

Université de Montréal

New insights into small molecules inhibitors and protein-protein interactions of VirB8 : a critical conserved component of the type IV secretion system.

par

Ingrid UM NLEND

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences
en Biochimie

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé:

New insights into small molecules inhibitors and protein-protein interactions of VirB8 : a critical conserved component of the type IV secretion system

Présenté par :
Ingrid UM NLEND

évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Docteur Luc Desgroseillers, président-rapporteur
Docteur Christian Baron, directeur de recherche
Docteur Rikard Blunck, membre du jury

Résumé

Les systèmes bactériens de sécrétion de type IV (T4SS) sont constitués d'un ensemble de 8 à 12 protéines conservées. Ces dernières sont utilisées lors de la translocation de protéines, la translocation de complexes ADN-protéines mais aussi pour le transport de ces derniers au travers de la membrane cellulaire. Les T4SS, en tant que facteurs de virulence pour beaucoup de pathogènes comme *Brucella suis*, sont donc d'excellents modèles cibles pour le développement de médicaments d'antivirulence. Ces médicaments, en privant le pathogène de son facteur essentiel de virulence : le T4SS, constituent une alternative ou encore une amélioration des traitements antibiotiques utilisés actuellement. VirB8, un facteur d'assemblage conservé dans le T4SS, forme des dimères qui sont importants pour la fonction des T4SS dans ces pathogènes. De par ses interactions multiples, VirB8 est un excellent modèle pour l'analyse des facteurs d'assemblage mais aussi en tant que cible de médicaments qui empêcheraient son interaction avec d'autres protéines et qui, *in fine*, désarmeraient les bactéries en les privant de leur fonctions essentielles de virulence. À ce jour, nous savons qu'il existe un équilibre monomère-dimère et un processus d'homodimerization de VirB8 dont l'importance est vitale pour le fonctionnement biologique des T4SSs. En se basant sur des essais quantitatifs d'interaction, nous avons identifié (i) des sites potentiels d'interaction avec d'autres protéines VirB du T4SS mais aussi (ii) isolé des petites molécules inhibitrices afin de tester la fonction protéique de VirB8. Afin de déterminer les acides aminés importants pour l'hétérodimerization de VirB8 avec VirB10, nous avons effectué des expériences de mutagenèse aléatoire, de phage display et d'arrimage moléculaire *in silico*. Ces expériences ont démontré l'importance de trois acides aminés localisés sur le feuillet β : R160, S162, T164 et I165. Ces derniers seraient importants pour l'association de VirB8 avec VirB10 étant donné que leur mutagenèse entraîne une diminution de la formation du complexe VirB8-VirB10. L'objectif actuel de notre projet de recherche est de pouvoir mieux comprendre mais aussi d'évaluer le rôle de VirB8 dans l'assemblage du T4SS. Grâce à une méthode de criblage adaptée à partir de la structure de VirB8, nous avons pu identifié une petite molécule inhibitrice BAR-068, qui aurait un rôle prometteur dans l'inhibition du T4SS. Nous avons utilisé la spectroscopie par fluorescence, l'essai à deux hybrides, le cross-linking et la cristallographie afin de déterminer le mécanisme d'interaction existant entre VirB8 et BAR-068. Ces travaux pourraient permettre de nombreuses avancées, notamment en termes de compréhension des mécanismes d'inhibition du T4SS. Notre objectif ultime est de pouvoir caractériser la séquence d'évènements essentiels à l'assemblage et au fonctionnement du T4SS. De manière globale, notre projet de recherche permettrait de révéler les grands principes d'assemblage des protéines membranaires, les processus de sécrétion de protéines chez les bactéries mais aussi de proposer une nouvelle stratégie lors du développement de drogues antimicrobiennes.

Mots-clés : Infections bactériennes, pathogènes, bactéries à Gram-négatif, facteur de virulence, virulence, médicaments d'antivirulence, interactions protéine-protéine.

