123–131.
- [19] P. Wattiau, S. Woestyn, G.R. Cornelis, Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria, *Mol. Microbiol.* 20 (1996) 255–262.
- [20] Y. Fu, J.E. Galan, Identification of a specific chaperone for SptP, a substrate of the centisome 63 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 3393–3399.
- [21] A. Abe, M. de Grado, R.A. Pfuetzner, C. Sanchez-Sanmartin, R. Devinney, J.L. Puente, N.C. Strynadka, B.B. Finlay, Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, requires a specific chaperone for stable secretion, *Mol. Microbiol.* 33 (1999) 1162–1175.
- [22] A.L. Page, C. Parsot, Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades, *Mol. Microbiol.* 46 (2002) 1–11.
- [23] R.D. Hayward, R.J. Cain, E.J. McGhie, N. Phillips, M.J. Garner, V. Koronakis, Cholesterol binding by the bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells, *Mol. Microbiol.* 56 (2005) 590–603.
- [24] G. Boissy, E. de La Fortelle, R. Kahn, J.C. Huet, G. Bricogne, J.C. Pernollet, S. Brunie, Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins, *Structure* 4 (1996) 1429–1439.
- [25] M. Cullinane, L. Gong, X. Li, N. Lazar-Adler, T. Tra, E. Wolvetang, M. Prescott, J.D. Boyce, R.J. Devenish, B. Adler, Stimulation of autophagy suppresses the intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei* in mammalian cell lines, *Autophagy* 4 (2008) 744–753.
- [26] H. Osman, S. Vauthrin, V. Mikes, M.L. Milat, F. Panabieres, A. Marais, S. Brunie, B. Maume, M. Ponchet, J.P. Blein, Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor–sterol complexes, *Mol. Biol. Cell* 12 (2001) 2825–2834.
- [27] H. Osman, V. Mikes, M.L. Milat, M. Ponchet, D. Marion, T. Prange, B.F. Maume, S. Vauthrin, J.P. Blein, Fatty acids bind to the fungal elicitor cryptogein and compete with sterols, *FEBS Lett.* 489 (2001) 55–58.
- [28] M. Ogawa, T. Suzuki, I. Tatsuno, H. Abe, C. Sasakawa, IcsB, secreted via the type III secretion system, is chaperoned by IpgA and required at the post-invasion stage of *Shigella* pathogenicity, *Mol. Microbiol.* 48 (2003) 913–931.
- [29] R.A. Moore, S. Reckseidler-Zenteno, H. Kim, W. Nierman, Y. Yu, A. Tuanyok, J. Warawa, D. DeShazer, D.E. Woods, Contribution of gene loss to the pathogenic evolution of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*, *Infect. Immun.* 72 (2004) 4172–4187.
- [30] S.E. Schutzer, L.R. Schlater, C.M. Ronning, D. DeShazer, B.J. Luft, J.J. Dunn, J. Ravel, C.M. Fraser-Liggett, W.C. Nierman, Characterization of clinically-attenuated *Burkholderia mallei* by whole genome sequencing: candidate strain for exclusion from Select Agent lists, *PLoS One* 3 (2008) e2058.
- [31] M.B. Lascombe, M. Ponchet, P. Venard, M.L. Milat, J.P. Blein, T. Prange, The 1.45 Å resolution structure of the cryptogein–cholesterol complex: a close-up view of a sterol carrier protein (SCP) active site, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 58 (2002) 1442–1447.
- [32] G. Boissy, M. O'Donohue, O. Gaudemer, V. Perez, J.C. Pernollet, S. Brunie, The 2.1 Å structure of an elicitor–ergosterol complex: a recent

- addition to the Sterol Carrier Protein family, *Protein Sci.* 8 (1999) 1191–1199.
- [33] S. Fefeu, S. Bouaziz, J.C. Huet, J.C. Pernellet, E. Guittet, Three-dimensional solution structure of beta cryptogein, a beta elicitor secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*, *Protein Sci.* 6 (1997) 2279–2284.
- [34] P.R. Gooley, M.A. Keniry, R.A. Dimitrov, D.E. Marsh, D.W. Keizer, K. R. Gayler, B.R. Grant, The NMR solution structure and characterization of pH dependent chemical shifts of the beta-elicitor, cryptogein, *J. Biomol. NMR* 12 (1998) 523–534.
- [35] M.P. Stevens, J.M. Stevens, R.L. Jeng, L.A. Taylor, M.W. Wood, P. Hawes, P. Monaghan, M.D. Welch, E.E. Galyov, Identification of a bacterial factor required for actin-based motility of *Burkholderia pseudomallei*, *Mol. Microbiol.* 56 (2005) 40–53.
- [36] J. Pei, N.V. Grishin, The Rho GTPase inactivation domain in *Vibrio cholerae* MARTX toxin has a circularly permuted papain-like thiol protease fold, *Proteins* 77 (2009) 413–419.
- [37] C.E. Stebbins, J.E. Galan, Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion, *Nature* 414 (2001) 77–81.
- [38] M. Edidin, The state of lipid rafts: from model membranes to cells, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32 (2003) 257–283.
- [39] N.S. Lossi, N. Rolhion, A.I. Magee, C. Boyle, D.W. Holden, The *Salmonella* SPI-2 effector SseJ exhibits eukaryotic activator-dependent phospholipase A and glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase activity, *Microbiology* 154 (2008) 2680–2688.
- [40] M.B. Ohlson, Z. Huang, N.M. Alto, M.P. Blanc, J.E. Dixon, J. Chai, S.I. Miller, Structure and function of *Salmonella* SifA indicate that its interactions with SKIP, SseJ, and RhoA family GTPases induce endosomal tubulation, *Cell Host Microbe* 4 (2008) 434–446.
- [41] C. de Chastellier, L. Thilo, Cholesterol depletion in *Mycobacterium avium*-infected macrophages overcomes the block in phagosome maturation and leads to the reversible sequestration of viable mycobacteria in phagolysosome-derived autophagic vacuoles, *Cell Microbiol.* 8 (2006) 242–256.
- [42] B. Arellano-Reynoso, N. Lapaque, S. Salcedo, G. Briones, A.E. Ciocchini, R. Ugalde, E. Moreno, I. Moriyo, J.P. Gorvel, Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival, *Nat. Immunol.* 6 (2005) 618–625.
- [43] R.A. Carabeo, D.J. Mead, T. Hackstadt, Golgi-dependent transport of cholesterol to the *Chlamydia trachomatis* inclusion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 6771–6776.
- [44] K.K. Huynh, E. Gershenson, S. Grinstein, Cholesterol accumulation by macrophages impairs phagosome maturation, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 35745–35755.
- [45] D. Deng, N. Jiang, S.J. Hao, H. Sun, G.J. Zhang, Loss of membrane cholesterol influences lysosomal permeability to potassium ions and protons, *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2009) 470–476.
- [46] S. Ishibashi, T. Yamazaki, K. Okamoto, Association of autophagy with cholesterol-accumulated compartments in Niemann-Pick disease type C cells, *J. Clin. Neurosci.* 16 (2009) 954–959.
- [47] N. Dupont, S. Lacas-Gervais, J. Bertout, I. Paz, B. Freche, G.T. Van Nhieu, F.G. van der Goot, P.J. Sansonetti, F. Lafont, *Shigella* phagocytic vacuolar membrane remnants participate in the cellular response to pathogen invasion and are regulated by autophagy, *Cell Host Microbe* 6 (2009) 137–149.
- [48] N. Dupont, F. Lafont, How autophagy regulates the host cell signaling associated with the postpartum bacteria cocoon experienced as a danger signal, *Autophagy* 5 (2009) 1222–1223.



***D*iscussion**

Discussion

1. ASSEMBLAGE DE L'APPAREIL D'EXPORTATION

1.1. De la consolidation de l'appareil d'exportation à la connexion entre Spa40 et Spa32.

L'assemblage de l'aiguille du système de sécrétion SST3 est un processus soigneusement orchestré à plusieurs niveaux, nécessitant la coordination de nombreuses protéines dans le cytosol, dans les deux membranes et à la surface de la cellule bactérienne. Dans cette thèse, nous avons étudié le rôle de la protéine Spa40 et avons apporté des preuves structurales et fonctionnelles s'appuyant sur des expériences d'interactions moléculaires de la protéine Spa40 avec plusieurs composants du SST3, comme Spa32, Spa33, Spa47, MxiK, MxiK et MxiA.

Des études de double hybride chez la levure ont confirmé nos données de « GST pull-down » montrant une interaction entre Spa32 et le domaine cytoplasmique de Spa40 [285]. Nous avons également montré que cette interaction fait intervenir les résidus 309 à 342 de Spa40, partie intégrante du domaine CC de la protéine. Le rôle crucial de Spa40 dans le système SST3 fut déjà reporté par Sassakawa *et al.* [57] lors de l'étude de mutants obtenus par insertion du transposon *Tn5*. Pour mieux comprendre le rôle de ce domaine CC dans la virulence de *Shigella*, nous avons construit un mutant non polaire de *spa40* et avons montré qu'il ne présente pas d'aiguille à sa surface. Par microscopie électronique de transmission, nous avons observé que la base du sécrétion du mutant *spa40* présente un défaut de densité qui pourrait correspondre à la localisation de Spa40, fournissant par là même, des données identifiant Spa40 comme un composant membranaire de l'appareil d'exportation [286].

Spa40, vers la compréhension du mécanisme de changement de spécificité

Malgré de nombreux travaux réalisés sur l'étude des protéines Spa40 et Spa32, aucune étude n'avait éclairci le mécanisme de changement de spécificité de substrats du SST3, à savoir de la sécrétion des composants de l'aiguille jusqu'aux protéines Ipas.

Afin de mieux comprendre ce mécanisme, nous avons choisi de caractériser le rôle du domaine cytoplasmique de Spa40. Pour ce faire, nous avons étudié l'effet de mutations

ponctuelles (G224F, A286V, L310A et V320K) dans ce domaine. La mutation des résidus G224 et A286, bien conservés entre homologues (YscU/FlhB), n'affecte pas la fonction de Spa40 dans la sécrétion. Par contre, les mutations des résidus L310 et V320, conservés eux aussi entre homologues, abolissent complètement la fonction de Spa40. De manière surprenante, ces mutations empêchent non seulement l'interaction avec Spa32 mais également l'assemblage de l'appareil de sécrétion, suggérant un rôle précoce de ce domaine dans l'assemblage du SST3 avant celui du switch de spécificité de substrat. Le résidu L310 fait partie d'un motif très conservé (LARKLY), situé à proximité d'un motif chargé positivement dans l'hélice $\alpha 3$ qui suit directement le motif NPTH [287]. Cette position stratégique suggère que ce résidu joue un rôle important dans le recrutement d'autres composants du SST3 [287].

En effet, sur base de nos résultats obtenus avec les mutants L310A et V320K du domaine cytoplasmique de Spa40 et sur base d'études préalables sur les associations FlhB-FliK et FlhB-FlhA du système flagellaire de *Salmonella* [288] et plus récemment YscU-YscQ (Spa33) ou YscU-YscL (MxiN) de *Yersinia* [289], nous avons recherché d'autres partenaires d'interactions pour Spa40_C. Nous avons montré par « GST pull-down » que Spa40_C interagit avec Spa33, Spa47, MxiN, MxiK ainsi qu'avec les 160 résidus du large domaine cytoplasmique de MxiA (MxiA_C). Toutes ces interactions sauf celles faisant intervenir Spa47 et MxiK, impliquent les 33 derniers résidus de Spa40, suggérant l'existence d'une compétition de liaison entre ces différents acteurs au cours de l'assemblage du SST3.

Préalablement, nous avons rapporté que les mutants *spa47*, *mxiN* et *mxiK* ont un défaut de mise en place de l'aiguille à cause de l'instabilité des composants MxiH et MxiI [110]. Ces résultats suggèrent que la fonction préliminaire de Spa47 pourrait permettre d'assurer le recrutement des constituants de l'aiguille. En rapport avec cette hypothèse, le complexe FliI-FliH, qui interagit avec FhlB_C [290], a été décrit comme permettant l'entrée des substrats à sécréter dans le « canal d'exportation », l'hydrolyse d'ATP permettant ensuite la dissociation du complexe FliH-FliI de la protéine destinée à l'exportation [291]. Récemment, le domaine cytoplasmique d'YscU a été décrit comme nécessaire au recrutement du complexe régulateur de l'ATPase, YscK-YscL-YscQ chez *Yersinia* [289]. Dans notre cas, les interactions Spa40_{CN}-Spa47 et Spa40_{CN}-MxiK pourraient permettre le positionnement correct du domaine CC de Spa40 et le recrutement d'autres composants du SST3.

La structure 3D du domaine cytoplasmique de Spa40 (Spa40_C) comprend un domaine central de type feuillets β entourés de 4 hélices α [287]. Ce domaine subit un clivage entre l'asparagine N257 et la proline P258 divisant Spa40_C en deux sous-domaines appelés Spa40_{CN} (résidus 207-257) et Spa40_{CC} (résidus 258-342). Spa40_{CN} consiste en une hélice α (α_1) suivie d'une chaîne β situées au centre de la structure. Le domaine Spa40_{CC} contient 4 chaînes β et 3 hélices α enlacées autour de la chaîne β du domaine Spa40_{CN}. Le site de clivage NPTH est situé dans une boucle entre les deux chaînes β_1 et β_2 [287]. Cette structure met en lumière l'importance de la configuration du domaine cytoplasmique dans la virulence de *Shigella*.

La mutation L310A réduit considérablement l'interaction Spa40-MxiN, tandis que la mutation V320K réduit l'interaction Spa40-MxiAc, ce qui suggère que le domaine de liaison de Spa40 fait partie de la dernière hélice α . Sur base de ces résultats, nous proposons que l'interaction spécifique, entre les protéines MxiAc, MxiN et Spa40, soit essentielle pour les événements précoces de la mise en place de l'aiguille.

Afin de mieux comprendre le rôle du clivage dans l'assemblage, nous avons délété l'entièreté du motif NPTH et avons montré que Spa40 _{Δ NPTH} interagit toujours avec MxiA, MxiN et MxiK mais plus avec Spa47, Spa33 et Spa32, suggérant que le clivage de Spa40 est plutôt requis pour le changement de spécificité de substrat. De plus, ces résultats confirment que la perte de fonction de la protéine non-clivée est la conséquence de la perte d'interactions avec d'autres composants du SST3. L'analyse structurale de mutations spécifiques effectuées chez EscU, l'homologue de Spa40 chez les EPEC montre clairement que le changement conformationnel, induit par l'auto-clivage de EscU, modifie la région impliquée dans les interactions avec d'autres composants du SST3 situés dans la membrane interne [292]. L'analyse structurale de Spa40_C montre que le clivage au site NPTH induit un changement des caractéristiques de surface de la protéine dans cette région [287], ce qui pourrait être corrélé au switch. Les mutations L310A et V320K, quoique situées en aval du site NPTH, affectent le clivage de Spa40, probablement en changeant la conformation du domaine CC nécessaire à la stabilisation de la boucle contenant le motif NPTH [287].

Il a été rapporté chez *Yersinia* que la formation de la tige, constituant la base de l'aiguille, est importante pour le changement de spécificité et qu'YscP et YscU exercent leur spécificité de substrat sur YscI, homologue de MxiI [120]. Nous avons obtenu des résultats

surprenants révélant une accumulation intracellulaire de MxiI dans le mutant *spa40/Spa40_{ΔNP_{TH}}*. Ces résultats suggèrent que le clivage de Spa40 contrôlerait la sécrétion de MxiI avant l'assemblage de l'aiguille, et comme proposé pour PrgI/YscI, MxiI pourrait former une structure de base pour le contrôle et la polymérisation de l'aiguille [120].

Spa32, la clé de la serrure pour le changement de spécificité de substrat

Nous avons montré, par des expériences de double hybride chez la levure, l'association entre Spa32 et Spa40 et avons confirmé ces données par des expériences de « GST pull-down » montrant une interaction entre Spa32 et Spa40_C ainsi que des associations entre YscP et Spa40_C ou InvJ et Spa40_C. Nous avons identifié que le domaine de liaison de Spa32 à Spa40_C comprend les résidus 206-246. Plusieurs études ont préalablement rapporté l'importance de l'interaction FliK/FlhB dans la médiation du changement de spécificité de substrat entre les composants du crochet et de la flagelline. Comparativement, chez *Yersinia*, certaines données suggèrent un rôle d'YscP et YscU dans le switch entre la sécrétion d'YscF et celle des protéines Yops [293]. La protéine Spa32, délétée de son domaine D11 contenant le motif T3S4 (Type 3 Secretion substrate specificty switch), est totalement inactive ce qui suggère que l'association Spa32-Spa40 est cruciale pour le switch. Chez *Yersinia*, ce domaine a été décrit comme nécessaire et suffisant pour le switch [125, 284]. Sa délétion dans FliK abolit sa fonction et rend la protéine incapable d'interagir avec FlhB_C [284].

Des travaux réalisés dans notre laboratoire ont montré que le mutant *spa32* est incapable de contrôler la sécrétion de la protéine MxiH et présente une aiguille anormalement longue [115]. De plus, ce mutant ne sécrète plus les protéines de virulence Ipas. Il est, par conséquent, incapable d'envahir les cellules eucaryotes. Par l'analyse en condition au Rouge Congo de 11 variants, nous avons montré que Spa32 n'agit pas comme une règle moléculaire puisque de larges délétions de Spa32 ne produisent pas d'aiguilles plus courtes que celles générées avec de plus petites délétions.

La taille des aiguilles est régulée à 50-55 nm chez *Shigella* et *Salmonella*, et à 60 nm chez *Yersinia* par des protéines présentant des tailles différentes. En effet, Spa32 contient 292 résidus, tandis qu'InvJ, YscP et FliK sont composées respectivement de 336, 515 et 409 résidus. Nous avons montré que Spa32 et InvJ ou YscP sont fonctionnellement interchangeables. Le remplacement de Spa32 par YscP, qui contient 117 acides aminés de plus, produit des aiguilles dont la taille n'est pas proportionnelle en longueur à celle d'YscP.

Par contre, l'introduction d'une région « ruler » d'YscP (résidus 202 à 306) dans Spa32, n'affectant pas la fonction de celle-ci, permet la production d'aiguilles deux fois plus longues que celles de la souche sauvage (97 nm versus 45 nm). Ces résultats corroborent des études préalables sur YscP et FliK, fusionnées également à ce domaine « ruler », produisant des aiguilles ou des crochets plus longs. Nous concluons que, contrairement à Spa32 et FliK, YscP semble fonctionner comme un « molecular ruler » principalement grâce à la présence du domaine YscP₂₀₂₋₃₀₆ [113].