Abstract

Bacterial Type IV secretion systems (T4SSs) are complexes that are constituted of 8 to 12 conserved proteins and used by many Gram-negative bacteria for the translocation of proteins and DNA-protein complexes as well as for the transport of DNA-protein complexes across their cell envelope. T4SS are excellent model targets for the development of antivirulence drugs as they are essential virulence factor for many bacterial pathogens, such as *Brucella suis*. Antivirulence drugs that deprive the pathogen of its essential virulence factor, the T4SS, would constitute alternatives to or enhancements of current antibiotic treatment. VirB8, a conserved core assembly factor in T4SS, forms homo- and heterodimers that are very important for T4SS function in these pathogens. Due to its multiple interactions, we hypothesized that VirB8 is an excellent model for the analysis of assembly factors but also a potential target for drugs that could target its protein-protein interactions, which would disarm bacteria by depriving them of their essential virulence functions. The existence of a monomer-dimer equilibrium and self-association of VirB8 were previously demonstrated as being essential for T4SS biological activity. Guided by quantitative interaction assays, we here identified (i) potential interaction sites with other T4SS components and (ii) isolated small molecules inhibitors as probes for protein function. To further determine the residues important for heterodimerization of VirB8 with VirB10, we conducted alanine-scanning mutagenesis, phage display and *in silico* docking. These experiments demonstrated that residues located on the β sheet R160, S162, T164 and I165 are involved in the association of VirB8 and VirB10 and mutagenesis of these residues led to a decrease in the heterodimer formation. The general objective of our research is to gain quantitative insights into the role VirB8 plays in T4SS assembly. Based on a structure-inspired high-throughput screening approach, we identified a promising compound BAR-068 that inhibits VirB8 interactions in the nM range. We used spectroscopy by fluorescence, a bacterial two-hybrid assay, chemical cross-linking and crystallography in order to decipher the mechanism of interactions of this inhibitor with VirB8. Ultimately, this may lead to advance the understanding of T4SS inhibition. Our ultimate objective is to characterize the sequence of events between VirB8 and other VirB factors that guides T4SS complex assembly and function. Our research will reveal general principles of membrane protein complex assembly that will enhance our knowledge of a number of different areas including bacterial protein secretion. In addition, this research will inform an innovative strategy for the development of novel antimicrobial drugs.

Keywords : Bacterial infections, secretion systems, pathogens, Gram-negative bacteria, virulence factors, virulence, antivirulence drugs, protein-protein interactions.

Table des matières

Liste des tableaux	vi
Liste des figures	vii
Liste des abréviations	ix
I. Introduction	12
I.1 La sécrétion chez les bactéries à Gram-négatif.....	12
I.2 Les systèmes de sécrétion.....	15
I.2.1 Les systèmes de sécrétion <i>Sec</i> - et <i>Tat</i> - dépendants.....	16
I.2.2 Les systèmes de sécrétions <i>Sec</i> - indépendants.....	20
I.2.3 Les systèmes <i>VirB</i> - chez <i>Brucella</i>	21
I.2.4 Le T4SS.....	22
I.2.5 Le T4SS : une structure élucidée.....	24
I.3 Biogénèse du T4SS.....	29
I.4. Objectifs du mémoire.....	33
II. Méthode expérimentale	34
II.1. Méthodologie expérimentale pour étudier les interactions protéine-protéine.....	34
II.1.1. <i>Phage Display</i>	34
II.1.2. Caractérisation des interfaces d'interaction par Mutagenèse de type..... <i>Alanine-Scanning</i>	36
II.1.3. Prédiction du site d'interaction protéine-protéine par..... arrimage moléculaire.....	37
II.1.4. Essai bactérien à deux hybrides : études des interactions.....	

protéine-protéine <i>in vivo</i>	38
II.1.5. <i>Chemical crosslinking</i>	40
II.2. Méthodologie expérimentale pour étudier les interactions protéine-ligand.....	
in <i>vitro</i>	41
II.2.1. La spectroscopie de fluorescence	41
II.2.1.1 La fluorescence des résidus tryptophanes	42
II.2.1.2 <i>Difference spectrum</i>	44
III. Article : New insights into small molecules inhibitors and protein-protein interactions of VirB8: a critical conserved component of the type IV secretion system	45
III.1. Contribution des auteurs.....	45
III.2. Texte de l'article.....	45
III.2.1. Abstract.....	46
III.2.2. Highlights.....	46
III.2.3. Introduction.....	47
III.2.4. Results.....	48
III.2.5. Discussion.....	65
III.2.6. Experimental Procedures.....	69
III.2.7. Acknowledgments.....	73
III.2.8. References.....	74
IV. Discussion	77
IV.1. Retour sur les résultats de l'article.....	77
IV.2. Travaux futurs et perspectives.....	78
V. Bibliographie	i

VI. Annexe.....i

Liste des tableaux

Table 1. Les voies de sécrétion dans les bactéries à Gram-négatif15

Listes des tableaux - Article

Table 1. Compounds used in this study and their impacts on VirB8-VirB8 and VirB8-VirB10 interaction *in vivo*.....58

Table 2. Titration of B8I-2 derivatives against VirB8sp monomer *in vitro*.....60

Liste des figures

Figure 1. Différence dans l'organisation des enveloppes cellulaires chez les bactéries à gram-positif ou monoderme (A) et à Gram-négatif ou diderme (b).....	14
Figure 2. Structure du canal de translocation du T4SS au travers de l'enveloppe cellulaire.....	23
Figure 3. Structure de VirB8 obtenue par cristallographie à rayons X. Code PDB: 2BHM.....	27
Figure 4. Structure du <i>core complex</i> T4SS obtenue par microscopie cryo-électronique du plasmide de conjugaison pKM101.....	31
Figure 5. Le complexe de la membrane externe du T4SS.....	32
Figure 6. Principe général de l'identification d'interaction protéine–ligand par phage display.....	35
Figure 7. Principe de l'essai bactérien à deux hybrides.....	40
Figure 8. Principe général de la spectroscopie de fluorescence.....	42
Figure 9. Spectres d'absorption de différents acides aminés : tryptophane, tyrosine et phenylalanine dans de l'eau.....	43

Listes des figures - Article

Figure 1. Identification of VirB10 binding peptides by phage display.....	48
Figure 2. Localization of amino acids changed in this study shown on the <i>B. suis</i> VirB8sp x-ray structure.....	50
Figure 3. BTH β -galactosidase activity assay reveals critical residues in the interaction of VirB8 and VirB10.....	51
Figure 4. A cartoon representation of VirB8-VirB10 complex with residues at the interface predicted to participate in the dimer interaction.....	53
Figure 5. Framework of chemical synthesis applied on the scaffold of inhibitor B8I-2.....	55
Figure 6. Dose response and determination of the effect of BAR-068 on VirB8 interactions.....	57

Figure 7. Identification of tryptophan residues located around the inhibitor binding site of VirB8_{sp}.....59

Figure 8. Absorption spectra of VirB8_{sp} before and after exposure to increasing concentration of inhibitors.....62

Figure 9. Cross-linking experiments show effects of BAR-068 on dimerization of VirB8_{sp}.....64

Liste des abréviations

ME : External membrane /la membrane externe

MP: Cell membrane /membrane plasmique

LPS : Liposaccharid /liposaccharide

MI: Internal membrane / membrane interne

T1SS : Système de sécrétion de type I

T2SS : Système de sécrétion de type II

T3SS : Système de sécrétion de type III

T4SS : Système de sécrétion de type IV

T5SS : Système de sécrétion de type V

T6SS : Système de sécrétion de type VI

OMFs : Outer Membrane Factors / Famille de protéines localisées dans la membrane externe

VirB8_{sp} : periplasmique version of VirB8 from *Brucella Suis* /portion periplasmique de VirB8 provenant de *B. Suis*

BTH : Bacterial two hybrid assay / Essai à deux hybrides bactérien

K_D : Dissociation constant / Constante de dissociation

HTS : High-throughput screening / Criblage à haut débit

AC: Adenylate Cyclase

DMSO : Dimethyl Sulfoxide

Remerciements

J'aimerais dans un premier temps remercier le Docteur Christian Baron de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, mais aussi et surtout, pour la patience et la compréhension dont il a su faire preuve durant toute la durée de ma maîtrise. Son encadrement m'a permis d'oser mais aussi de gagner en rigueur scientifique et en autonomie tout en me passionnant pour l'étude du système de sécrétion de type IV. Je tiens aussi à remercier le Docteur Jurgen Sygusch qui, en tant que parrain, a toujours prêté une oreille attentive durant tout le cheminement de ma maîtrise, qui m'a toujours poussé à essayer sans avoir peur des conséquences et qui a toujours été à l'affût de nouveaux résultats et de nouvelles discussions scientifiques. J'ai eu l'opportunité de travailler sur un projet passionnant et prometteur tout en développant ma connaissance d'outils à la pointe de l'étude des protéines. Ma formation ainsi que mon apprentissage au sein du groupe du Docteur Baron me serviront tout au long de ma carrière académique et professionnelle.