Spa32 agirait plutôt par un mécanisme de « molecular tape measure » comme proposé pour FliK par Moriya *et al.* (2006) [294]. Dans ce dernier, FliK_N interagit avec le crochet en formation lorsque le taux de polymérisation de FlgE le permet. Quand le crochet atteint sa taille optimale, FliK_N s'accroche à l'aiguille déjà formée, lui conférant la bonne configuration pour se lier à FlhB_C et permettre ainsi le changement de spécificité de substrat. Selon ce modèle, nos résultats sont clairement explicables. Spa32 délétée des parties N-terminales (D1 et D2) ne peut plus interagir avec l'aiguille en formation car elle n'est plus envoyée vers le SST3 (en raison de l'absence du signal de sécrétion), ce qui la rend inactive. Les protéines Spa32 tronquées des parties C-terminales subissent probablement un changement de conformation ne leur permettant plus de se placer correctement à la base pour assurer l'interaction Spa32-Spa40. Par ailleurs, une étude a mis en évidence l'importance des 5 derniers résidus dans la configuration du domaine C-terminal de FliK [295]. Les variants de Spa32 (D8 et D11) ne possèdent plus le domaine d'interaction avec Spa40, ce qui les rend incapable de changer de spécificité de substrat. Bien qu'elles possèdent l'intégralité de leurs domaines C- et N-terminaux ainsi que le domaine d'interaction avec Spa40_C, les protéines D4, D5 et D6 restent totalement non fonctionnelles. Il est évident, d'après nos résultats, que le contrôle de la taille de l'aiguille et la sécrétion des protéines Ipas soient indissociables chez *Shigella*.

Modèle du fonctionnement de l'appareil d'exportation

Nos données sur l'étude de la protéine Spa40 et Spa32 nous permettent de proposer un modèle sur le fonctionnement de l'appareil d'exportation du SST3 (**Fig. 25**).

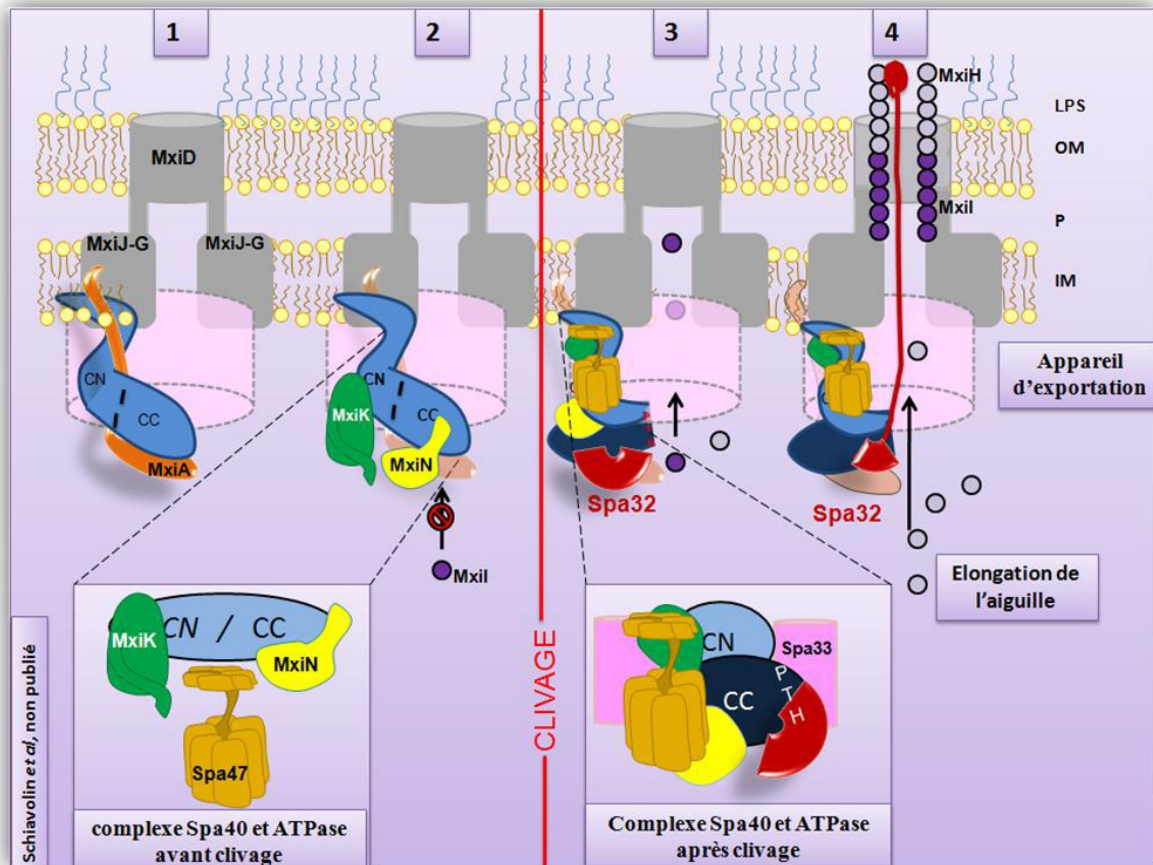


Fig. 25. Modèle représentant l'implication de Spa40 et Spa32 avec leurs partenaires dans le processus de changement de spécificité des substrats. Spa40 s'assemblerait dans sa forme non clivée (1); la forme non-clivée de Spa40 interagirait tout d'abord, via son domaine CC avec le domaine cytoplasmique de MxiA, permettant la consolidation de l'appareil d'exportation. Cette configuration permet le positionnement correct de Spa40_C dans l'ultrastructure de l'appareil de sécrétion. (2) Ensuite les interactions Spa40_{CN}-MxiK et Spa40_{CC}-MxiN permettraient le recrutement de Spa47 pour achever l'assemblage du SST3. (3) Le clivage de Spa40 aboutit à la création d'une extrémité chargée altérant les propriétés de Spa40 en induisant un changement conformationnel ce qui permet l'association Spa40_{CN}-Spa47 entraînant l'insertion du composant MxiI pour mettre en place la base de l'aiguille. Il est possible que le clivage de Spa40 diminue la disponibilité de Spa47 et favorise l'association avec Spa32 permettant la sécrétion et le contrôle du composant majeur de l'aiguille (MxiH). (4) En parallèle, une liaison pourrait s'établir entre Spa32 et l'aiguille en formation, via son extrémité N-terminale. Cette association Spa32-MxiH activerait le domaine C-terminal de Spa32 (T3S4). Celui-ci permettrait un changement de conformation de Spa40_{CC} et, par conséquent, le switch de spécificité de substrat avec arrêt de la sécrétion de la protéine MxiH et passage à la sécrétion des translocateurs. Il n'est toutefois pas exclu que d'autres signaux intrinsèques interviennent pour permettre le changement de spécificité.

1.2. Spa24, Spa9, Spa29: le carrefour de la sécrétion

L'opéron *spa* (pour *surface presentation of antigen*) est une région de 7 kb sur le plasmide de virulence pWR100 de *S. flexneri*. Elle est composée de neuf gènes dont le nom dérive du poids moléculaire de leurs produits : *spa15*, *spa47*, *spa13*, *spa32*, *spa33*, *spa24*, *spa9*, *spa29* et *spa40*. Une étude ultérieure a décrit cet opéron comme étant nécessaire à la virulence de *S. flexneri* [57]. Ces résultats ont été obtenus en utilisant la technique de mutagenèse par insertion du transposon *Tn5* au niveau du gène *spa47*. Cette mutation présente l'inconvénient d'introduire un effet polaire dans un opéron polycistronique, ce qui peut affecter non seulement le cistron muté mais également les gènes situés en aval. Nous avons entrepris, au cours de ce travail, la mutagenèse des gènes *spa24*, -9 et -29 de manière individuelle, à l'aide de cassettes de résistance à un antibiotique ne générant pas d'effet polaire.

Les protéines Spa24, -9 et -29 constituent les protéines de *Shigella* les mieux conservées dans la famille du SST3. Ces composants possèdent des homologues dans différentes bactéries ayant un SST3. Le degré de conservation est très élevé, pouvant aller jusqu'à 60% d'identité, avec leurs homologues du système flagellaire FliP/Q/R et SpaP/Q/R de *Salmonella*, YscR/S/T de *Yersinia* et EscR/S/T des EPEC [296-299]. Vu leur degré d'homologie tant sur le plan physico-chimique que topologique, les protéines Spa24, -9 et -29, ainsi que leurs homologues ont été regroupées sous le terme de « proto-canal » [83]. Il a été montré que Spa24 de *Shigella* est interchangeable avec SpaP de *Salmonella*. En effet, Spa24 est en mesure de restaurer le phénotype sauvage du mutant *spaP* [300].

Nous avons construit des mutants non-polaires *spa24*, -9 et -29 et avons analysé leurs phénotypes. Ces mutants ont perdu leur capacité d'envahir les cellules en culture et ne sont plus capables de sécréter les protéines Ipa/Ipg. Nous avons également observé que cette perte de virulence était due à l'instabilité de l'appareil de sécrétion, comme le prouve l'instabilité de MxiH, composant majeur de l'aiguille du SST3 de *Shigella*. La stabilité de MxiH ainsi que les propriétés de virulence ont été restaurées par l'introduction des gènes sauvages dans les mutants correspondants. Ceci démontre non seulement le caractère non-polaire des mutations mais également le caractère essentiel du produit de chacun de ces gènes dans la formation d'un appareil de sécrétion fonctionnel.

Nos résultats sur les gènes *spa24*, -9 et -29 concordent avec ceux obtenus chez *Salmonella* par des études biochimiques et avec les observations en microscopie électronique

de la structure du SST3 [301, 302]. Collazo et Galan ont généré des délétions de SpaP, -Q et -R chez *Salmonella* et ont montré que ces protéines étaient requises pour la sécrétion des protéines de virulence ainsi que pour l'invasion des cellules épithéliales. Sukhan et collaborateurs ont observé l'absence d'aiguille à la surface des enveloppes bactériennes des mutants *spaP*, -Q et -R. Par ailleurs, les auteurs ont également observé chez ces mutants que la stabilité des composants de la base du SST3, ainsi que sa structure étaient comparables à celle de la souche de type sauvage.

Ces données indiquent que les protéines SpaP, -Q et -R sont requises pour l'assemblage de l'aiguille du SST3 mais qu'elles ne sont pas nécessaires à la formation et à la stabilité de sa base. Très récemment, il a été montré qu'YscC, -D et -J de *Yersinia*, qui sont les homologues respectifs de MxiD, G et -J de *S. flexneri*, s'assemblent avant toute insertion des composants du bulbe [90]. Nous supposons également que l'insertion de Spa24, -9 et -29 dans la membrane interne ne puisse s'opérer qu'après la formation des anneaux supérieurs et inférieurs de la base du SST3, comme le suggère l'instabilité de Spa24 dans les mutants *mxiD*, *mxiG* et *mxiJ* (résultats non publiés). Le peu de domaines hydrophiles dans les protéines Spa24, -9 et -29 suggère que les associations qu'elles entretiennent avec les anneaux inférieurs ou supérieurs de la base du SST3 se situent préférentiellement au niveau des domaines membranaires, bien qu'il n'existe pas de démonstration expérimentale d'une association physique.

Les prédictions topologiques ainsi que des études biochimiques et morphologiques du flagelle ont montré que les protéines FliP, FliR et probablement FliQ seraient localisées dans le corps basal du flagelle [303]. Ces protéines sont associées à la membrane interne et sont requises pour la formation du corps axial qui traverse le périplasme et relie les anneaux interne et externe du système flagellaire. Les protéines FliP, -R et -Q sont nécessaires au stade précoce de l'assemblage de l'appareil flagellaire, mais postérieurement à la formation de l'anneau MS, qui est également inséré dans la membrane interne. Les études sur FliP et FliR ont montré que leur insertion dans la membrane était conditionnée par la présence de FliF formant l'anneau MS du flagelle [303, 304].

L'instabilité de MxiH dans nos mutants reflète l'existence d'une régulation dans la formation du SST3. En l'absence des protéines du proto-canal, l'appareil de sécrétion est incapable d'assurer l'assemblage de son aiguille, et le monomère est alors dégradé. Ceci implique que les éléments du « proto-canal » sont nécessaires à la consolidation structurale de la machinerie d'exportation du SST3 qui permet le transit de MxiH. La formation de

l'appareil d'exportation nécessite le recrutement des protéines MxiA et Spa40. Le rôle de MxiA dans la virulence de *Shigella* a été caractérisé dans notre laboratoire. En effet, le mutant *mxiA* est non invasif et ne sécrète pas les protéines de virulence [305]. La surexpression du domaine cytoplasmique (MxiA_C, 370 résidus) dans une souche de type sauvage diminue, de façon dose-dépendante, la sécrétion des protéines Ipa/Ipg suggérant une activité régulatrice de ce domaine (résultats non publiés). Ces données corroborent les études réalisées sur FlhA [306] et confortent l'hypothèse d'un rôle crucial de MxiA_C dans l'assemblage de l'appareil d'exportation. Il n'est pas exclu que MxiA ou Spa40 s'insère avant la mise en place des éléments du proto-canal Spa24, -9, et -29. L'insertion de MxiA, Spa40, -24, -9 et -29, pourrait permettre la formation du bulbe constitué principalement des protéines Spa47, Spa33, MxiN, MxiK.

L'analyse topologique de Spa24 et de toutes les protéines de la famille Flp montre que ces protéines présentent un segment central d'environ 80 acides aminés. Nous avons montré à l'aide d'une fusion traductionnelle avec la phosphatase alcaline (PhoA-Spa24₁₋₁₁₀), que ce domaine central de Spa24 (Spa24₇₃₋₁₅₇) est orienté dans le cytoplasme. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Fiels et *al.*, (1994) [307] sur l'étude topologique de YscR de *Yersinia*, l'homologue de Spa24, montrant que YscR₇₄₋₁₅₈ est orienté dans le cytoplasme. Ce domaine est constitué de quatre hélices dont deux font partie d'une région coiled-coil connue pour les interactions protéines-protéines [308].

Ce domaine est absolument nécessaire à la fonction de l'appareil de sécrétion, comme nous l'avons montré pour la première fois à l'aide des expériences de complémentation avec des constructions portant des délétions dans cette région. En effet, une protéine délétée du domaine cytoplasmique complet est incapable de restaurer le phénotype de type sauvage. Nous avons aussi montré que les mutations ciblant certains résidus (F115L, L138R, P140S, et A141V) abolissent la sécrétion. Nous ne pouvons pas exclure que l'absence de complémentation soit due à un mauvais repliement des dérivées de Spa24. Les hélices ou les résidus semblent être importants dans les interactions entre composants et par voie de conséquence dans la consolidation de la base du SST3. Ces résultats, démontrent pour la première fois, l'importance du domaine soluble pouvant servir de « carrefour » pour la sécrétion des substrats SST3.

été détectées entre EscR-EscR et EscR-EscS et EscR-EscU. L'interaction homotypique EscR-EscR suggère la formation d'un multimère, déjà observée chez son homologue flagellaire. En effet, une analyse de la stœchiométrie de ces protéines, à l'aide d'un marquage radioactif, a permis d'établir un rapport de quatre protéines FliP pour une protéine FliR par corps basal [303].

Dans ce travail, nous avons montré, par des expériences de chromatographie, que le domaine soluble Spa24 peut dimériser en solution. Ces résultats suggèrent que Spa24 pourrait être sous forme oligomérique, soit directement insérée dans l'appareil d'exportation, soit en complexe dans le cytoplasme avec les deux autres éléments du proto-canal (Spa9 et Spa29). Parmi les éléments du protocanal, seul Spa24 contient une séquence signal dans sa région amino-terminale, ce qui suggère que le complexe formé dans le cytoplasme peut être inséré dans la membrane grâce au peptide signal de Spa24. Ainsi, l'insertion dans la membrane interne permettrait, non seulement de stabiliser les deux autres composants du proto-canal (Spa9 et Spa29) mais aussi le recrutement d'autres éléments de l'appareil basal (Spa47, Spa33, MxiN, MxiK).

Spa24, -9 et -29 se trouvent au centre d'un réseau d'interactions gouvernant probablement l'assemblage de l'appareil de sécrétion dont la plateforme serait formée principalement par les domaines solubles des protéines Spa40, MxiA, et Spa24. L'ensemble de ces protéines membranaires formeraient un carrefour creux, à la base des anneaux internes du SST3, permettant le transit des protéines destinées à la sécrétion et à la translocation via l'aiguille.

Le rôle des chaperons dans le fonctionnement de l'appareil d'exportation

Le rôle des chaperons est important dans le fonctionnement du SST3, puisque ces protéines sont impliquées dans le stockage et l'assistance des effecteurs dans le cytoplasme bactérien [296]. Spa15 est une protéine de la classe IB qui interagit avec plusieurs protéines effectrices [312]. Nous avons montré que Spa15, et non IpgA, IpgE et IpgC, s'associe avec le domaine soluble de Spa24. Avant la sécrétion et la translocation, Spa24 peut jouer un rôle de senseur en interagissant non seulement avec les composants du SST3 mais aussi avec Spa15 qui assiste la sécrétion d'une série de plusieurs effecteurs [200, 312].

Très récemment, il a été montré que Spa15 est sécrétée et joue un rôle important dans les événements tardifs au processus invasif. En effet, Spa15 inhibe l'apoptose dans les cellules épithéliales [313]. Spa15 est une protéine à fonctions multiples. Ce statut particulier pourrait

permettre qu'il soit le seul chaperon à interagir avec Spa24_{SD}. Il pourrait aussi interagir directement avec le complexe Spa24-Spa9-Spa29 et assister leur assemblage dans la membrane interne. Nous avons étudié de manière directe l'interaction entre Spa32 et Spa24_{SD}. Nous avons montré que Spa24_{SD} interagit avec Spa32 via un domaine spécifique comprenant les résidus 206 à 280. Le fait que Spa24_{SD} et Spa40_C partagent le même domaine d'interaction avec Spa32, explique que Spa32 puisse être recrutée au niveau du bulbe avant toute association avec Spa40.

Modèle d'assemblage des éléments de l'appareil d'exportation

Sur base de nos observations et d'études préalablement réalisées entre les homologues des composants de la base du SST3 et du système flagellaire, nous proposons un modèle permettant d'expliquer l'assemblage de l'appareil d'exportation jusqu'à la formation du bulbe cytoplasmique (**Fig. 27**).

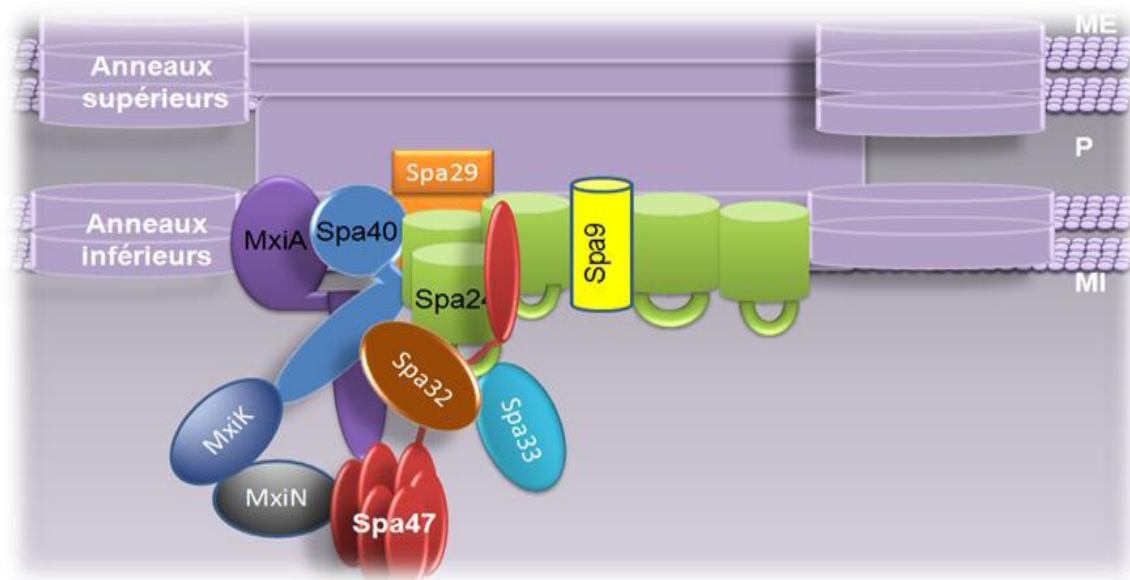


Fig. 27. Modèle d'assemblage des éléments de l'appareil d'exportation. ME : membrane externe, P : périplasme, MI : membrane interne. Après l'insertion des anneaux extérieurs et intérieurs, (1) les composants MxiA et Spa40 s'insèrent dans la membrane interne, (2) le complexe Spa24-Spa9-Spa29 s'assemblerait d'abord dans le cytoplasme sous la haute surveillance du chaperon Spa15, puis dans la membrane interne en utilisant le système Sec qui reconnaît la séquence du peptide signal sur Spa24. Il n'est pas exclu que l'assemblage des éléments du proto-canal se fasse par un mécanisme de senseur, par association individuelle avec des composants préalablement insérés (MxiA et Spa40). (3) L'insertion du complexe permettrait le recrutement des éléments du bulbe (Spa47, Spa32, Spa33, MxiN et MxiK). Ce dernier événement permettrait la consolidation de l'appareil basal puis le déclenchement des mécanismes conduisant à la mise en place des composantes de l'aiguille (MxiI et MxiH).

2. ICSB : UN VERITABLE HIJACKING DU SYSTEME IMMUNITAIRE

Le cholestérol, un composant structural important des membranes, est considéré comme un organisateur essentiel des sous-domaines membranaires [161]. Son accumulation dans les vacuoles, associées aux pathogènes, pourrait représenter une stratégie de reconnaissance lysosomale. Le cholestérol est recruté activement et de façon ubiquitaire au niveau des sites d'interaction hôte-pathogène [314-316]. L'effecteur de *Salmonella* SseJ, une glycolipide-cholestérol acétyltransférase, épuise le cholestérol des membranes de SCV (*Salmonella*-Containing Vacuole) par acylation du cholestérol libre [317]. SseJ et SifA régulent la tubulation des membranes et la formation des Sifs [318], ce qui souligne le rôle crucial du cholestérol dans la dynamique des membranes. Son appauvrissement dans les macrophages infectés par *Mycobacterium avium* déclenche la fusion phagolysosomale et la dégradation bactérienne [319]. La déplétion du cholestérol des membranes de vacuoles contenant *Brucella* (BCV), par les β -glucanes cycliques, facilite l'évasion lysosomale et les interactions avec le réticulum endoplasmique [320]. Récemment, il a été montré que l'épuisement du cholestérol pourrait empêcher la maturation des autophagosomes résultant en une accumulation d'autophagosomes immatures et en une augmentation du niveau de LC3-II [321].

Existe-t-il un domaine dans la séquence de la protéine IcsB pouvant interagir avec le cholestérol ?

Dans ce travail, nous avons d'abord identifié un domaine potentiel de fixation du cholestérol dans les séquences des protéines IcsB et BopA. Aucune étude n'a démontré la présence de ce type de domaine parmi les effecteurs de *Shigella* avant le début de ce travail. Ce domaine contient 64 résidus (IcsB₂₈₈₋₃₅₁) et partage 29 % d'identité et 50 % de similarité avec 61 résidus C-terminaux des élicitines. Les protéines eucaryotiques de liaison aux stérols telles que les stérases, la cholestérol oxydase, les élicitines, sont formées d'un mélange d'hélices α , de chaînes β et contiennent une cavité hydrophobe en l'absence du ligand [322].

Les élicitines constituent une famille de petites protéines monomériques de 10 kDa, présentant de fortes homologues entre elles, riches en cystéines et sécrétées par les oomycètes des genres *Phytophthora* et *Pythium*. Ces protéines peuvent être classées suivant leur point isoélectrique. Les élicitines α (acides) comme la capsicéine ont un pI <5 et les élicitines β (basiques) comme la cryptogéine ou la mégaspermine ont un pI >7,5. La structure

tridimensionnelle de la cryptogéine a été obtenue par diffraction de rayons X du cristal de la protéine [323] et par RMN [324]. La cryptogéine est une protéine globulaire contenant 6 hélices α ($\alpha 1$ à $\alpha 6$), un petit feuillet β antiparallèle et une boucle Ω flexible en solution. L'ensemble de la structure est maintenu par trois ponts disulfures.

La liaison au cholestérol est-elle couplée à la protection contre l'autophagie?

Les deux homologues IcsB et BopA ne sont identifiées respectivement que chez *Shigella* et *Burkholderia*. Nous avons démontré, pour la première fois, le rôle du chaperon BicP dans la stabilité de BopA. IcsB partage une identité de 23 % avec BopA qui est une protéine effectrice sécrétée par le SST3 de *B. pseudomallei*. Notre étude a montré qu'IcsB et BopA se lient au cholestérol aussi efficacement qu'IpaB. Nous avons montré que le domaine de fixation au cholestérol d'IcsB (CBD pour Cholesterol Binding Domain) est indispensable à sa fonction. La délétion du CBD provoque de façon significative une augmentation de la formation des autophagosomes. Il a été préalablement montré qu'IcsB et BopA jouent un rôle crucial dans le système de camouflage contre la reconnaissance autophagique [178, 282]. Le mutant *icsB* est entièrement invasif et capable d'échapper à la vacuole des macrophages ou de la cellule épithéliale mais incapable de se multiplier au sein des cellules épithéliales [59, 60]. Le mutant *bopA* de *B. pseudomallei* affiche une réduction significative de la survie intracellulaire de la bactérie et une diminution de la co-localisation avec la GFP-LC3 par rapport à la souche sauvage. Nous avons également montré que le nombre de cellules associées aux autophagosomes était augmenté par rapport à la souche de type sauvage, lorsque les cellules ont été infectées par le mutant *icsB* complémenté par IcsB_{Y297F}, IcsB_{Y340F}, le double mutant IcsB_{Y297F-Y340F} et IcsB Δ CBD.

Y aurait-il une grande affinité entre IcsB_{CBD}, BopA_{CBD} et le cholestérol ?

Comparativement, les élicitines ont un site unique de fixation des stérols. La constante de dissociation du complexe élicitines-stérols est d'environ 0,5 μ M ce qui représente une forte affinité [325]. IcsB et BopA contiennent une insertion de trois résidus (TPN et DPN respectivement), entre L82 et N83 dans la famille Cry des élicitines. Remarquablement, cette insertion se produit au niveau de la boucle entre le second feuillet $\beta 2$ et l'hélice $\alpha 5$, et deux des trois résidus (proline et asparagine).

La prédiction de la structure tridimensionnelle du domaine CBD de IcsB (CBD de type sauvage et CBD Δ TPN) et de BopA (CBD de type sauvage et CBD Δ DPN) a été réalisée en utilisant le programme du serveur « I-TASSER ON LINE, protein structure and fonction prediction » (**Fig. 28**). Les domaines CBD d'IcsB et BopA délétés respectivement des motifs TPN ou DPN, mettent en évidence la présence d'un domaine ligand potentiel. L'apparition du site de fixation de ligand pourrait expliquer la grande affinité de ces protéines pour le cholestérol. Les motifs TPN/DPN pourraient se trouver dans une conformation permettant la fixation du cholestérol.

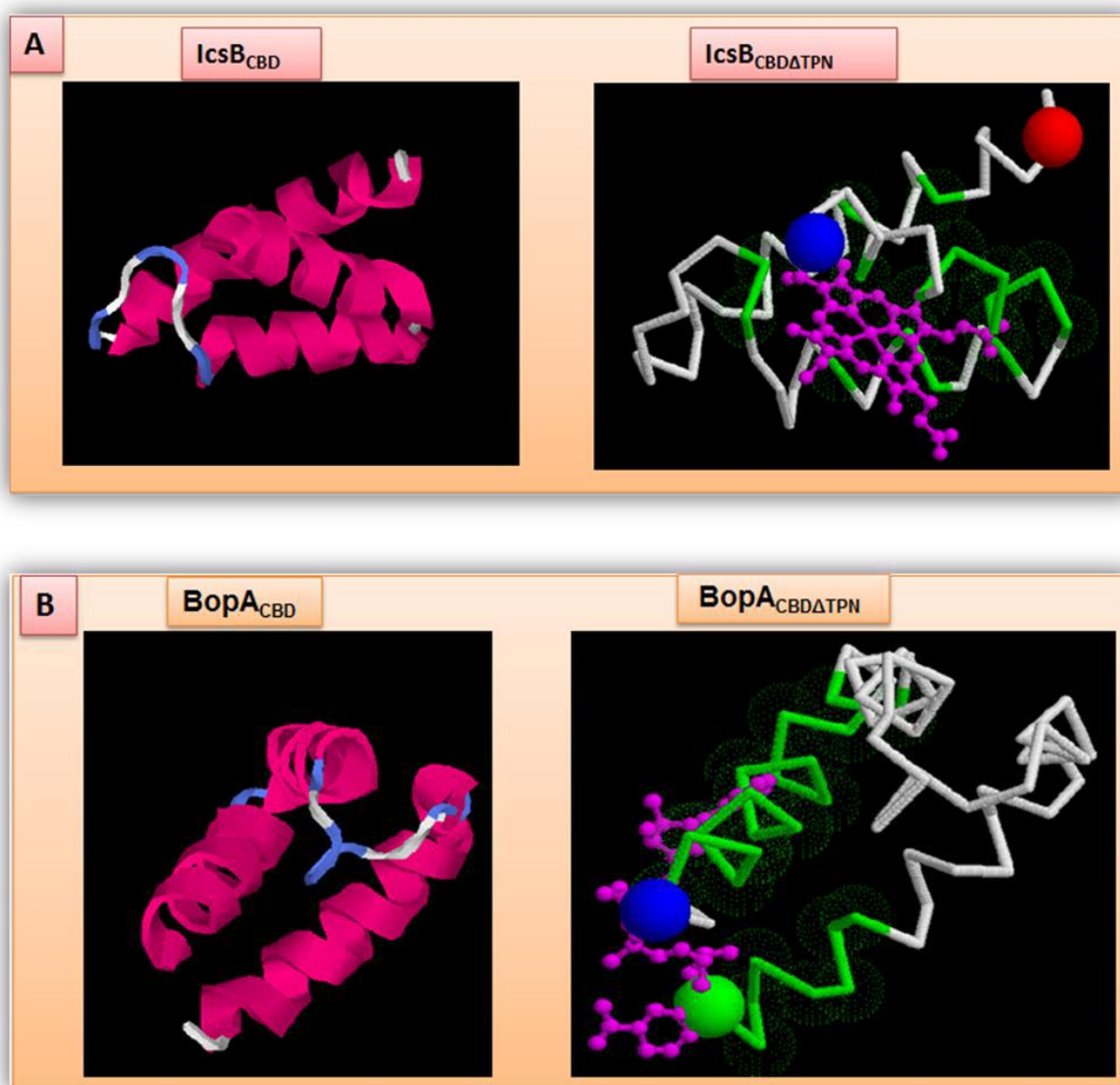


Fig. 28. Prédiction de la structure 3D du domaine de fixation au cholestérol (A) d'IcsB (IcsB_{CBD} et IcsB_{CBDΔTPN}) et (B) BopA (BopA_{CBD} et BopA_{CBDΔDPN}) (I-TASSER ON LINE, protein structure and fonction prediction, <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>).

L'interaction des élicitines avec des stérols (stigmastérol, β -sitostérol, ergostérol, cholestérol, campestérol) a également été montrée [325]. Il s'avère que certains acides aminés comme les tyrosines 47 et 87 interagissent directement avec le stérol. La tyrosine 47, impliquée dans le seul pont hydrogène entre la protéine et le stérol, a été substituée par une phénylalanine (Y47F) ou une glycine (Y47G). La tyrosine 87 dont le cycle aromatique se déplace de l'intérieur de la poche à l'extérieur a été remplacée par une phénylalanine (Y87F) [326]. Toutes ces protéines sont capables de fixer un stérol par molécule [327]. Cependant, leur affinité pour les stérols est affectée, elle varie en effet de 24 μ M pour la cryptogéine à 10000 μ M pour la protéine mutée Y87F. Le rôle des complexes élicitines-lipides a été démontré en utilisant des protéines mutées, altérées dans leur capacité à charger correctement les stérols. Le choix de ces mutations ponctuelles a été possible grâce à la résolution de la structure 3D de la cryptogéine complexée à un stérol [327].

L'homologie de séquences et l'identité entre les 61 résidus C-terminaux des élicitines et les 64 résidus (288-351) d'IcsB nous ont conduits à postuler qu'une molécule d'IcsB pourrait interagir avec une molécule de cholestérol. En revanche, six molécules de SipB de *Salmonella* ou d'IpaB de *Shigella* lient une molécule de cholestérol [164]. L'analyse de la structure 3D des élicitines révèle que les 64 résidus des peptides d'IcsB et de BopA potentiellement impliqués dans la toxicité vis-à-vis des cellules sont situés à la surface de la molécule où se trouvent également les acides aminés Y47 et Y87. Une des conséquences de l'hébergement du cholestérol par IcsB ou BopA serait la rupture de la structure de la membrane de la cellule eucaryote, permettant éventuellement à *Shigella* ou *B. pseudomallei* d'échapper à l'autophagie.

Y-a-t-il un lien entre la fixation du cholestérol et l'interaction IcsB-IcsA ?

L'interaction d'IcsB avec IcsA/VirG permet à *Shigella* d'échapper à l'autophagie. IcsB et Atg5 ont la capacité d'interagir avec le facteur VirG. Curieusement, IcsB et Atg5 partagent la même région de liaison à VirG (VirG α , résidus 319-507). L'affinité d'IcsB pour VirG semble beaucoup plus forte que l'affinité d'Atg5 pour VirG *in vitro*, suggérant qu'IcsB agirait comme une protéine antagoniste d'Atg5. Les essais de fixation d'IcsB sur VirG par les expériences de « GST pull-down » avec GST-VirG α en présence d'Atg5-Myc montrent effectivement qu'Atg5-Myc s'associe uniquement lorsque la protéine IcsB est absente. Cette bataille compétitive, gagnée par IcsB (de type sauvage), permet à la bactérie de se camoufler et d'éviter la reconnaissance autophagique [178] (**Fig. 29**).

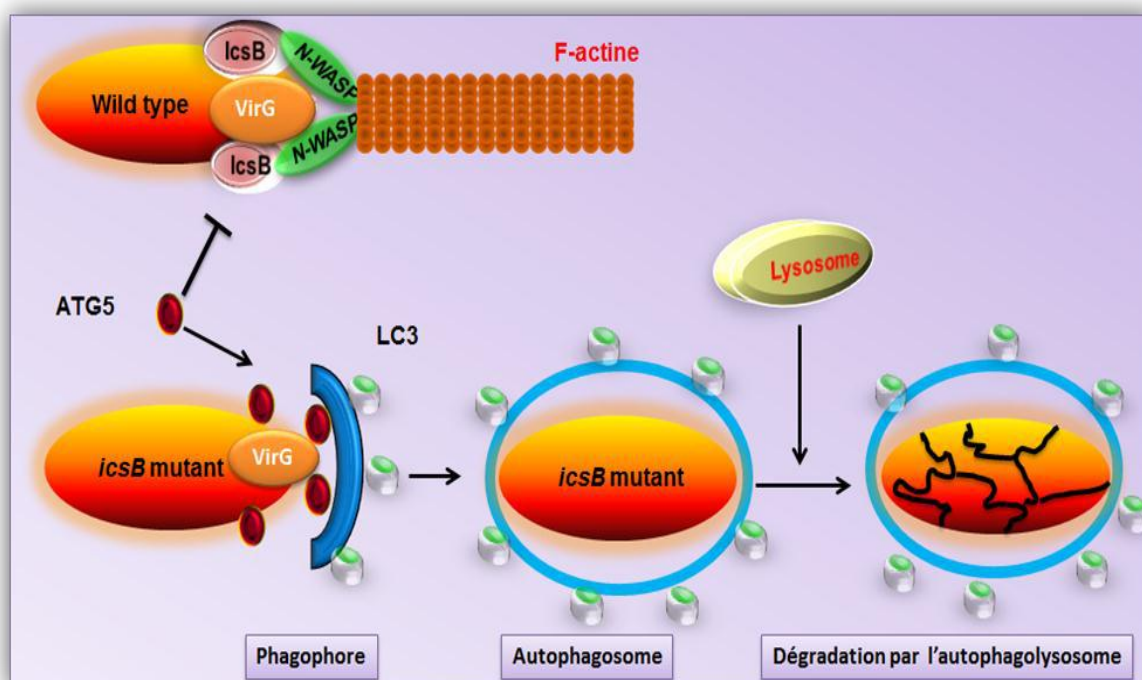


Fig. 29. Modèle de camouflage contre la reconnaissance autophagique au cours de l'infection à *Shigella*. En présence d'IcsB (de type sauvage), IcsB se lie à VirG et inhibe de façon compétitive la liaison d'Atg5 à VirG. En l'absence d'IcsB (mutants *icsB*) Atg5 peut se lier à VirG accumulé à un pôle de la bactérie intracellulaire *Shigella* et le complexe est reconnu par le système d'autophagie, puis dégradé par les autophagolysosomes [178].

Nous avons montré que la délétion du domaine CBD n'affecte pas l'association d'IcsA/VirG à IcsB, ce qui suggère que la capacité d'IcsB à fixer le cholestérol et VirG impliquerait des domaines distincts. Comparativement, BimA, qui est responsable de la polymérisation d'actine chez *B. pseudomallei*, partage une très faible similitude avec VirG (11% d'identité en acides aminés) [328]. En outre, le domaine liant VirG (résidus 320 à 433) à Atg5 [178] n'existe pas dans BimA. Par conséquent, il semble peu probable que BopA facilite l'évasion bactérienne à l'autophagie par un mécanisme semblable à celui décrit pour IcsB. Ces résultats suggèrent que *Shigella* pourrait directement échapper à l'autophagie par un autre mécanisme utilisant par exemple la voie de déplétion du cholestérol. Cependant, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que le rôle de VirG puisse cinétiquement intervenir plus tard, en d'autres termes, une fois qu'IcsB a établi l'interaction avec le cholestérol. On pourrait aussi spéculer que l'interaction IcsB/BopA avec le cholestérol impliquerait le recrutement d'autres protéines de la membrane externe des bactéries spécifiquement visées par Atg5 ou

d'autres protéines impliquées dans la voie de l'autophagie. Des travaux en cours visent à identifier les domaines d'IcsB impliqués dans l'interaction avec IcsA (Mémoire El Hajjami, N).