Dans un second temps, j'aimerais remercier l'ensemble des membres du groupe de recherche, avec qui j'ai pu non seulement découvrir le *wet lab* mais aussi me perfectionner dans un environnement chaleureux, stimulant et convivial. Ainsi, je remercie Benoît Bessette pour sa présence, son aide précieuse et surtout sa patience vis-à-vis de mes innombrables interrogations; Jonathan Smart pour ses nombreux conseils et pour avoir souvent accepté de m'aider à pipetter lors des expériences de spectroscopie par fluorescence; Arnold Dogpwa pour m'avoir fait relativiser lorsqu'une expérience ne fonctionnait pas; tous les autres membres du laboratoire du Docteur Baron : Flore, Charline, Rodolfo, Bastien et Mahzad pour leur conseil. Je tiens aussi à remercier Durga Sivanesan qui m'a communiqué sa passion pour le T4SS et qui, à maintes reprises, a pris le temps pour me donner de nombreux et précieux conseils, est souvent restée tard au laboratoire pour m'aider à tenir le coup lors d'expériences longues mais surtout pour avoir été une amie. Je tiens aussi à remercier les membres du laboratoire du Docteur Sygusch pour leur

présence, leur écoute, leur patience, leur soutien perpétuel et enfin leur amitié : Amira Yazidi et Clotilde Low-Kam.

Dans un dernier temps, j'aimerais remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu, écouté et poussé (de près ou de loin) pendant toute la durée de ma maîtrise : Lucie Um, Antoinette Massing, Patricia Fernandez Sosa, Emmanuel Um, Ngo Um Suzanne Lydie, Marcel Ndje (merci de prendre toujours de mes nouvelles) et Fatou Tao (les mots ne suffisent pas pour exprimer mon éternelle reconnaissance). À tous : je vous remercie de tout coeur pour votre compréhension et votre soutien inconditionnels qui m'ont permis de franchir une autre étape cruciale dans ma vie. Chaque geste, chaque discussion, chaque message, chaque encouragement m'a aidé à progresser dans le courant de ma maîtrise. Ce mémoire est pour vous.

I. Introduction

Les protéines contrôlent l'ensemble des systèmes biologiques dans une cellule. Bien que beaucoup de protéines remplissent leurs fonctions de manière indépendante, la vaste majorité d'entre elles interagissent avec d'autres protéines pour mener à bien une activité biologique particulière. Il est donc peu surprenant que la caractérisation des interactions protéine-protéine soit devenue un des défis majeurs de la période post-génomique. En effet, ces études permettent d'avoir une meilleure connaissance des procédés variés tels que le contrôle métabolique, la transduction des signaux et la régulation des gènes. L'analyse fonctionnelle de l'interactome des protéines peut apporter de nouvelles réponses en termes de niveaux protéiques, d'interactions dynamiques et statiques qui contrôlent des événements critiques tels que l'assemblage des complexes multi-protéiques. Ici, le modèle sur lequel se focalise ce mémoire, est un complexe multi-protéique utilisé par beaucoup de bactéries à Gram-négatif pour permettre la translocation de macromolécules à travers la membrane cellulaire [1].

I.1. La sécrétion chez les bactéries à Gram-négatif

Depuis les années 80, la recherche sur la sécrétion des protéines par les bactéries a apporté une étendue d'informations sur les mécanismes qui contrôlent cette activité notamment sur le mécanisme de pathogenèse bactérienne [2, 3]. En tant que procaryotes, les bactéries sont des cellules relativement simples, caractérisées par une absence de noyau et d'organites comme les mitochondries et les chloroplastes. Une caractéristique importante des bactéries est la paroi cellulaire qui permet une protection contre le milieu extérieur. Cette paroi sert aussi d'interface d'échanges entre la bactérie et le milieu extérieur. En se basant sur la différence de la structure et de la composition chimique de cette paroi cellulaire, les bactéries peuvent être divisées en deux groupes : Gram-négatif (diderme) ou Gram-positif (monoderme). Cette taxonomie est déterminée par la coloration de Gram qui repose sur la composition chimique et la structure de la paroi cellulaire de la bactérie.

Les bactéries à Gram-négatif ont une structure bimembranaire qui s'organise en trois grandes parties : la membrane externe (ME), la membrane interne (MI) et le périplasma (Figure 1).

La ME est en contact direct avec le milieu extérieur et est principalement composée de phospholipides organisés en bicouche, de liposaccharides (LPSs) mais aussi de nombreuses protéines intrinsèques à la membrane. Étant donnée que la bactérie repose essentiellement sur le phénomène de diffusion pour assurer la nutrition et la dissémination de ses déchets, la membrane est sélectivement poreuse (elle permet la diffusion sélective d'éléments comme le fer en complexe avec des sidérophores). Ceci explique la présence de porines qui s'assemblent en pores au sein de la ME. Les LPSs sont des glycolipides toxiques, peu immunogènes. D'un point de vue physiopathologique, les LPSs sont des endotoxines qui ne sont libérées que lors de la lyse bactérienne. Les LPSs sont organisés en trois régions : l'Antigène O (rôle dans le sérogroupage), un oligosaccharide et enfin le Lipide A (partie toxique du LPS). Le LPS est une endotoxine qui est libérée lors de la lyse bactérienne. Il peut devenir pyrogénique lors de son relargage dans les tissus ou autres voies sanguines. Lors de cette lyse, le LPS se dissocie, permettant le relargage du lipide A qui joue un rôle dans le pouvoir pathogène de la bactérie.

Le périplasma est présent chez les bactéries à Gram-négatif et représente l'espace entre la ME et la MP [4]. Le périplasma est une matrice, de type hydrogel, essentiellement constituée d'eau et de protéines, qui correspondrait à environ 40% du volume total des bactéries à Gram-négatif et qui aurait un volume beaucoup moins important chez les bactéries à gram-positif. Il représente un espace de stockage d'enzymes et de nutriments. Le périplasma, étant situé au dessus de la MP et étant différencié de l'environnement extérieur par la ME, ne fait ni parti du protoplaste ni parti de l'extérieur. En effet, il fait parti intégrante de la paroi cellulaire de la bactérie à Gram-négatif. Ensemble, la paroi cellulaire et la MP constituent l'enveloppe de la bactérie à Gram-négatif [5]. Bien que la composition du périplasma fasse penser à celle du cytoplasme, il faut noter que la MP qui les sépare empêche tout échange libre entre les deux compartiments. Par ailleurs, les protéines présentes dans le périplasma sont très différentes de celles trouvées dans le cytoplasme. On retrouve ainsi dans le périplasma des protéines de liaison aux sucres, aux acides aminés, aux vitamines mais aussi aux enzymes de détoxication. Comme

on le voit chez *Pseudomonas aeruginosa*, le périplasme peut aussi agir en tant que «réservoir» pour des structures associées à la surface tels que les *pilis* ou encore les facteurs de virulence [6]. La plupart des protéines élaborées par les bactéries à Gram-négatif sont retenues dans le périplasme. En effet, beaucoup de ces protéines ont été guidées dans le périplasme, durant la traduction, par le biais de séquences signales spécifiques près du N-terminus.

Une partie des protéines synthétisées dans le cytoplasme, s'insèrent dans la MP et deviendront des protéines intégrales de la membrane interne (*IMP*) ou des lipoprotéines. Une autre partie passe la MP et peut rester dans le périplasme, s'insérer dans la ME ou être sécrétée dans le milieu extracellulaire. La dernière partie peut être directement sécrétée dans le milieu extracellulaire. On parle alors de sécrétion lorsqu'on désigne un transport d'une protéine du cytoplasme vers le milieu extracellulaire (Figure 1). Le terme de translocation est, quant à lui, employé quand une protéine est transportée d'un compartiment vers un autre compartiment cellulaire [7].