Existe-t-il un seul mécanisme pour échapper à la surveillance cellulaire ?

Certaines bactéries pathogènes Gram négatif utilisent le SST1 pour exporter des exoprotéines de grand poids moléculaire allant jusqu'à 570 kDa. Ces exoprotéines sont appelées RTX (Repeats-in-Toxin). Ceci inclut l' α -hémolysine d'*Escherichia coli*, la leucotoxine de *Pasteurella haeflolytica* et la l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis* [329]. Ces toxines sont caractérisées par des répétitions de la glycine, de l'acide aspartique et d'un motif de séquence de fixation au calcium.

Une famille de toxines MARTX (Multifonctionnal Autoprocessing RTX toxins) telle que RtxA de *Vibrio cholerae* (VcRtxA) a été identifiée [330]. Les toxines MARTX ont plusieurs types de répétitions présentes dans les régions N- et C-terminales et une région mosaïque contenant des domaines multiples possédant une activité de virulence [330]. Ces toxines ont un domaine à activité protéasique, qui peut se replier comme une caspase afin de libérer les domaines d'activité de virulence dans le cytosol des cellules hôtes [331, 332]. Deux grands domaines importants, présents dans VcRtxA de *Vibrio cholerae*, ont été caractérisés et chacun d'entre eux provoque des remaniements dans le cytosquelette : les domaines ACD (Actin Cross-linking Domain) interférant directement avec la molécule d'actine du cytosquelette et les domaines RID (Rho GTPase Inactivation Domain) jouant un rôle dans la dépolarisation par inactivation des Rho GTPase, Rac, et Cdc42 [333-335].

Récemment, les domaines RID ont été identifiés dans IcsB (entre les positions 128 à 166 et 264 à 319) et BopA (positions 127 à 171 et 269 à 325). Ces domaines peuvent adopter une conformation similaire à la papaïne et contiennent des résidus hautement conservés (histidine et cystéine) (**Fig. 30**). Ils peuvent fonctionner comme une enzyme à activité protéolytique ou jouer le rôle d'une acyltransférase [336].

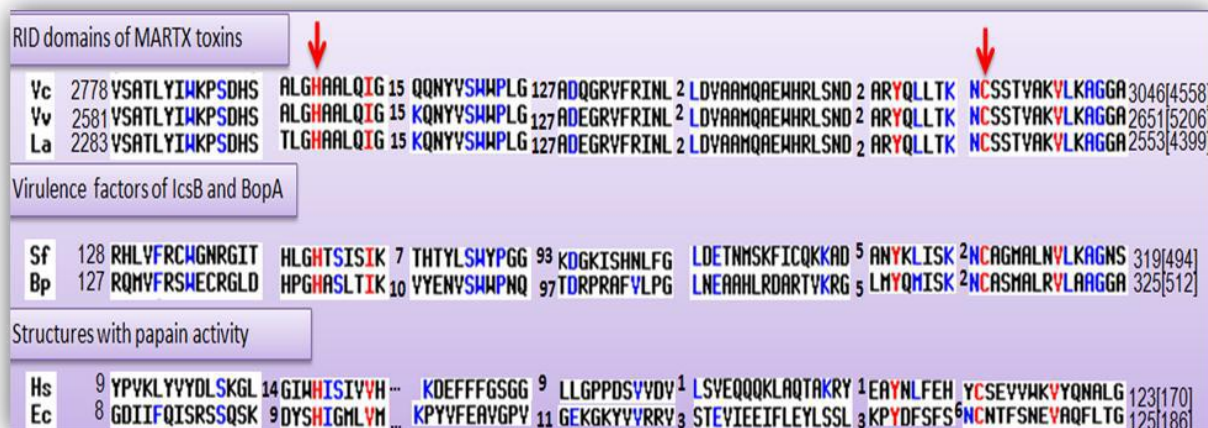


Fig. 30. Alignement de séquences des domaines RID de la famille multifonctionnelle des toxines MARTX, des facteurs de virulence IcsB et BopA, et des protéines à activité papaïne. Les résidus catalytiques importants sont indiqués par une flèche rouge. Les chiffres, entre les domaines RID, remplacent les résidus non homologues. Les protéines ont été identifiées par « NCBI gene identification ». L'alignement a été réalisé par le serveur Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Bp *Burkholderia pseudomallei*; Ec, *Escherichia coli*; La, *Listonella anguillarum*; Sf, *Shigella flexneri*; Vc, *Vibrio cholerae*; Vv, *Vibrio vulnificus*.

Cette hypothèse permet de spéculer que *Shigella* et *Burkholderia* utiliseraient plusieurs mécanismes pour échapper à la surveillance cellulaire. IcsB et BopA pourraient interférer directement ou indirectement avec les composants des cellules eucaryotes nécessaires dans la stimulation des voies cellulaires. Le fait que la délétion du domaine CBD inclut le domaine RID d'IcsB (résidus 264 à 319), pourrait expliquer pourquoi *Shigella* ne est plus, non seulement capable de fixer le cholestérol, mais aussi capable de jouer un rôle protéolytique (des études en cours portent sur les mutations H145 et C306).

Bien que la distribution asymétrique des signaux de VirG soit préférentiellement une cible autophagique [178, 337], il n'est pas exclu qu'IcsB ou BopA s'associent directement à Atg5. *Shigella* et *Burkholderia*, via les motifs RID contenus dans ces protéines, peuvent utiliser l'activité acétyltransférase pour brouiller les systèmes de signalisation cellulaire.

Récemment, Nicolas Dupont et *al.* [233] ont étudié les fragments membranaires de la vacuole d'internalisation après rupture et dissémination de *Shigella* dans le cytoplasme cellulaire. Ces travaux révèlent un processus complexe de régulation qui se situe à la croisée de plusieurs voies de signalisation cellulaire régulant l'inflammation, la mort cellulaire par nécrose et l'autophagie. Ces débris membranaires sont en effet loin d'être passifs ou inertes. Ils sont dirigés vers la voie autophagique mais participent activement à la modulation de la

production de cytokines pro-inflammatoires (messagers chimiques impliqués dans les réactions inflammatoires locale et systémique) et permettent à la cellule d'éviter la mort cellulaire par nécrose.

Selon l'hypothèse des chercheurs, ces débris membranaires seraient un nœud de signalisation cellulaire qui constituerait un signal de danger pour la cellule et les mécanismes de subversion développés par *Shigella flexneri* les dirigeraient vers un compartiment de dégradation. Ce mécanisme est également utilisé par d'autres bactéries pathogènes à réplication intra-cytoplasmique comme *Listeria*, agent causal de la listériose. Ces travaux permettent d'envisager sous un nouvel angle les processus d'usurpation des mécanismes cellulaires par les pathogènes et les réponses des cellules aux agressions membranaires. En outre, ils ouvrent de nouvelles perspectives pour l'étude de la réponse cellulaire à un stress membranaire.

Modèle de protection de *S. flexneri* via la protéine effectrice IcsB

Sur base de nos observations, nous proposons un modèle qui permet d'expliquer le couplage de la fixation du cholestérol et la protection contre l'autophagie (**Fig. 31**).

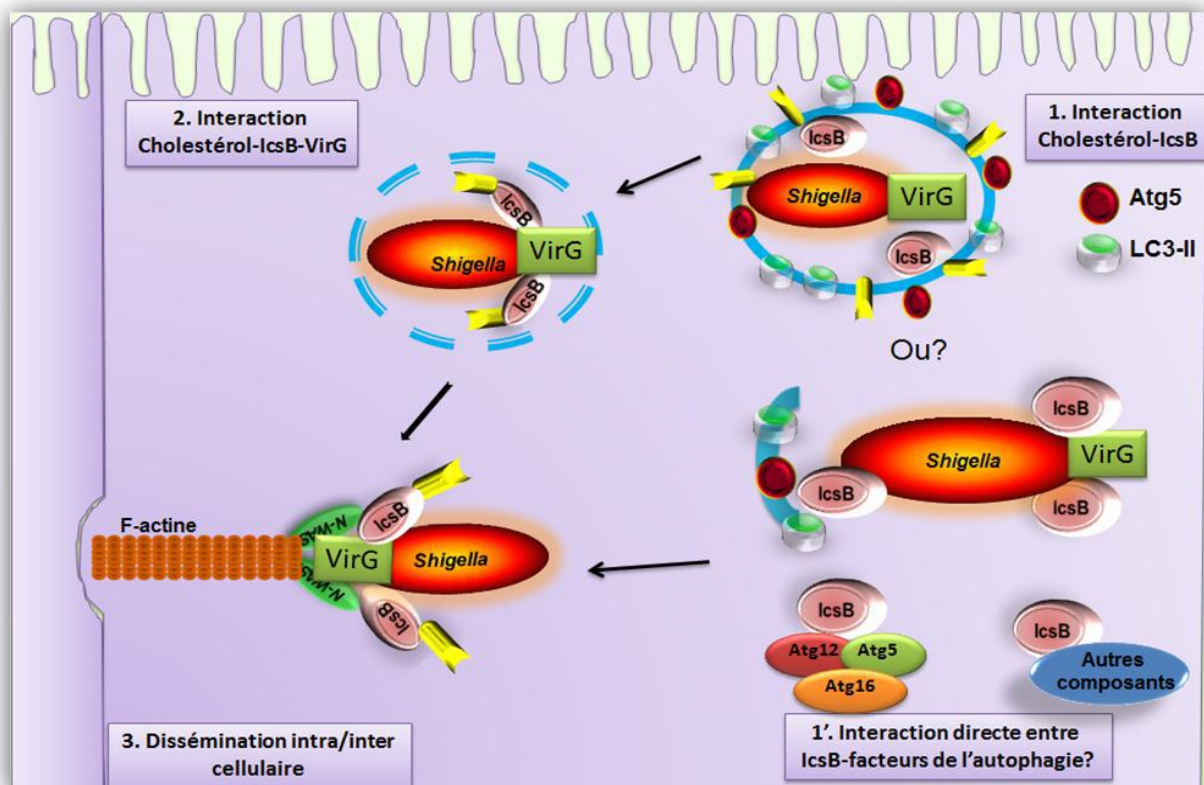


Fig. 31. Représentation schématique du rôle de la protéine IcsB dans l'échappement à l'autophagie. L'association entre IcsB et le cholestérol est indispensable pour sa fonction.



Perspectives et Conclusion

Perspectives

Contrairement à la vision simpliste du fonctionnement du SST3, plusieurs interrogations demeurent encore sur le « timing » de l'assemblage des composants, sur les signaux additionnels du mécanisme de switch de spécificité de substrat et sur le rôle des chaperons dans le fonctionnement de l'appareil d'exportation. Nos travaux contribuent à éclaircir le mode d'assemblage de l'appareil d'exportation en caractérisant les acteurs du mécanisme de « switch ». Nous proposons d'étudier le marquage et la détection par microscopie électronique des éléments du « proto-canal » en présence ou en absence des protéines MxiA et Spa40.

Par ailleurs, si l'hypothèse d'une association entre les protéines Spa24, -9 et -29 et les protéines MxiA et Spa40 se confirme par d'autres expériences, nous vérifierons l'activité du canal de l'appareil d'exportation, comme l'a suggéré Aizawa, dans des modèles membranaires artificiels comme les liposomes [83]. L'association Spa24-Spa9-Spa29 serait intéressante à étudier.

Les nombreuses interactions mises en évidence entre les domaines solubles de Spa40, Spa24 et les composants de l'appareil de sécrétion suggèrent l'existence d'une compétition régulant le « timing » d'interaction de l'assemblage de la machinerie de sécrétion. Nous analyserons de façon détaillée ces interactions pour mieux comprendre le rôle de chaque partenaire dans l'assemblage et dans le « switch » du SST3.

L'interaction entre IcsB-cholestérol ouvre une nouvelle voie dans la caractérisation des effecteurs de *Shigella* qui utilisent des molécules de la cellule hôte. La résolution de la structure tridimensionnelle du complexe IcsB-cholestérol nous permettra de déterminer le nombre de monomères d'IcsB pour une molécule de cholestérol. Nous pouvons également évaluer la constante de dissociation du complexe IcsB-cholestérol et ses différents variants IcsB_{Y297F}, IcsB_{Y340F} et IcsB_{Y297F-Y340F}. La fusion IcsB-GFP nous aidera à localiser dans la cellule eucaryote, le complexe IcsB-cholestérol. La recherche des partenaires d'interaction dans les cellules eucaryotes, combinée à la délétion des domaines RID ou à la mutagenèse dirigée des résidus conservés, rendra possible la compréhension du mode d'action de la protéine IcsB dans la dissémination intra et intercellulaire.

Conclusion générale

L'assemblage de l'appareil d'exportation du SST3 et l'étude d'une protéine effectrice ont représenté l'objectif principal au cours de mon travail de thèse. Nous avons répondu à certaines questions posées, à savoir :

(1) les protéines Spa24, Spa9 et Spa29 sont importantes dans l'assemblage de l'appareil d'exportation,

(2) l'association des éléments du proto-canal avec Spa40 ainsi que l'interaction Spa40-Spa32 jouent un rôle important dans le changement de spécificité de substrats : de la sécrétion des composants de l'aiguille (MxiH et MxiI) aux effecteurs,

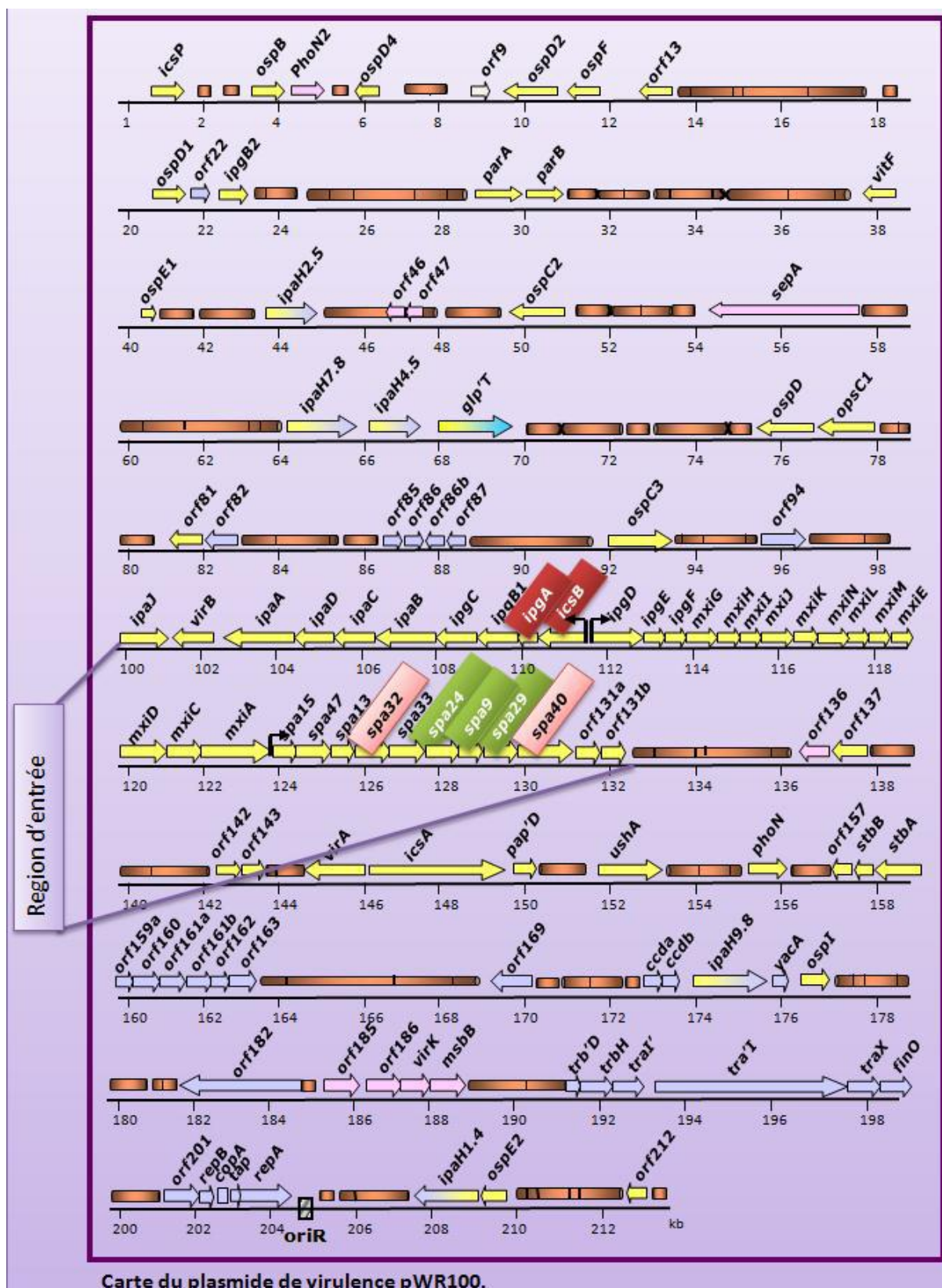
(3) l'interaction IcsB-cholestérol permet à *Shigella* d'échapper à l'autophagie.

Cette thèse ne doit pas être considérée comme un produit de recherche fini mais plutôt comme un cheminement vers une ouverture scientifique allant des aspects du fonctionnement du SST3 à la sécrétion des effecteurs.

Les systèmes SST3, retrouvés chez de nombreuses bactéries pathogènes ou non, peuvent être considérés comme des vrais communicateurs permettant de passer les informations à la cellule hôte. Cette communication résulte d'interactions complexes entre les bactéries et l'hôte, qui impliquent à la fois les composants du SST3 et les protéines effectrices délivrées par la machinerie de sécrétion. Cette relation interpelle la conscience de la communauté scientifique sur tous les fronts et promet des découvertes hors du commun à l'avenir. Ce travail de thèse ouvre une porte à ces études et constitue une découverte fondamentale pouvant aider à la recherche d'un vaccin contre *Shigella*.

Shigella constitue, non seulement, un modèle intéressant pour l'étude des mécanismes de la virulence des bactéries, mais aussi un outil potentiel pour l'étude des tumeurs comme l'a récemment montré Galmbacher *et al.* [338]. Il a été démontré dans notre laboratoire que le SST3 de *Shigella* peut délivrer des cytokines biologiquement actives *in vivo*, ouvrant ainsi de nouvelles voies pour l'utilisation de bactéries atténuées afin de fournir des protéines pour l'immunomodulation ou à des fins de thérapie génique [339]. Cette approche peut être élargie avec d'autres bactéries possédant le SST3. De nombreuses bactéries intracellulaires telles que *Shigella*, *Salmonella* ou *Listeria monocytogenes* pourraient donc être utilisées pour délivrer des molécules anti-tumorales via le SST3.