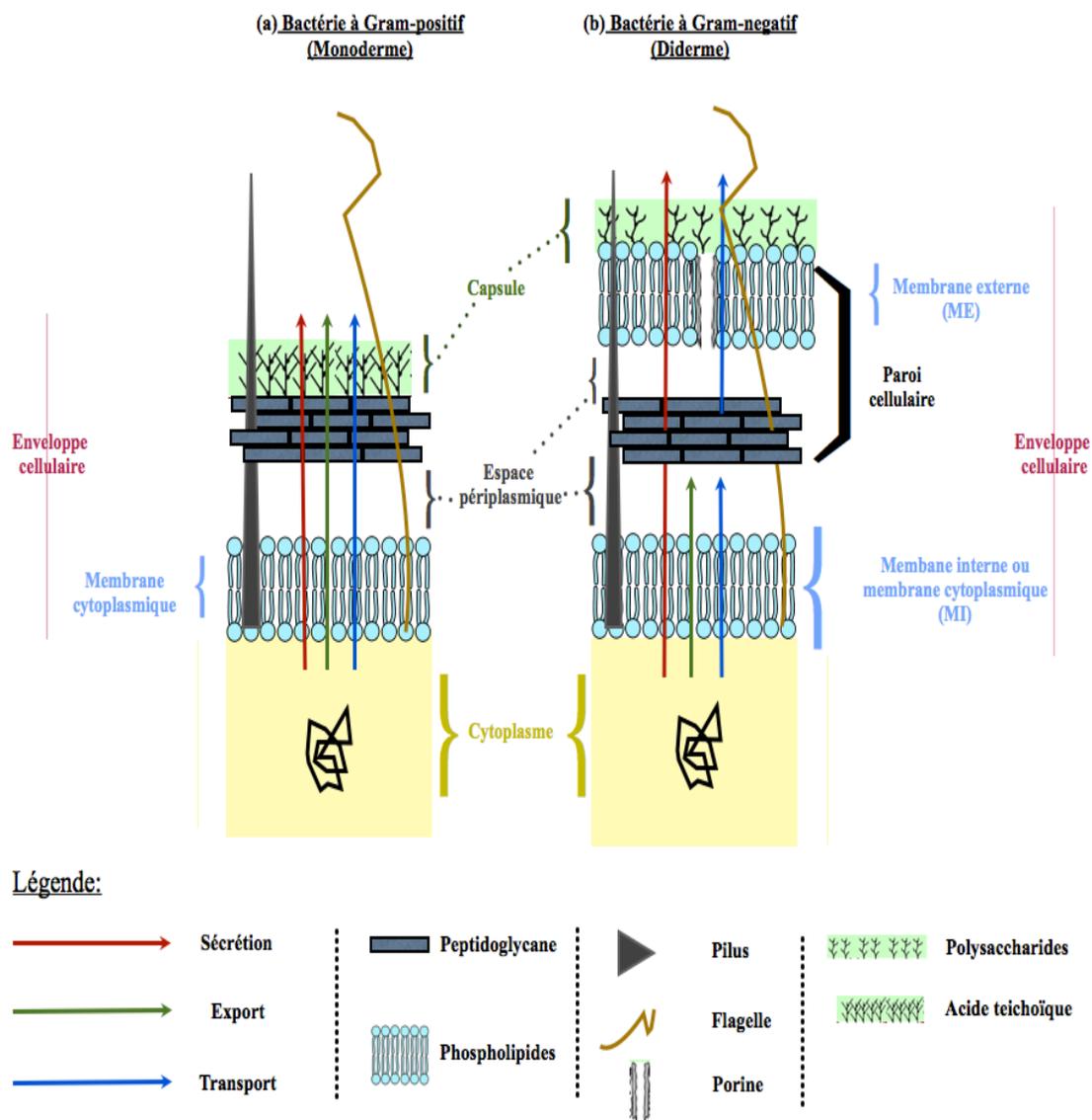


Figure 1. Différence dans l'organisation des enveloppes cellulaires chez les bactéries à Gram-positif ou monoderme (A) et à Gram-négatif ou diderme (b). Les différents mécanismes de sécrétion, d'export et de transport de substrats du cytoplasme vers le milieu externe y sont représentés respectivement en rouge, vert et bleu. Nous utilisons ici les abréviations suivantes : ME pour désigner la membrane externe et MI pour désigner la membrane interne des bactéries à Gram-négatif.