Annexe



Bibliographie

Bibliographie

- [1] K.L. Kotloff, J.P. Winickoff, B. Ivanoff, J.D. Clemens, D.L. Swerdlow, P.J. Sansonetti, G.K. Adak, M.M. Levine, Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies, *Bull World Health Organ* 77 (1999) 651-666.
- [2] R. Lan, P.R. Reeves, Escherichia coli in disguise: molecular origins of Shigella, *Microbes Infect* 4 (2002) 1125-1132.
- [3] P.E. Orndorff, S. Falkow, Organization and expression of genes responsible for type 1 piliation in Escherichia coli, *J Bacteriol* 159 (1984) 736-744.
- [4] S. Al-Nimri, W.A. Miller, B.A. Byrne, G. Guibert, L. Chen, A unified approach to molecular epidemiology investigations: tools and patterns in California as a case study for endemic shigellosis, *BMC Infect Dis* 9 (2009) 184.
- [5] H. Srinivasa, M. Baijayanti, Y. Raksha, Magnitude of drug resistant Shigellosis: a report from Bangalore, *Indian J Med Microbiol* 27 (2009) 358-360.
- [6] A. Naheed, P. Kalluri, K.A. Talukder, A.S. Faruque, F. Khatun, G.B. Nair, E.D. Mintz, R.F. Breiman, Fluoroquinolone-resistant Shigella dysenteriae type 1 in northeastern Bangladesh, *Lancet Infect Dis* 4 (2004) 607-608.
- [7] M.M. Levine, K.L. Kotloff, E.M. Barry, M.F. Pasetti, M.B. Sztein, Clinical trials of Shigella vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard road, *Nat Rev Microbiol* 5 (2007) 540-553.
- [8] A. Phalipon, L.A. Mulard, P.J. Sansonetti, Vaccination against shigellosis: is it the path that is difficult or is it the difficult that is the path?, *Microbes Infect* 10 (2008) 1057-1062.
- [9] D. Cohen, S. Ashkenazi, M. Green, Y. Lerman, R. Slepon, G. Robin, N. Orr, D.N. Taylor, J.C. Sadoff, C. Chu, J. Shiloach, R. Schneerson, J.B. Robbins, Safety and immunogenicity of investigational Shigella conjugate vaccines in Israeli volunteers, *Infect Immun* 64 (1996) 4074-4077.
- [10] D. Cohen, S. Ashkenazi, M.S. Green, M. Gdalevich, G. Robin, R. Slepon, M. Yavzori, N. Orr, C. Block, I. Ashkenazi, J. Shemer, D.N. Taylor, T.L. Hale, J.C. Sadoff, D. Pavliakova, R. Schneerson, J.B. Robbins, Double-blind vaccine-controlled randomised efficacy trial of an investigational Shigella sonnei conjugate vaccine in young adults, *Lancet* 349 (1997) 155-159.
- [11] G. Robin, Y. Keisari, R. Slepon, S. Ashkenazi, D. Cohen, Quantitative analysis of IgG class and subclass and IgA serum response to Shigella sonnei and Shigella flexneri 2a polysaccharides following vaccination with Shigella conjugate vaccines, *Vaccine* 17 (1999) 3109-3115.
- [12] D. Pavliakova, C. Chu, S. Bystricky, N.W. Tolson, J. Shiloach, J.B. Kaufman, D.A. Bryla, J.B. Robbins, R. Schneerson, Treatment with succinic anhydride improves the immunogenicity of Shigella flexneri type 2a O-specific polysaccharide-protein conjugates in mice, *Infect Immun* 67 (1999) 5526-5529.
- [13] J.H. Passwell, S. Ashkenazi, E. Harlev, D. Miron, R. Ramon, N. Farzam, L. Lerner-Geva, Y. Levi, C. Chu, J. Shiloach, J.B. Robbins, R. Schneerson, Safety and immunogenicity of Shigella sonnei-CRM9 and Shigella flexneri type 2a-rEPAsucc conjugate vaccines in one- to four-year-old children, *Pediatr Infect Dis J* 22 (2003) 701-706.
- [14] P.J. Sansonetti, Genetic and molecular basis of epithelial cell invasion by Shigella species, *Rev Infect Dis* 13 Suppl 4 (1991) S285-292.
- [15] S.T. Shipley, A. Panda, A.Q. Khan, E.H. Kriel, M. Maciel, Jr., S. Livio, J.P. Nataro, M.M. Levine, M.B. Sztein, L.J. DeTolla, A challenge model for Shigella dysenteriae 1 in cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis), *Comp Med* 60 54-61.
- [16] K.I. Jeong, S. Tzipori, A.S. Sheoran, Shiga toxin 2-specific but not shiga toxin 1-specific human monoclonal antibody protects piglets challenged with enterohemorrhagic Escherichia coli producing shiga toxin 1 and shiga toxin 2, *J Infect Dis* 201 1081-1083.
- [17] B. Sereny, C. Tenner, P. Racz, Immunogenicity of living attenuated shigellae, *Acta Microbiol.Acad.Sci.Hung.* 18 (1971) 239-245.

- [18] G.H. Rabbani, M.J. Albert, H. Rahman, M. Islam, D. Mahalanabis, I. Kabir, K. Alam, M. Ansaruzzaman, Development of an improved animal model of shigellosis in the adult rabbit by colonic infection with *Shigella flexneri* 2a, *Infect Immun* 63 (1995) 4350-4357.
- [19] D.J. Philpott, S. Yamaoka, A. Israel, P.J. Sansonetti, Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells, *J. Immunol.* 165 (2000) 903-914.
- [20] A. Cersini, M.C. Martino, I. Martini, G. Rossi, M.L. Bernardini, Analysis of virulence and inflammatory potential of *Shigella flexneri* purine biosynthesis mutants, *Infect. Immun.* 71 (2003) 7002-7013.
- [21] M.I. Fernandez, A. Thuizat, T. Pedron, M. Neutra, A. Phalipon, P.J. Sansonetti, A newborn mouse model for the study of intestinal pathogenesis of shigellosis, *Cell Microbiol* 5 (2003) 481-491.
- [22] D.H. Shim, T. Suzuki, S.Y. Chang, S.M. Park, P.J. Sansonetti, C. Sasakawa, M.N. Kweon, New animal model of shigellosis in the Guinea pig: its usefulness for protective efficacy studies, *J Immunol* 178 (2007) 2476-2482.
- [23] H.L. DuPont, M.M. Levine, R.B. Hornick, S.B. Formal, Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission, *J Infect Dis* 159 (1989) 1126-1128.
- [24] J. Gorden, P.L. Small, Acid resistance in enteric bacteria, *Infect Immun* 61 (1993) 364-367.
- [25] Y.E. Wu, W. Hong, C. Liu, L. Zhang, Z. Chang, Conserved amphiphilic feature is essential for periplasmic chaperone HdeA to support acid resistance in enteric bacteria, *Biochem J* 412 (2008) 389-397.
- [26] D. Islam, L. Bandholtz, J. Nilsson, H. Wigzell, B. Christensson, B. Agerberth, G. Gudmundsson, Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator, *Nat Med* 7 (2001) 180-185.
- [27] P.J. Sansonetti, J. Arondel, J.R. Cantey, M.C. Prevost, M. Huerre, Infection of rabbit Peyer's patches by *Shigella flexneri*: effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium, *Infect Immun* 64 (1996) 2752-2764.
- [28] J.S. Wassef, D.F. Keren, J.L. Mailloux, Role of M cells in initial antigen uptake and in ulcer formation in the rabbit intestinal loop model of shigellosis, *Infect Immun* 57 (1989) 858-863.
- [29] A. Haas, The phagosome: compartment with a license to kill, *Traffic* 8 (2007) 311-330.
- [30] K. Ray, B. Marteyn, P.J. Sansonetti, C.M. Tang, Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria, *Nat Rev Microbiol* 7 (2009) 333-340.
- [31] A. Zychlinsky, M.C. Prevost, P.J. Sansonetti, *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages, *Nature* 358 (1992) 167-169.
- [32] A. Zychlinsky, K. Thirumalai, J. Arondel, J.R. Cantey, A.O. Aliprantis, P.J. Sansonetti, In vivo apoptosis in *Shigella flexneri* infections, *Infect Immun* 64 (1996) 5357-5365.
- [33] M. Miura, H. Zhu, R. Rotello, E.A. Hartwig, J. Yuan, Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*, *Cell* 75 (1993) 653-660.
- [34] C.A. Dinarello, Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme, *Ann N Y Acad Sci* 856 (1998) 1-11.
- [35] P.J. Sansonetti, J. Arondel, J.M. Cavaillon, M. Huerre, Role of interleukin-1 in the pathogenesis of experimental shigellosis, *J Clin Invest* 96 (1995) 884-892.
- [36] K. Le-Barillec, J.G. Magalhaes, E. Corcuff, A. Thuizat, P.J. Sansonetti, A. Phalipon, J.P. Di Santo, Roles for T and NK cells in the innate immune response to *Shigella flexneri*, *J Immunol* 175 (2005) 1735-1740.
- [37] T. Suzuki, K. Nakanishi, H. Tsutsui, H. Iwai, S. Akira, N. Inohara, M. Chamaillard, G. Nunez, C. Sasakawa, A novel caspase-1/toll-like receptor 4-independent pathway of cell death induced by cytosolic *Shigella* in infected macrophages, *J Biol Chem* 280 (2005) 14042-14050.
- [38] G. Tran Van Nhieu, E. Caron, A. Hall, P.J. Sansonetti, IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells, *Embo J* 18 (1999) 3249-3262.
- [39] R. Menard, P.J. Sansonetti, C. Parsot, Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells, *J Bacteriol* 175 (1993) 5899-5906.

- [40] A. Zychlinsky, B. Kenny, R. Menard, M.C. Prevost, I.B. Holland, P.J. Sansonetti, IpaB mediates macrophage apoptosis induced by *Shigella flexneri*, *Mol. Microbiol.* 11 (1994) 619-627.
- [41] S. Barzu, Z. Benjelloun-Touimi, A. Phalipon, P. Sansonetti, C. Parsot, Functional analysis of the *Shigella flexneri* IpaC invasin by insertional mutagenesis, *Infect Immun* 65 (1997) 1599-1605.
- [42] N. High, J. Mounier, M.C. Prevost, P.J. Sansonetti, IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole, *Embo J* 11 (1992) 1991-1999.
- [43] P.J. Sansonetti, A. Ryter, P. Clerc, A.T. Maurelli, J. Mounier, Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis, *Infect Immun* 51 (1986) 461-469.
- [44] G.N. Schroeder, H. Hilbi, Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion, *Clin Microbiol Rev* 21 (2008) 134-156.
- [45] A. Fasano, F.R. Noriega, F.M. Liao, W. Wang, M.M. Levine, Effect of shigella enterotoxin 1 (ShET1) on rabbit intestine in vitro and in vivo, *Gut* 40 (1997) 505-511.
- [46] J.P. Nataro, J. Seriwatana, A. Fasano, D.R. Maneval, L.D. Guers, F. Noriega, F. Dubovsky, M.M. Levine, J.G. Morris, Jr., Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains, *Infect Immun* 63 (1995) 4721-4728.
- [47] R.P. Cherla, S.Y. Lee, V.L. Tesh, Shiga toxins and apoptosis, *FEMS Microbiol Lett* 228 (2003) 159-166.
- [48] B. Ramegowda, J.E. Samuel, V.L. Tesh, Interaction of Shiga toxins with human brain microvascular endothelial cells: cytokines as sensitizing agents, *J Infect Dis* 180 (1999) 1205-1213.
- [49] K. Sandvig, B. van Deurs, Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin, *Physiol Rev* 76 (1996) 949-966.
- [50] V.L. Tesh, Induction of apoptosis by Shiga toxins, *Future Microbiol* 5 431-453.
- [51] Q. Jin, Z. Yuan, J. Xu, Y. Wang, Y. Shen, W. Lu, J. Wang, H. Liu, J. Yang, F. Yang, X. Zhang, J. Zhang, G. Yang, H. Wu, D. Qu, J. Dong, L. Sun, Y. Xue, A. Zhao, Y. Gao, J. Zhu, B. Kan, K. Ding, S. Chen, H. Cheng, Z. Yao, B. He, R. Chen, D. Ma, B. Qiang, Y. Wen, Y. Hou, J. Yu, Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157, *Nucleic Acids Res* 30 (2002) 4432-4441.
- [52] C. Buchrieser, P. Glaser, C. Rusniok, H. Nedjari, H. D'Hauteville, F. Kunst, P. Sansonetti, C. Parsot, The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*, *Mol Microbiol* 38 (2000) 760-771.
- [53] P.J. Sansonetti, T.L. Hale, G.J. Dammin, C. Kapfer, H.H. Collins, Jr., S.B. Formal, Alterations in the pathogenicity of *Escherichia coli* K-12 after transfer of plasmid and chromosomal genes from *Shigella flexneri*, *Infect. Immun.* 39 (1983) 1392-1402.
- [54] H. Schmidt, M. Hensel, Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis, *Clin Microbiol Rev* 17 (2004) 14-56.
- [55] A.T. Maurelli, B. Baudry, H. d'Hauteville, T.L. Hale, P.J. Sansonetti, Cloning of plasmid DNA sequences involved in invasion of HeLa cells by *Shigella flexneri*, *Infect Immun* 49 (1985) 164-171.
- [56] C. Sasakawa, K. Kamata, T. Sakai, S. Makino, M. Yamada, N. Okada, M. Yoshikawa, Virulence-associated genetic regions comprising 31 kilobases of the 230-kilobase plasmid in *Shigella flexneri* 2a, *J Bacteriol* 170 (1988) 2480-2484.
- [57] C. Sasakawa, K. Komatsu, T. Tobe, T. Suzuki, M. Yoshikawa, Eight genes in region 5 that form an operon are essential for invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri* 2a, *J Bacteriol* 175 (1993) 2334-2346.
- [58] C. Sasakawa, K. Kamata, T. Sakai, S.Y. Murayama, S. Makino, M. Yoshikawa, Molecular alteration of the 140-megadalton plasmid associated with loss of virulence and Congo red binding activity in *Shigella flexneri*, *Infect Immun* 51 (1986) 470-475.
- [59] A. Allaoui, J. Mounier, M.C. Prevost, P.J. Sansonetti, C. Parsot, icsB: a *Shigella flexneri* virulence gene necessary for the lysis of protrusions during intercellular spread, *Mol Microbiol* 6 (1992) 1605-1616.
- [60] M. Ogawa, T. Suzuki, I. Tatsuno, H. Abe, C. Sasakawa, IcsB, secreted via the type III secretion system, is chaperoned by IpgA and required at the post-invasion stage of *Shigella* pathogenicity, *Mol Microbiol* 48 (2003) 913-931.

- [61] M. Mavris, A.L. Page, R. Tournebize, B. Demers, P. Sansonetti, C. Parsot, Regulation of transcription by the activity of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus, *Mol Microbiol* 43 (2002) 1543-1553.
- [62] A.L. Page, H. Ohayon, P.J. Sansonetti, C. Parsot, The secreted IpaB and IpaC invasins and their cytoplasmic chaperone IpgC are required for intercellular dissemination of *Shigella flexneri*, *Cell Microbiol* 1 (1999) 183-193.
- [63] A.L. Page, P. Sansonetti, C. Parsot, Spa15 of *Shigella flexneri*, a third type of chaperone in the type III secretion pathway, *Mol. Microbiol.* 43 (2002) 1533-1542.
- [64] B. Adler, C. Sasakawa, T. Tobe, S. Makino, K. Komatsu, M. Yoshikawa, A dual transcriptional activation system for the 230 kb plasmid genes coding for virulence-associated antigens of *Shigella flexneri*, *Mol Microbiol* 3 (1989) 627-635.
- [65] C. Parsot, *Shigella* type III secretion effectors: how, where, when, for what purposes?, *Curr Opin Microbiol* 12 (2009) 110-116.
- [66] S. Nakayama, H. Watanabe, Involvement of cpxA, a sensor of a two-component regulatory system, in the pH-dependent regulation of expression of *Shigella sonnei* virF gene, *J Bacteriol* 177 (1995) 5062-5069.
- [67] S.M. Payne, E.E. Wyckoff, E.R. Murphy, A.G. Oglesby, M.L. Boulette, N.M. Davies, Iron and pathogenesis of *Shigella*: iron acquisition in the intracellular environment, *Biometals* 19 (2006) 173-180.
- [68] M.E. Porter, C.J. Dorman, A role for H-NS in the thermo-osmotic regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*, *J Bacteriol* 176 (1994) 4187-4191.
- [69] C. Parsot, E. Ageron, C. Penno, M. Mavris, K. Jamoussi, H. d'Hauteville, P. Sansonetti, B. Demers, A secreted anti-activator, OspD1, and its chaperone, Spa15, are involved in the control of transcription by the type III secretion apparatus activity in *Shigella flexneri*, *Mol Microbiol* 56 (2005) 1627-1635.
- [70] M.J. Pallen, S.A. Beatson, C.M. Bailey, Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion, *BMC Microbiol* 5 (2005) 9.
- [71] A. Botteaux, M. Sani, C.A. Kayath, E.J. Boekema, A. Allaoui, Spa32 interaction with the inner-membrane Spa40 component of the type III secretion system of *Shigella flexneri* is required for the control of the needle length by a molecular tape measure mechanism, *Mol Microbiol* 70 (2008) 1515-1528.
- [72] M. Sani, A. Botteaux, C. Parsot, P. Sansonetti, E.J. Boekema, A. Allaoui, IpaD is localized at the tip of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus, *Biochim Biophys Acta* 1770 (2007) 307-311.
- [73] A. Botteaux, M.P. Sory, L. Biskri, C. Parsot, A. Allaoui, MxiC is secreted by and controls the substrate specificity of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus, *Mol Microbiol* (2008).
- [74] E. Cascales, The type VI secretion toolkit, *EMBO Rep* 9 (2008) 735-741.
- [75] S. Pukatzki, S.B. McAuley, S.T. Miyata, The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains, *Curr Opin Microbiol* 12 (2009) 11-17.
- [76] P.G. Leiman, M. Basler, U.A. Ramagopal, J.B. Bonanno, J.M. Sauder, S. Pukatzki, S.K. Burley, S.C. Almo, J.J. Mekalanos, Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 4154-4159.
- [77] A. Economou, P.J. Christie, R.C. Fernandez, T. Palmer, G.V. Plano, A.P. Pugsley, Secretion by numbers : protein traffic in prokaryotes, *Mol. Microbiol.* (2006).
- [78] V. Koronakis, C. Hughes, E. Koronakis, Energetically distinct early and late stages of HlyB/HlyD-dependent secretion across both *Escherichia coli* membranes, *EMBO J* 10 (1991) 3263-3272.
- [79] R. Fronzes, P.J. Christie, G. Waksman, The structural biology of type IV secretion systems, *Nat Rev Microbiol* 7 (2009) 703-714.
- [80] C.K. Yip, N.C. Strynadka, New structural insights into the bacterial type III secretion system, *Trends Biochem Sci* 31 (2006) 223-230.
- [81] P. Troisfontaines, G.R. Cornelis, Type III secretion: more systems than you think, *Physiology (Bethesda)* 20 (2005) 326-339.

- [82] K. Yonekura, S. Maki-Yonekura, K. Namba, Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy, *Nature* 424 (2003) 643-650.
- [83] S.I. Aizawa, Bacterial flagella and type III secretion systems, *FEMS Microbiol Lett* 202 (2001) 157-164.
- [84] T. Michiels, P. Wattiau, R. Brasseur, J.M. Ruysschaert, G. Cornelis, Secretion of Yop proteins by *Yersinia*, *Infect Immun* 58 (1990) 2840-2849.
- [85] C.J. Hueck, Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants, *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 62 (1998) 379-433.
- [86] G.R. Cornelis, F. Van Gijsegem, Assembly and function of type III secretory systems, *Annu Rev Microbiol* 54 (2000) 735-774.
- [87] T. Kubori, Y. Matsushima, D. Nakamura, J. Uralil, M. Lara-Tejero, A. Sukhan, J.E. Galan, S.I. Aizawa, Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system, *Science*. 280 (1998) 602-605.
- [88] A. Blocker, N. Jouihri, E. Larquet, P. Gounon, F. Ebel, C. Parsot, P. Sansonetti, A. Allaoui, Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretin, *Mol Microbiol* 39 (2001) 652-663.
- [89] E. Hoiczyk, G. Blobel, Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (2001) 4669-4674.
- [90] A. Diepold, M. Amstutz, S. Abel, I. Sorg, U. Jenal, G.R. Cornelis, Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome, *EMBO J*.
- [91] A. Allaoui, P.J. Sansonetti, R. Menard, S. Barzu, J. Mounier, A. Phalipon, C. Parsot, MxiG, a membrane protein required for secretion of *Shigella* spp. Ipa invasins: involvement in entry into epithelial cells and in intercellular dissemination, *Mol Microbiol* 17 (1995) 461-470.
- [92] A. Allaoui, P.J. Sansonetti, C. Parsot, MxiJ, a lipoprotein involved in secretion of *Shigella* Ipa invasins, is homologous to YscJ, a secretion factor of the *Yersinia* Yop proteins, *J Bacteriol* 174 (1992) 7661-7669.
- [93] M. Sani, A. Allaoui, F. Fusetti, G.T. Oostergetel, W. Keegstra, E.J. Boekema, Structural organization of the needle complex of the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*, *Micron*. 38 (2007) 291-301.
- [94] R. Schuch, A.T. Maurelli, 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 (2001) 6991-6998.
- [95] G.V. Plano, S.C. Straley, Mutations in yscC, yscD, and yscG prevent high-level expression and secretion of V antigen and Yops in *Yersinia pestis*, *J Bacteriol* 177 (1995) 3843-3854.
- [96] T. Michiels, J.C. Vanooteghem, C. Lambert de Rouvroit, B. China, A. Gustin, P. Boudry, G.R. Cornelis, Analysis of virC, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*, *J Bacteriol* 173 (1991) 4994-5009.
- [97] J.L. Hodgkinson, A. Horsley, D. Stabat, M. Simon, S. Johnson, P.C. da Fonseca, E.P. Morris, J.S. Wall, S.M. Lea, A.J. Blocker, Three-dimensional reconstruction of the *Shigella* T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout, *Nat Struct Mol Biol* 16 (2009) 477-485.
- [98] T.C. Marlovits, C.E. Stebbins, Type III secretion systems shape up as they ship out, *Curr Opin Microbiol* 13 47-52.
- [99] A. Allaoui, P.J. Sansonetti, C. Parsot, MxiD, an outer membrane protein necessary for the secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins, *Mol Microbiol* 7 (1993) 59-68.
- [100] K. Tamano, S. Aizawa, E. Katayama, T. Nonaka, S. Imajoh-Ohmi, A. Kuwae, S. Nagai, C. Sasakawa, Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors, *EMBO J*. 19 (2000) 3876-3887.
- [101] N. Nouwen, H. Stahlberg, A.P. Pugsley, A. Engel, Domain structure of secretin PulD revealed by limited proteolysis and electron microscopy, *Embo J* 19 (2000) 2229-2236.
- [102] M. Koster, W. Bitter, H. de Cock, A. Allaoui, G.R. Cornelis, J. Tommassen, The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex, *Mol.Microbiol.* 26 (1997) 789-797.

- [103] K. Kaniga, J.C. Bossio, J.E. Galan, The *Salmonella typhimurium* invasion genes *invF* and *invG* encode homologues of the AraC and PulD family of proteins, *Mol Microbiol* 13 (1994) 555-568.
- [104] N. Nouwen, N. Ranson, H. Saibil, B. Wolpensinger, A. Engel, A. Ghazi, A.P. Pugsley, Secretin PulD: association with pilot PulS, structure, and ion-conducting channel formation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 8173-8177.
- [105] R. Schuch, A.T. Maurelli, The *mxi*-*Spa* type III secretory pathway of *Shigella flexneri* requires an outer membrane lipoprotein, MxiM, for invasin translocation, *Infect.Immun.* 67 (1999) 1982-1991.
- [106] M. Okon, T.F. Moraes, P.I. Lario, A.L. Creagh, C.A. Haynes, N.C. Strynadka, L.P. McIntosh, Structural Characterization of the Type-III Pilot-Secretin Complex from *Shigella flexneri*, *Structure* 16 (2008) 1544-1554.
- [107] G.P. Andrews, A.T. Maurelli, *mxiA* of *Shigella flexneri* 2a, which facilitates export of invasion plasmid antigens, encodes a homolog of the low-calcium-response protein, LcrD, of *Yersinia pestis*, *Infect Immun* 60 (1992) 3287-3295.
- [108] L.J. Worrall, M. Vuckovic, N.C. Strynadka, Crystal structure of the C-terminal domain of the *Salmonella* type III secretion system export apparatus protein InvA, *Protein Sci.*
- [109] A. Allaoui, S. Woestyn, C. Sluiter, G.R. Cornelis, YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion, *J.Bacteriol.* 176 (1994) 4534-4542.
- [110] N. Jouihri, M.P. Sory, A.L. Page, P. Gounon, C. Parsot, A. Allaoui, MxiK and MxiN interact with the Spa47 ATPase and are required for transit of the needle components MxiH and MxiI, but not of Ipa proteins, through the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*, *Mol.Microbiol.* 49 (2003) 755-767.
- [111] S. Johnson, A. Blocker, Characterization of soluble complexes of the *Shigella flexneri* type III secretion system ATPase, *FEMS Microbiol Lett* (2008).
- [112] R.M. Macnab, How bacteria assemble flagella, *Annu Rev Microbiol* 57 (2003) 77-100.
- [113] L. Journet, C. Agrain, P. Broz, G.R. Cornelis, The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler, *Science.* 302 (2003) 1757-1760.
- [114] T.G. Kimbrough, S.I. Miller, Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 11008-11013.
- [115] J. Magdalena, A. Hachani, M. Chamekh, N. Jouihri, P. Gounon, A. Blocker, A. Allaoui, Spa32 regulates a switch in substrate specificity of the type III secretion of *Shigella flexneri* from needle components to Ipa proteins, *J.Bacteriol.* 184 (2002) 3433-3441.
- [116] F.S. Cordes, K. Komoriya, E. Larquet, S. Yang, E.H. Egelman, A. Blocker, S.M. Lea, Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*, *J Biol Chem* 278 (2003) 17103-17107.
- [117] G. Wilharm, V. Lehmann, W. Neumayer, J. Trcek, J. Heesemann, *Yersinia enterocolitica* type III secretion: evidence for the ability to transport proteins that are folded prior to secretion, *BMC Microbiol* 4 (2004) 27.
- [118] J.E. Deane, F.S. Cordes, P. Roversi, S. Johnson, R. Kenjale, W.D. Picking, W.L. Picking, S.M. Lea, A. Blocker, Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of MxiH, a subunit of the *Shigella flexneri* type III secretion system needle, *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 62 (2006) 302-305.
- [119] J.E. Deane, P. Roversi, F.S. Cordes, S. Johnson, R. Kenjale, S. Daniell, F. Booy, W.D. Picking, W.L. Picking, A.J. Blocker, S.M. Lea, Molecular model of a type III secretion system needle: Implications for host-cell sensing, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 12529-12533.
- [120] S.E. Wood, J. Jin, S.A. Lloyd, YscP and YscU switch the substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system by regulating export of the inner rod protein YscI, *J Bacteriol* 190 (2008) 4252-4262.
- [121] F.S. Sutterwala, L.A. Mijares, L. Li, Y. Ogura, B.I. Kazmierczak, R.A. Flavell, Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome, *J Exp Med* 204 (2007) 3235-3245.
- [122] K. Tamano, E. Katayama, T. Toyotome, C. Sasakawa, *Shigella* Spa32 is an essential secretory protein for functional type III secretion machinery and uniformity of its needle length, *J.Bacteriol.* 184 (2002) 1244-1252.

- [123] H. Russmann, T. Kubori, J. Sauer, J.E. Galan, Molecular and functional analysis of the type III secretion signal of the *Salmonella enterica* InvJ protein, *Mol Microbiol* 46 (2002) 769-779.
- [124] K. Muramoto, S. Makishima, S.I. Aizawa, R.M. Macnab, Effect of cellular level of FliK on flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*, *J.Mol.Biol.* 277 (1998) 871-882.
- [125] C. Agrain, I. Callebaut, L. Journet, I. Sorg, C. Paroz, L.J. Mota, G.R. Cornelis, Characterization of a Type III secretion substrate specificity switch (T3S4) domain in YscP from *Yersinia enterocolitica*, *Mol.Microbiol.* 56 (2005) 54-67.
- [126] T. Hirano, S. Shibata, K. Ohnishi, T. Tani, S. Aizawa, N-terminal signal region of FliK is dispensable for length control of the flagellar hook, *Mol.Microbiol.* 56 (2005) 346-360.
- [127] N.P. West, P. Sansonetti, J. Mounier, R.M. Exley, C. Parsot, S. Guadagnini, M.C. Prevost, A. Prochnicka-Chalufour, M. Delepierre, M. Tanguy, C.M. Tang, Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS, *Science* 307 (2005) 1313-1317.
- [128] R. Medzhitov, C. Janeway, Jr., Innate immune recognition: mechanisms and pathways, *Immunol Rev* 173 (2000) 89-97.
- [129] R. Medzhitov, Toll-like receptors and innate immunity, *Nat Rev Immunol* 1 (2001) 135-145.
- [130] C. Sasakawa, A new paradigm of bacteria-gut interplay brought through the study of *Shigella*, *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86 229-243.
- [131] M. Ogawa, C. Sasakawa, Intracellular survival of *Shigella*, *Cell Microbiol* 8 (2006) 177-184.
- [132] P. Cossart, P.J. Sansonetti, Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens, *Science* 304 (2004) 242-248.
- [133] P.J. Sansonetti, J.P. Di Santo, Debugging how bacteria manipulate the immune response, *Immunity* 26 (2007) 149-161.
- [134] S. Mattoo, Y.M. Lee, J.E. Dixon, Interactions of bacterial effector proteins with host proteins, *Curr Opin Immunol* 19 (2007) 392-401.
- [135] T. Izard, G. Tran Van Nhieu, P.R. Bois, *Shigella* applies molecular mimicry to subvert vinculin and invade host cells, *J Cell Biol* 175 (2006) 465-475.
- [136] A. Skoudy, J. Mounier, A. Aruffo, H. Ohayon, P. Gounon, P. Sansonetti, G. Tran Van Nhieu, CD44 binds to the *Shigella* IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells, *Cell Microbiol* 2 (2000) 19-33.
- [137] K.A. Demali, A.L. Jue, K. Burrige, IpaA targets beta1 integrins and rho to promote actin cytoskeleton rearrangements necessary for *Shigella* entry, *J Biol Chem* 281 (2006) 39534-39541.
- [138] C. Hamiaux, A. van Eerde, C. Parsot, J. Broos, B.W. Dijkstra, Structural mimicry for vinculin activation by IpaA, a virulence factor of *Shigella flexneri*, *EMBO Rep* 7 (2006) 794-799.
- [139] Y. Chen, M.R. Smith, K. Thirumalai, A. Zychlinsky, A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE, *EMBO J* 15 (1996) 3853-3860.
- [140] A.B. Hartman, M. Venkatesan, E.V. Oaks, J.M. Buysse, Sequence and molecular characterization of a multicopy invasion plasmid antigen gene, *ipaH*, of *Shigella flexneri*, *J Bacteriol* 172 (1990) 1905-1915.
- [141] H. Hilbi, J.E. Moss, D. Hersh, Y. Chen, J. Arondel, S. Banerjee, R.A. Flavell, J. Yuan, P.J. Sansonetti, A. Zychlinsky, *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB, *J Biol Chem* 273 (1998) 32895-32900.
- [142] P.J. Hume, E.J. McGhie, R.D. Hayward, V. Koronakis, The purified *Shigella* IpaB and *Salmonella* SipB translocators share biochemical properties and membrane topology, *Mol Microbiol* 49 (2003) 425-439.
- [143] H. Iwai, M. Kim, Y. Yoshikawa, H. Ashida, M. Ogawa, Y. Fujita, D. Muller, T. Kirikae, P.K. Jackson, S. Kotani, C. Sasakawa, A bacterial effector targets Mad2L2, an APC inhibitor, to modulate host cell cycling, *Cell* 130 (2007) 611-623.
- [144] A.T. Harrington, P.D. Hearn, W.L. Picking, J.R. Barker, A. Wessel, W.D. Picking, Structural characterization of the N terminus of IpaC from *Shigella flexneri*, *Infect Immun* 71 (2003) 1255-1264.
- [145] A.K. Veenendaal, J.L. Hodgkinson, L. Schwarzer, D. Stabat, S.F. Zenk, A.J. Blocker, The type III secretion system needle tip complex mediates host cell sensing and translocon insertion, *Mol Microbiol* 63 (2007) 1719-1730.

- [146] N.M. Alto, F. Shao, C.S. Lazar, R.L. Brost, G. Chua, S. Mattoo, S.A. McMahon, P. Ghosh, T.R. Hughes, C. Boone, J.E. Dixon, Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions, *Cell* 124 (2006) 133-145.
- [147] K. Niebuhr, S. Giuriato, T. Pedron, D.J. Philpott, F. Gaits, J. Sable, M.P. Sheetz, C. Parsot, P.J. Sansonetti, B. Payrastre, Conversion of PtdIns(4,5)P(2) into PtdIns(5)P by the *S.flexneri* effector IpgD reorganizes host cell morphology, *EMBO J* 21 (2002) 5069-5078.
- [148] K. Niebuhr, N. Jouihri, A. Allaoui, P. Gounon, P.J. Sansonetti, C. Parsot, IpgD, a protein secreted by the type III secretion machinery of *Shigella flexneri*, is chaperoned by IpgE and implicated in entry focus formation, *Mol Microbiol* 38 (2000) 8-19.
- [149] N.L. Slagowski, R.W. Kramer, M.F. Morrison, J. LaBaer, C.F. Lesser, A functional genomic yeast screen to identify pathogenic bacterial proteins, *PLoS Pathog* 4 (2008) e9.
- [150] D.V. Zurawski, C. Mitsuhashi, K.L. Mumy, B.A. McCormick, A.T. Maurelli, OspF and OspC1 are *Shigella flexneri* type III secretion system effectors that are required for postinvasion aspects of virulence, *Infect Immun* 74 (2006) 5964-5976.
- [151] L. Arbibe, D.W. Kim, E. Batsche, T. Pedron, B. Mateescu, C. Muchardt, C. Parsot, P.J. Sansonetti, An injected bacterial effector targets chromatin access for transcription factor NF-kappaB to alter transcription of host genes involved in immune responses, *Nat Immunol* 8 (2007) 47-56.
- [152] R.W. Kramer, N.L. Slagowski, N.A. Eze, K.S. Giddings, M.F. Morrison, K.A. Siggers, M.N. Starnbach, C.F. Lesser, Yeast functional genomic screens lead to identification of a role for a bacterial effector in innate immunity regulation, *PLoS Pathog* 3 (2007) e21.
- [153] H. Li, H. Xu, Y. Zhou, J. Zhang, C. Long, S. Li, S. Chen, J.M. Zhou, F. Shao, The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family, *Science* 315 (2007) 1000-1003.
- [154] S. Yoshida, Y. Handa, T. Suzuki, M. Ogawa, M. Suzuki, A. Tamai, A. Abe, E. Katayama, C. Sasakawa, Microtubule-severing activity of *Shigella* is pivotal for intercellular spreading, *Science* 314 (2006) 985-989.
- [155] S. Yoshida, E. Katayama, A. Kuwae, H. Mimuro, T. Suzuki, C. Sasakawa, *Shigella* deliver an effector protein to trigger host microtubule destabilization, which promotes Rac1 activity and efficient bacterial internalization, *EMBO J* 21 (2002) 2923-2935.
- [156] D.W. Kim, G. Lenzen, A.L. Page, P. Legrain, P.J. Sansonetti, C. Parsot, The *Shigella flexneri* effector OspG interferes with innate immune responses by targeting ubiquitin-conjugating enzymes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 14046-14051.
- [157] J.R. Rohde, A. Breitzkreutz, A. Chenal, P.J. Sansonetti, C. Parsot, Type III secretion effectors of the IpaH family are E3 ubiquitin ligases, *Cell Host Microbe* 1 (2007) 77-83.
- [158] J. Okuda, T. Toyotome, N. Kataoka, M. Ohno, H. Abe, Y. Shimura, A. Seyedarabi, R. Pickersgill, C. Sasakawa, *Shigella* effector IpaH9.8 binds to a splicing factor U2AF(35) to modulate host immune responses, *Biochem Biophys Res Commun* 333 (2005) 531-539.
- [159] T. Toyotome, T. Suzuki, A. Kuwae, T. Nonaka, H. Fukuda, S. Imajoh-Ohmi, T. Toyofuku, M. Hori, C. Sasakawa, *Shigella* protein IpaH(9.8) is secreted from bacteria within mammalian cells and transported to the nucleus, *J Biol Chem* 276 (2001) 32071-32079.
- [160] H. Ashida, T. Toyotome, T. Nagai, C. Sasakawa, *Shigella* chromosomal IpaH proteins are secreted via the type III secretion system and act as effectors, *Mol Microbiol* 63 (2007) 680-693.
- [161] M. Edidin, The state of lipid rafts: from model membranes to cells, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32 (2003) 257-283.
- [162] F. Lafont, F.G. van der Goot, Bacterial invasion via lipid rafts, *Cell Microbiol* 7 (2005) 613-620.
- [163] F.G. van der Goot, G. Tran van Nhieu, A. Allaoui, P. Sansonetti, F. Lafont, Rafts can trigger contact-mediated secretion of bacterial effectors via a lipid-based mechanism, *J Biol Chem* 279 (2004) 47792-47798.
- [164] R.D. Hayward, R.J. Cain, E.J. McGhie, N. Phillips, M.J. Garner, V. Koronakis, Cholesterol binding by the bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells, *Mol Microbiol* 56 (2005) 590-603.
- [165] K.S. Giddings, A.E. Johnson, R.K. Tweten, Redefining cholesterol's role in the mechanism of the cholesterol-dependent cytolysins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 11315-11320.

- [166] G.N. Schroeder, H. Hilbi, Cholesterol is required to trigger caspase-1 activation and macrophage apoptosis after phagosomal escape of *Shigella*, *Cell Microbiol* 9 (2007) 265-278.
- [167] M.L. Bernardini, J. Mounier, H. d'Hauteville, M. Coquis-Rondon, P.J. Sansonetti, Identification of *icsA*, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 3867-3871.
- [168] M.B. Goldberg, J.A. Theriot, *Shigella flexneri* surface protein IcsA is sufficient to direct actin-based motility, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 6572-6576.
- [169] M.B. Goldberg, O. Barzu, C. Parsot, P.J. Sansonetti, Unipolar localization and ATPase activity of IcsA, a *Shigella flexneri* protein involved in intracellular movement, *Infect Agents Dis* 2 (1993) 210-211.
- [170] J.R. Robbins, D. Monack, S.J. McCallum, A. Vegas, E. Pham, M.B. Goldberg, J.A. Theriot, The making of a gradient: IcsA (VirG) polarity in *Shigella flexneri*, *Mol Microbiol* 41 (2001) 861-872.
- [171] T. Suzuki, H. Mimuro, S. Suetsugu, H. Miki, T. Takenawa, C. Sasakawa, Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) is the specific ligand for *Shigella* VirG among the WASP family and determines the host cell type allowing actin-based spreading, *Cell Microbiol* 4 (2002) 223-233.
- [172] J. Steinhauer, R. Agha, T. Pham, A.W. Varga, M.B. Goldberg, The unipolar *Shigella* surface protein IcsA is targeted directly to the bacterial old pole: IcsP cleavage of IcsA occurs over the entire bacterial surface, *Mol Microbiol* 32 (1999) 367-377.
- [173] C. Egile, H. d'Hauteville, C. Parsot, P.J. Sansonetti, SopA, the outer membrane protease responsible for polar localization of IcsA in *Shigella flexneri*, *Mol Microbiol* 23 (1997) 1063-1073.
- [174] D. Santapaola, F. Del Chierico, A. Petrucca, S. Uzzau, M. Casalino, B. Colonna, R. Sessa, F. Berlutti, M. Nicoletti, Apyrase, the product of the virulence plasmid-encoded *phoN2* (*apy*) gene of *Shigella flexneri*, is necessary for proper unipolar IcsA localization and for efficient intercellular spread, *J Bacteriol* 188 (2006) 1620-1627.
- [175] R.C. Sandlin, M.B. Goldberg, A.T. Maurelli, Effect of O side-chain length and composition on the virulence of *Shigella flexneri* 2a, *Mol Microbiol* 22 (1996) 63-73.
- [176] K.D. Shere, S. Sallustio, A. Manassis, T.G. D'Aversa, M.B. Goldberg, Disruption of IcsP, the major *Shigella* protease that cleaves IcsA, accelerates actin-based motility, *Mol Microbiol* 25 (1997) 451-462.
- [177] I. Fukuda, T. Suzuki, H. Munakata, N. Hayashi, E. Katayama, M. Yoshikawa, C. Sasakawa, Cleavage of *Shigella* surface protein VirG occurs at a specific site, but the secretion is not essential for intracellular spreading, *J Bacteriol* 177 (1995) 1719-1726.
- [178] M. Ogawa, T. Yoshimori, T. Suzuki, H. Sagara, N. Mizushima, C. Sasakawa, Escape of intracellular *Shigella* from autophagy, *Science* 307 (2005) 727-731.
- [179] T. Sakaguchi, H. Kohler, X. Gu, B.A. McCormick, H.C. Reinecker, *Shigella flexneri* regulates tight junction-associated proteins in human intestinal epithelial cells, *Cell Microbiol* 4 (2002) 367-381.
- [180] T. Michiels, G.R. Cornelis, Secretion of hybrid proteins by the *Yersinia* Yop export system, *J Bacteriol* 173 (1991) 1677-1685.
- [181] I. Bolin, H. Wolf-Watz, The plasmid-encoded Yop2b protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is a virulence determinant regulated by calcium and temperature at the level of transcription, *Mol Microbiol* 2 (1988) 237-245.
- [182] R. Rosqvist, S. Hakansson, A. Forsberg, H. Wolf-Watz, Functional conservation of the secretion and translocation machinery for virulence proteins of *Yersinia*, *salmonellae* and *shigellae*, *Embo J* 14 (1995) 4187-4195.
- [183] K. Schesser, E. Frithz-Lindsten, H. Wolf-Watz, Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellular membranes, *J Bacteriol* 178 (1996) 7227-7233.
- [184] D.M. Anderson, O. Schneewind, A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*, *Science* 278 (1997) 1140-1143.
- [185] L.W. Cheng, D.M. Anderson, O. Schneewind, Two independent type III secretion mechanisms for YopE in *Yersinia enterocolitica*, *Mol Microbiol* 24 (1997) 757-765.
- [186] S.A. Lloyd, M. Sjostrom, S. Andersson, H. Wolf-Watz, Molecular characterization of type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences, *Mol Microbiol* 43 (2002) 51-59.

- [187] M.P. Sory, A. Boland, I. Lambermont, G.R. Cornelis, Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92 (1995) 11998-12002.
- [188] C.E. Stebbins, J.E. Galan, Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion, *Nature* 414 (2001) 77-81.
- [189] C. Parsot, C. Hamiaux, A.L. Page, The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems, *Curr Opin Microbiol* 6 (2003) 7-14.
- [190] P. Wattiau, B. Bernier, P. Deslee, T. Michiels, G.R. Cornelis, Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 10493-10497.
- [191] K. Ehrbar, A. Friebel, S.I. Miller, W.D. Hardt, Role of the *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) protein InvB in type III secretion of SopE and SopE2, two *Salmonella* effector proteins encoded outside of SPI-1, *J Bacteriol* 185 (2003) 6950-6967.
- [192] S.H. Lee, J.E. Galan, *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity, *Mol Microbiol* 51 (2004) 483-495.
- [193] M. Locher, B. Lehnert, K. Krauss, J. Heesemann, M. Groll, G. Wilharm, Crystal structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycT, *J Biol Chem* 280 (2005) 31149-31155.
- [194] C.E. Stebbins, Structural microbiology at the pathogen-host interface, *Cell Microbiol* 7 (2005) 1227-1236.
- [195] C.E. Stebbins, J.E. Galan, Priming virulence factors for delivery into the host, *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (2003) 738-743.
- [196] S.C. Birtalan, R.M. Phillips, P. Ghosh, Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens, *Mol Cell* 9 (2002) 971-980.
- [197] R. Menard, P. Sansonetti, C. Parsot, T. Vasselon, Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*, *Cell* 79 (1994) 515-525.
- [198] Y. Luo, M.G. Bertero, E.A. Frey, R.A. Pfuetzner, M.R. Wenk, L. Creagh, S.L. Marcus, D. Lim, F. Sicheri, C. Kay, C. Haynes, B.B. Finlay, N.C. Strynadka, Structural and biochemical characterization of the type III secretion chaperones CesT and SigE, *Nat Struct Biol* 8 (2001) 1031-1036.
- [199] A. van Eerde, C. Hamiaux, J. Perez, C. Parsot, B.W. Dijkstra, Structure of Spa15, a type III secretion chaperone from *Shigella flexneri* with broad specificity, *EMBO Rep* 5 (2004) 477-483.
- [200] A.L. Page, C. Parsot, Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades, *Mol Microbiol* 46 (2002) 1-11.
- [201] R. Menard, P. Sansonetti, C. Parsot, The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD, *EMBO J* 13 (1994) 5293-5302.
- [202] S.E. Birket, A.T. Harrington, M. Espina, N.D. Smith, C.M. Terry, N. Darboe, A.P. Markham, C.R. Middaugh, W.L. Picking, W.D. Picking, Preparation and characterization of translocator/chaperone complexes and their component proteins from *Shigella flexneri*, *Biochemistry* 46 (2007) 8128-8137.
- [203] T. Rathinavelan, L. Zhang, W.L. Picking, D.D. Weis, R.N. De Guzman, W. Im, A repulsive electrostatic mechanism for protein export through the type III secretion apparatus, *Biophys J* 98 452-461.
- [204] A. Abe, M. de Grado, R.A. Pfuetzner, C. Sanchez-Sanmartin, R. Devinney, J.L. Puente, N.C. Strynadka, B.B. Finlay, Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, requires a specific chaperone for stable secretion, *Mol Microbiol* 33 (1999) 1162-1175.
- [205] A.P. Boyd, I. Lambermont, G.R. Cornelis, Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE, *J Bacteriol* 182 (2000) 4811-4821.
- [206] C.R. Wulff-Strobel, A.W. Williams, S.C. Straley, LcrQ and SycH function together at the Ysc type III secretion system in *Yersinia pestis* to impose a hierarchy of secretion, *Mol Microbiol* 43 (2002) 411-423.
- [207] H. Matsumoto, G.M. Young, Essential role of the SycP chaperone in type III secretion of the YspP effector, *J Bacteriol* 191 (2009) 1703-1715.
- [208] C.S. Faherty, A.T. Maurelli, Spa15 of *Shigella flexneri* is Secreted Through the Type-III Secretion System and Prevents Staurosporine-Induced Apoptosis, *Infect Immun* (2009).

- [209] V. Deretic, B. Levine, Autophagy, immunity, and microbial adaptations, *Cell Host Microbe* 5 (2009) 527-549.
- [210] N. Mizushima, B. Levine, A.M. Cuervo, D.J. Klionsky, Autophagy fights disease through cellular self-digestion, *Nature* 451 (2008) 1069-1075.
- [211] J.F. Dice, Chaperone-mediated autophagy, *Autophagy* 3 (2007) 295-299.
- [212] A.E. Majeski, J.F. Dice, Mechanisms of chaperone-mediated autophagy, *Int J Biochem Cell Biol* 36 (2004) 2435-2444.
- [213] J.F. Dice, Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis, *Trends Biochem Sci* 15 (1990) 305-309.
- [214] S.A. Hayes, J.F. Dice, Roles of molecular chaperones in protein degradation, *J Cell Biol* 132 (1996) 255-258.
- [215] A.M. Cuervo, J.F. Dice, A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes, *Science* 273 (1996) 501-503.
- [216] S.R. Terlecky, H.L. Chiang, T.S. Olson, J.F. Dice, Protein and peptide binding and stimulation of in vitro lysosomal proteolysis by the 73-kDa heat shock cognate protein, *J Biol Chem* 267 (1992) 9202-9209.
- [217] U. Bandyopadhyay, S. Kaushik, L. Varticovski, A.M. Cuervo, The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane, *Mol Cell Biol* 28 (2008) 5747-5763.
- [218] M. Kon, A.M. Cuervo, Chaperone-mediated autophagy in health and disease, *FEBS Lett* (2009).
- [219] J. Ahlberg, L. Marzella, H. Glaumann, Uptake and degradation of proteins by isolated rat liver lysosomes. Suggestion of a microautophagic pathway of proteolysis, *Lab Invest* 47 (1982) 523-532.
- [220] T. Yorimitsu, D.J. Klionsky, Autophagy: molecular machinery for self-eating, *Cell Death Differ* 12 Suppl 2 (2005) 1542-1552.
- [221] P. Roberts, S. Moshitch-Moshkovitz, E. Kvam, E. O'Toole, M. Winey, D.S. Goldfarb, Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Biol Cell* 14 (2003) 129-141.
- [222] D.L. Tuttle, W.A. Dunn, Jr., Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *J Cell Sci* 108 (Pt 1) (1995) 25-35.
- [223] D.J. Klionsky, J.M. Cregg, W.A. Dunn, Jr., S.D. Emr, Y. Sakai, I.V. Sandoval, A. Sibirny, S. Subramani, M. Thumm, M. Veenhuis, Y. Ohsumi, A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes, *Dev Cell* 5 (2003) 539-545.
- [224] C. Checroun, T.D. Wehrly, E.R. Fischer, S.F. Hayes, J. Celli, Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 14578-14583.
- [225] A.O. Amer, M.S. Swanson, Autophagy is an immediate macrophage response to *Legionella pneumophila*, *Cell Microbiol* 7 (2005) 765-778.
- [226] M.S. Swanson, Autophagy: eating for good health, *J Immunol* 177 (2006) 4945-4951.
- [227] I. Vergne, S. Singh, E. Roberts, G. Kyei, S. Master, J. Harris, S. de Haro, J. Naylor, A. Davis, M. Delgado, V. Deretic, Autophagy in immune defense against *Mycobacterium tuberculosis*, *Autophagy* 2 (2006) 175-178.
- [228] T. Yano, S. Mita, H. Ohmori, Y. Oshima, Y. Fujimoto, R. Ueda, H. Takada, W.E. Goldman, K. Fukase, N. Silverman, T. Yoshimori, S. Kurata, Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in *drosophila*, *Nat Immunol* 9 (2008) 908-916.
- [229] C.L. Birmingham, V. Canadien, E. Gouin, E.B. Troy, T. Yoshimori, P. Cossart, D.E. Higgins, J.H. Brumell, *Listeria monocytogenes* evades killing by autophagy during colonization of host cells, *Autophagy* 3 (2007) 442-451.
- [230] B.F. Py, M.M. Lipinski, J. Yuan, Autophagy limits *Listeria monocytogenes* intracellular growth in the early phase of primary infection, *Autophagy* 3 (2007) 117-125.
- [231] N. Meyer-Morse, J.R. Robbins, C.S. Rae, S.N. Mochegova, M.S. Swanson, Z. Zhao, H.W. Virgin, D. Portnoy, Listeriolysin O is necessary and sufficient to induce autophagy during *Listeria monocytogenes* infection, *PLoS One* 5 e8610.

- [232] M. Delgado, S. Singh, S. De Haro, S. Master, M. Ponpuak, C. Dinkins, W. Ornatowski, I. Vergne, V. Deretic, Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity, *Immunol Rev* 227 (2009) 189-202.
- [233] N. Dupont, S. Lacas-Gervais, J. Bertout, I. Paz, B. Freche, G.T. Van Nhieu, F.G. van der Goot, P.J. Sansonetti, F. Lafont, Shigella phagocytic vacuolar membrane remnants participate in the cellular response to pathogen invasion and are regulated by autophagy, *Cell Host Microbe* 6 (2009) 137-149.
- [234] L. Yu, L. Strandberg, M.J. Lenardo, The selectivity of autophagy and its role in cell death and survival, *Autophagy* 4 (2008) 567-573.
- [235] Y. Kabeya, N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi, T. Yoshimori, LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing, *EMBO J* 19 (2000) 5720-5728.
- [236] D. Mijaljica, M. Prescott, R.J. Devenish, Endoplasmic reticulum and Golgi complex: Contributions to, and turnover by, autophagy, *Traffic* 7 (2006) 1590-1595.
- [237] K. Matsunaga, T. Saitoh, K. Tabata, H. Omori, T. Satoh, N. Kurotori, I. Maejima, K. Shirahama-Noda, T. Ichimura, T. Isobe, S. Akira, T. Noda, T. Yoshimori, Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages, *Nat Cell Biol* 11 (2009) 385-396.
- [238] B. Levine, D.J. Klionsky, Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy, *Dev Cell* 6 (2004) 463-477.
- [239] K. Kirkegaard, M.P. Taylor, W.T. Jackson, Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms, *Nat Rev Microbiol* 2 (2004) 301-314.
- [240] T. Hanada, N.N. Noda, Y. Satomi, Y. Ichimura, Y. Fujioka, T. Takao, F. Inagaki, Y. Ohsumi, The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy, *J Biol Chem* 282 (2007) 37298-37302.
- [241] N. Fujita, T. Itoh, H. Omori, M. Fukuda, T. Noda, T. Yoshimori, The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy, *Mol Biol Cell* 19 (2008) 2092-2100.
- [242] S. Pankiv, T.H. Clausen, T. Lamark, A. Brech, J.A. Bruun, H. Outzen, A. Overvatn, G. Bjorkoy, T. Johansen, p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy, *J Biol Chem* 282 (2007) 24131-24145.
- [243] V. Kirkin, T. Lamark, T. Johansen, I. Dikic, NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets, *Autophagy* 5 (2009) 732-733.
- [244] Y.S. Rajawat, Z. Hilioti, I. Bossis, Aging: central role for autophagy and the lysosomal degradative system, *Ageing Res Rev* 8 (2009) 199-213.
- [245] E.L. Eskelinen, Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells, *Autophagy* 1 (2005) 1-10.
- [246] L. English, M. Chemali, J. Duron, C. Rondeau, A. Laplante, D. Gingras, D. Alexander, D. Leib, C. Norbury, R. Lippe, M. Desjardins, Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection, *Nat Immunol* 10 (2009) 480-487.
- [247] D. Biswas, O.S. Qureshi, W.Y. Lee, J.E. Croudace, M. Mura, D.A. Lammas, ATP-induced autophagy is associated with rapid killing of intracellular mycobacteria within human monocytes/macrophages, *BMC Immunol* 9 (2008) 35.
- [248] T. Beck, M.N. Hall, The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors, *Nature* 402 (1999) 689-692.
- [249] I. Holen, P.B. Gordon, P.O. Seglen, Protein kinase-dependent effects of okadaic acid on hepatocytic autophagy and cytoskeletal integrity, *Biochem J* 284 (Pt 3) (1992) 633-636.
- [250] T. Kawamata, Y. Kamada, Y. Kabeya, T. Sekito, Y. Ohsumi, Organization of the pre-autophagosomal structure responsible for autophagosome formation, *Mol Biol Cell* 19 (2008) 2039-2050.
- [251] C. Liang, J.S. Lee, K.S. Inn, M.U. Gack, Q. Li, E.A. Roberts, I. Vergne, V. Deretic, P. Feng, C. Akazawa, J.U. Jung, Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking, *Nat Cell Biol* 10 (2008) 776-787.

- [252] G.M. Fimia, A. Stoykova, A. Romagnoli, L. Giunta, S. Di Bartolomeo, R. Nardacci, M. Corazzari, C. Fuoco, A. Ucar, P. Schwartz, P. Gruss, M. Piacentini, K. Chowdhury, F. Cecconi, Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system, *Nature* 447 (2007) 1121-1125.
- [253] Y. Takahashi, D. Coppola, N. Matsushita, H.D. Cuaing, M. Sun, Y. Sato, C. Liang, J.U. Jung, J.Q. Cheng, J.J. Mule, W.J. Pledger, H.G. Wang, Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis, *Nat Cell Biol* 9 (2007) 1142-1151.
- [254] E.L. Axe, S.A. Walker, M. Manifava, P. Chandra, H.L. Roderick, A. Habermann, G. Griffiths, N.T. Ktistakis, Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum, *J Cell Biol* 182 (2008) 685-701.
- [255] K. Obara, T. Sekito, K. Niimi, Y. Ohsumi, The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate and exerts an essential function, *J Biol Chem* 283 (2008) 23972-23980.
- [256] A. Petiot, E. Ogier-Denis, E.F. Blommaert, A.J. Meijer, P. Codogno, Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells, *J Biol Chem* 275 (2000) 992-998.
- [257] B. Levine, Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense, *Cell* 120 (2005) 159-162.
- [258] I. Nakagawa, A. Amano, N. Mizushima, A. Yamamoto, H. Yamaguchi, T. Kamimoto, A. Nara, J. Funao, M. Nakata, K. Tsuda, S. Hamada, T. Yoshimori, Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*, *Science* 306 (2004) 1037-1040.
- [259] S. Alonso, K. Pethe, D.G. Russell, G.E. Purdy, Lysosomal killing of *Mycobacterium* mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 6031-6036.
- [260] M.G. Gutierrez, S.S. Master, S.B. Singh, G.A. Taylor, M.I. Colombo, V. Deretic, Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages, *Cell* 119 (2004) 753-766.
- [261] S.B. Singh, A.S. Davis, G.A. Taylor, V. Deretic, Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria, *Science* 313 (2006) 1438-1441.
- [262] C.L. Birmingham, J.H. Brumell, Autophagy recognizes intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in damaged vacuoles, *Autophagy* 2 (2006) 156-158.
- [263] Z. Zhao, B. Fux, M. Goodwin, I.R. Dunay, D. Strong, B.C. Miller, K. Cadwell, M.A. Delgado, M. Ponpuak, K.G. Green, R.E. Schmidt, N. Mizushima, V. Deretic, L.D. Sibley, H.W. Virgin, Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens, *Cell Host Microbe* 4 (2008) 458-469.
- [264] N. Jounai, F. Takeshita, K. Kobiyama, A. Sawano, A. Miyawaki, K.Q. Xin, K.J. Ishii, T. Kawai, S. Akira, K. Suzuki, K. Okuda, The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 14050-14055.
- [265] M.A. Delgado, R.A. Elmaoued, A.S. Davis, G. Kyei, V. Deretic, Toll-like receptors control autophagy, *EMBO J* 27 (2008) 1110-1121.
- [266] M.A. Sanjuan, C.P. Dillon, S.W. Tait, S. Moshiah, F. Dorsey, S. Connell, M. Komatsu, K. Tanaka, J.L. Cleveland, S. Withoff, D.R. Green, Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis, *Nature* 450 (2007) 1253-1257.
- [267] Y. Xu, C. Jagannath, X.D. Liu, A. Sharafkhaneh, K.E. Kolodziejska, N.T. Eissa, Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity, *Immunity* 27 (2007) 135-144.
- [268] T. Saitoh, N. Fujita, M.H. Jang, S. Uematsu, B.G. Yang, T. Satoh, H. Omori, T. Noda, N. Yamamoto, M. Komatsu, K. Tanaka, T. Kawai, T. Tsujimura, O. Takeuchi, T. Yoshimori, S. Akira, Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production, *Nature* 456 (2008) 264-268.
- [269] J. Nedjic, M. Aichinger, J. Emmerich, N. Mizushima, L. Klein, Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance, *Nature* 455 (2008) 396-400.
- [270] C. Li, E. Capan, Y. Zhao, J. Zhao, D. Stolz, S.C. Watkins, S. Jin, B. Lu, Autophagy is induced in CD4⁺ T cells and important for the growth factor-withdrawal cell death, *J Immunol* 177 (2006) 5163-5168.

- [271] B.C. Miller, Z. Zhao, L.M. Stephenson, K. Cadwell, H.H. Pua, H.K. Lee, N.N. Mizushima, A. Iwasaki, Y.W. He, W. Swat, H.W.t. Virgin, The autophagy gene ATG5 plays an essential role in B lymphocyte development, *Autophagy* 4 (2008) 309-314.
- [272] H.H. Pua, Y.W. He, Maintaining T lymphocyte homeostasis: another duty of autophagy, *Autophagy* 3 (2007) 266-267.
- [273] H.H. Pua, I. Dzhagalov, M. Chuck, N. Mizushima, Y.W. He, A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation, *J Exp Med* 204 (2007) 25-31.
- [274] D. Schmid, C. Munz, Innate and adaptive immunity through autophagy, *Immunity* 27 (2007) 11-21.
- [275] D. Schmid, M. Pypaert, C. Munz, Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes, *Immunity* 26 (2007) 79-92.
- [276] H.H. Pua, J. Guo, M. Komatsu, Y.W. He, Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes, *J Immunol* 182 (2009) 4046-4055.
- [277] K. Cadwell, J.Y. Liu, S.L. Brown, H. Miyoshi, J. Loh, J.K. Lennerz, C. Kishi, W. Kc, J.A. Carrero, S. Hunt, C.D. Stone, E.M. Brunt, R.J. Xavier, B.P. Sleckman, E. Li, N. Mizushima, T.S. Stappenbeck, H.W.t. Virgin, A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells, *Nature* 456 (2008) 259-263.
- [278] R.M. Andrade, M. Wessendarp, M.J. Gubbels, B. Striepen, C.S. Subauste, CD40 induces macrophage anti-Toxoplasma gondii activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes, *J Clin Invest* 116 (2006) 2366-2377.
- [279] Y.M. Ling, M.H. Shaw, C. Ayala, I. Coppens, G.A. Taylor, D.J. Ferguson, G.S. Yap, Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of Toxoplasma gondii in primed effector macrophages, *J Exp Med* 203 (2006) 2063-2071.
- [280] J. Harris, S.A. De Haro, S.S. Master, J. Keane, E.A. Roberts, M. Delgado, V. Deretic, T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular Mycobacterium tuberculosis, *Immunity* 27 (2007) 505-517.
- [281] J.P. Butchar, T.J. Cremer, C.D. Clay, M.A. Gavrilin, M.D. Wewers, C.B. Marsh, L.S. Schlesinger, S. Tridandapani, Microarray analysis of human monocytes infected with Francisella tularensis identifies new targets of host response subversion, *PLoS One* 3 (2008) e2924.
- [282] M. Cullinane, L. Gong, X. Li, N. Lazar-Adler, T. Tra, E. Wolvetang, M. Prescott, J.D. Boyce, R.J. Devenish, B. Adler, Stimulation of autophagy suppresses the intracellular survival of Burkholderia pseudomallei in mammalian cell lines, *Autophagy* 4 (2008) 744-753.
- [283] C.L. Birmingham, V. Canadien, N.A. Kaniuk, B.E. Steinberg, D.E. Higgins, J.H. Brumell, Listeriolysin O allows Listeria monocytogenes replication in macrophage vacuoles, *Nature* 451 (2008) 350-354.
- [284] T. Minamino, H.U. Ferris, N. Moriya, M. Kihara, K. Namba, Two parts of the T3S4 domain of the hook-length control protein FliK are essential for the substrate specificity switching of the flagellar type III export apparatus, *J.Mol.Biol.* 362 (2006) 1148-1158.
- [285] A. Botteaux, M. Sani, C.A. Kayath, E.J. Boekema, A. Allaoui, Spa32 interaction with the inner-membrane Spa40 component of the type III secretion system of Shigella flexneri is required for the control of the needle length by a molecular tape measure mechanism, *Mol Microbiol* (2008).
- [286] S.F. Zenk, D. Stabat, J.L. Hodgkinson, A.K. Veenendaal, S. Johnson, A.J. Blocker, Identification of minor inner-membrane components of the Shigella type III secretion system 'needle complex', *Microbiology* 153 (2007) 2405-2415.
- [287] J.E. Deane, S.C. Graham, E.P. Mitchell, D. Flot, S. Johnson, S.M. Lea, Crystal structure of Spa40, the specificity switch for the Shigella flexneri type III secretion system, *Mol Microbiol* 69 (2008) 267-276.
- [288] G.M. Fraser, T. Hirano, H.U. Ferris, L.L. Devgan, M. Kihara, R.M. Macnab, Substrate specificity of type III flagellar protein export in Salmonella is controlled by subdomain interactions in FlhB, *Mol.Microbiol.* 48 (2003) 1043-1057.
- [289] K.E. Riordan, O. Schneewind, YscU cleavage and the assembly of Yersinia type III secretion machine complexes, *Mol Microbiol* 68 (2008) 1485-1501.

- [290] K. Zhu, B. Gonzalez-Pedrajo, R.M. Macnab, Interactions among membrane and soluble components of the flagellar export apparatus of *Salmonella*, *Biochemistry* 41 (2002) 9516-9524.
- [291] T. Minamino, K. Namba, Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export, *Nature* 451 (2008) 485-488.
- [292] R. Zarivach, W. Deng, M. Vuckovic, H.B. Felise, H.V. Nguyen, S.I. Miller, B.B. Finlay, N.C. Strynadka, Structural analysis of the essential self-cleaving type III secretion proteins EscU and SpaS, *Nature* 453 (2008) 124-127.
- [293] P.J. Edqvist, J. Olsson, M. Lavander, L. Sundberg, A. Forsberg, H. Wolf-Watz, S.A. Lloyd, YscP and YscU regulate substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 2259-2266.
- [294] N. Moriya, T. Minamino, K.T. Hughes, R.M. Macnab, K. Namba, The type III flagellar export specificity switch is dependent on FliK ruler and a molecular clock, *J. Mol. Biol.* 359 (2006) 466-477.
- [295] T. Minamino, K. Imada, A. Tahara, M. Kihara, R.M. Macnab, K. Namba, Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Salmonella* FliI, the ATPase component of the type III flagellar protein-export apparatus, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 62 (2006) 973-975.
- [296] C.J. Hueck, Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (1998) 379-433.
- [297] P.B. Carpenter, A.R. Zuberi, G.W. Ordal, *Bacillus subtilis* flagellar proteins FliP, FliQ, FliR and FlhB are related to *Shigella flexneri* virulence factors, *Gene* 137 (1993) 243-245.
- [298] H.C. Huang, R.H. Lin, C.J. Chang, A. Collmer, W.L. Deng, The complete *hrp* gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 includes two blocks of genes required for harpinPss secretion that are arranged colinearly with *Yersinia* *ysc* homologs, *Mol. Plant Microbe Interact.* 8 (1995) 733-746.
- [299] J. Malakooti, B. Ely, P. Matsumura, Molecular characterization, nucleotide sequence, and expression of the *fliO*, *fliP*, *fliQ*, and *fliR* genes of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 189-197.
- [300] E.A. Groisman, H. Ochman, Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cells by *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*, *EMBO J.* 12 (1993) 3779-3787.
- [301] C.M. Collazo, J.E. Galan, Requirement for exported proteins in secretion through the invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium*, *Infect. Immun.* 64 (1996) 3524-3531.
- [302] A. Sukhan, T. Kubori, J. Wilson, J.E. Galan, Genetic analysis of assembly of the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* type III secretion-associated needle complex, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 1159-1167.
- [303] F. Fan, K. Ohnishi, N.R. Francis, R.M. Macnab, The FliP and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*, putative components of the type III flagellar export apparatus, are located in the flagellar basal body, *Mol. Microbiol.* 26 (1997) 1035-1046.
- [304] J.L. McMurtry, J.S. Van Arnam, M. Kihara, R.M. Macnab, Analysis of the cytoplasmic domains of *Salmonella* FlhA and interactions with components of the flagellar export machinery, *J. Bacteriol.* 186 (2004) 7586-7592.
- [305] C. Penno, A. Hachani, L. Biskri, P. Sansonetti, A. Allaoui, C. Parsot, Transcriptional slippage controls production of type III secretion apparatus components in *Shigella flexneri*, *Mol. Microbiol.* 62 (2006) 1460-1468.
- [306] Y. Saijo-Hamano, T. Minamino, R.M. Macnab, K. Namba, Structural and functional analysis of the C-terminal cytoplasmic domain of FlhA, an integral membrane component of the type III flagellar protein export apparatus in *Salmonella*, *J. Mol. Biol.* 343 (2004) 457-466.
- [307] K.A. Fields, G.V. Plano, S.C. Straley, A low-Ca²⁺ response (LCR) secretion (*ysc*) locus lies within the *lcrB* region of the LCR plasmid in *Yersinia pestis*, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 569-579.
- [308] L. Purins, L. Van Den Bosch, V. Richardson, R. Morona, Coiled-coil regions play a role in the function of the *Shigella flexneri* O-antigen chain length regulator WzzpHS2, *Microbiology* 154 (2008) 1104-1116.
- [309] J.L. McMurtry, J.W. Murphy, B. Gonzalez-Pedrajo, The FliN-FliH interaction mediates localization of flagellar export ATPase FliI to the C ring complex, *Biochemistry* 45 (2006) 11790-11798.
- [310] T. Minamino, R.M. Macnab, Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates, *Mol. Microbiol.* 35 (2000) 1052-1064.

- [311] E.A. Creasey, R.M. Delahay, S.J. Daniell, G. Frankel, Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*, *Microbiology* 149 (2003) 2093-2106.
- [312] A.L. Page, M. Fromont-Racine, P. Sansonetti, P. Legrain, C. Parsot, Characterization of the interaction partners of secreted proteins and chaperones of *Shigella flexneri*, *Mol Microbiol* 42 (2001) 1133-1145.
- [313] C.S. Faherty, A.T. Maurelli, Spa15 of *Shigella flexneri* is secreted through the type III secretion system and prevents staurosporine-induced apoptosis, *Infect Immun* 77 (2009) 5281-5290.
- [314] M.J. Garner, R.D. Hayward, V. Koronakis, The *Salmonella* pathogenicity island 1 secretion system directs cellular cholesterol redistribution during mammalian cell entry and intracellular trafficking, *Cell Microbiol* 4 (2002) 153-165.
- [315] F. Lafont, G. Tran Van Nhieu, K. Hanada, P. Sansonetti, F.G. van der Goot, Initial steps of *Shigella* infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction, *EMBO J* 21 (2002) 4449-4457.
- [316] N. Zobiack, U. Rescher, S. Laarmann, S. Michgehl, M.A. Schmidt, V. Gerke, Cell-surface attachment of pedestal-forming enteropathogenic *E. coli* induces a clustering of raft components and a recruitment of annexin 2, *J Cell Sci* 115 (2002) 91-98.
- [317] N.S. Lossi, N. Rolhion, A.I. Magee, C. Boyle, D.W. Holden, The *Salmonella* SPI-2 effector SseJ exhibits eukaryotic activator-dependent phospholipase A and glycerophospholipid : cholesterol acyltransferase activity, *Microbiology* 154 (2008) 2680-2688.
- [318] M.B. Ohlson, Z. Huang, N.M. Alto, M.P. Blanc, J.E. Dixon, J. Chai, S.I. Miller, Structure and function of *Salmonella* SifA indicate that its interactions with SKIP, SseJ, and RhoA family GTPases induce endosomal tubulation, *Cell Host Microbe* 4 (2008) 434-446.
- [319] C. de Chastellier, L. Thilo, Cholesterol depletion in *Mycobacterium avium*-infected macrophages overcomes the block in phagosome maturation and leads to the reversible sequestration of viable mycobacteria in phagolysosome-derived autophagic vacuoles, *Cell Microbiol* 8 (2006) 242-256.
- [320] B. Arellano-Reynoso, N. Lapaque, S. Salcedo, G. Briones, A.E. Ciochini, R. Ugalde, E. Moreno, I. Moriyon, J.P. Gorvel, Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival, *Nat Immunol* 6 (2005) 618-625.
- [321] S. Ishibashi, T. Yamazaki, K. Okamoto, Association of autophagy with cholesterol-accumulated compartments in Niemann-Pick disease type C cells, *J Clin Neurosci* 16 (2009) 954-959.
- [322] Q.K. Yue, I.J. Kass, N.S. Sampson, A. Vrielink, Crystal structure determination of cholesterol oxidase from *Streptomyces* and structural characterization of key active site mutants, *Biochemistry* 38 (1999) 4277-4286.
- [323] G. Boissy, E. de La Fortelle, R. Kahn, J.C. Huet, G. Bricogne, J.C. Pernollet, S. Brunie, Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins, *Structure* 4 (1996) 1429-1439.
- [324] S. Fefeu, S. Bouaziz, J.C. Huet, J.C. Pernollet, E. Guittet, Three-dimensional solution structure of beta cryptogein, a beta elicitin secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*, *Protein Sci* 6 (1997) 2279-2284.
- [325] V. Mikes, M.L. Milat, M. Ponchet, F. Panabieres, P. Ricci, J.P. Blein, Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins, *Biochem Biophys Res Commun* 245 (1998) 133-139.
- [326] H. Osman, S. Vauthrin, V. Mikes, M.L. Milat, F. Panabieres, A. Marais, S. Brunie, B. Maume, M. Ponchet, J.P. Blein, Mediation of elicitin activity on tobacco is assumed by elicitin-sterol complexes, *Mol Biol Cell* 12 (2001) 2825-2834.
- [327] G. Boissy, M. O'Donohue, O. Gaudemer, V. Perez, J.C. Pernollet, S. Brunie, The 2.1 Å structure of an elicitin-ergosterol complex: a recent addition to the Sterol Carrier Protein family, *Protein Sci* 8 (1999) 1191-1199.
- [328] M.P. Stevens, J.M. Stevens, R.L. Jeng, L.A. Taylor, M.W. Wood, P. Hawes, P. Monaghan, M.D. Welch, E.E. Galyov, Identification of a bacterial factor required for actin-based motility of *Burkholderia pseudomallei*, *Mol Microbiol* 56 (2005) 40-53.

- [329] C.J. Czuprynski, R.A. Welch, Biological effects of RTX toxins: the possible role of lipopolysaccharide, *Trends Microbiol* 3 (1995) 480-483.
- [330] K.J. Satchell, MARTX, multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin toxins, *Infect Immun* 75 (2007) 5079-5084.
- [331] P.J. Lupardus, A. Shen, M. Bogyo, K.C. Garcia, Small molecule-induced allosteric activation of the *Vibrio cholerae* RTX cysteine protease domain, *Science* 322 (2008) 265-268.
- [332] K.L. Sheahan, C.L. Cordero, K.J. Satchell, Autoprocessing of the *Vibrio cholerae* RTX toxin by the cysteine protease domain, *EMBO J* 26 (2007) 2552-2561.
- [333] C.L. Cordero, D.S. Kudryashov, E. Reisler, K.J. Satchell, The Actin cross-linking domain of the *Vibrio cholerae* RTX toxin directly catalyzes the covalent cross-linking of actin, *J Biol Chem* 281 (2006) 32366-32374.
- [334] K.J. Fullner, J.J. Mekalanos, In vivo covalent cross-linking of cellular actin by the *Vibrio cholerae* RTX toxin, *EMBO J* 19 (2000) 5315-5323.
- [335] K.L. Sheahan, K.J. Satchell, Inactivation of small Rho GTPases by the multifunctional RTX toxin from *Vibrio cholerae*, *Cell Microbiol* 9 (2007) 1324-1335.
- [336] J. Pei, N.V. Grishin, The Rho GTPase inactivation domain in *Vibrio cholerae* MARTX toxin has a circularly permuted papain-like thiol protease fold, *Proteins* 77 (2009) 413-419.
- [337] M.B. Goldberg, P.J. Sansonetti, *Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization, *Infect Immun* 61 (1993) 4941-4946.
- [338] K. Galmbacher, M. Heisig, C. Hotz, J. Wischhusen, A. Galmiche, B. Bergmann, I. Gentschev, W. Goebel, U.R. Rapp, J. Fensterle, *Shigella* mediated depletion of macrophages in a murine breast cancer model is associated with tumor regression, *PLoS One* 5 e9572.
- [339] M. Chamekh, A. Phalipon, R. Quertainmont, I. Salmon, P. Sansonetti, A. Allaoui, Delivery of biologically active anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1ra in vivo by the *Shigella* type III secretion apparatus, *J Immunol* 180 (2008) 4292-4298.