I.2. Les systèmes de sécrétion bactériens

En tant que facteurs de virulence, l'export et les systèmes de sécrétion sont essentiels à la survie de la bactérie [8, 9]. À ce jour, on recense 8 systèmes de sécrétion différents [10],[11]. Par souci de clarté, nous focaliserons notre présentation sur les six principaux systèmes de sécrétion bactérien. Les mécanismes d'adressage ou «systèmes d'exportation» de protéines sont présents dans tous les organismes vivants, y compris chez les bactéries à Gram-négatif ainsi que dans les organelles eucaryotes qui en sont dérivées (Table 1) [12],[13].

Protein secretory pathways (SP) in gram-negative bacteria and their descendants								
Type (Abbreviation)	Name	TC # ^a	Bacteria	Archaea	Eukarya	# Proteins/ System	Energy source	Reference
IMPs—Gram-negative bacterial inner membrane channel-forming translocases								
ABC (IISP)	ATP-binding cassette translocase	3.A.1	+	+	+	3-4	ATP	Holland et al., 2005
Sec (IISP)	General secretory translocase	3.A.5	+	+	+	~12	GTP or ATP + PMF	Cao and Saier, 2003
Fli/Path (IIISP)	Flagellum/virulence-related translocase	3.A.6	+	–	–	>10	ATP	Nguyen et al., 2000
Conj (IVSP)	Conjugation-related translocase	3.A.7	+	–	–	>10	ATP	Cao and Saier, 2001
Tat (IIISP)	Twin-arginine targeting translocase	2.A.64	+	+	+	2–4	PMF	Yen et al., 2002b
Oxa1 (YidC)	Cytochrome oxidase biogenesis family	2.A.9	+	+	+	1	None or PMF	Yen et al., 2001 Yi and Dalbey, 2005
MscL	Large conductance mechanosensitive channel family	1.A.22	+	+	+	1	None	Pivetti et al., 2003
Holins	Holin functional superfamily	1.E.1-21	+	–	–	1	None	Young, 2002
Eukaryotic organelles								
MPT	Mitochondrial protein translocase	3.A.8	–	–	+	>20	ATP	Lister et al., 2005
CEPT	Chloroplast envelope protein translocase	3.A.9	(+)	–	+	≥3	GTP	Steiner et al., 2005 Robinson et al., 2000
Bcl-2	Eukaryotic Bcl-2 family (programmed cell death)	1.A.21	–	–	+	1?	None	Crompton et al., 2002
Gram-negative bacterial outer membrane channel-forming translocases								
MTB (IISP)	Main terminal branch of the general secretory translocase	3.A.15	+ ^b	–	–	~14	ATP; PMF	Peabody et al., 2003
FUP	Fimbrial usher protein	1.B.11	+ ^b	–	–	1	None	Yen et al., 2002
AT-1	Autotransporter-1	1.B.12	+ ^b	–	–	1	None	Loveless and Saier, 1997
AT-2	Autotransporter-2	1.B.40	+ ^b	–	–	1	None	Kim et al., 2006
OMF (IISP)	Outer-membrane factor	1.B.17	+ ^b	–	+[?]	1	None	Yen et al., 2002
TPS	Two partner secretion	1.B.20	+	–	+	1	None	Yen et al., 2002
Secretin (IISP and IIISP)	Secretin	1.B.22	+ ^b	–	–	1	None	Yen et al., 2002
OmpLP	Outer membrane insertion porin	1.B.33	+	–	+	≥4	None?	Wu et al., 2005

Table 1. Les voies de sécrétion dans les bactéries à Gram-négatif [12],[14, 15].

Contrairement aux autres organismes, les bactéries à Gram-négatif contiennent de nombreux systèmes qui contrôlent l'exportation de protéines. Parmi ces derniers, on compte au moins 8 systèmes de sécrétion différents qui facilitent le transport à travers la membrane interne cytoplasmique [12].

Les protéines synthétisées dans le cytoplasme et destinées aux compartiments situés à l'extérieur du cytoplasme sont confrontées au passage de la MI. Pour ce faire, il existe différentes voies d'export permettant la translocation de ces protéines. Les systèmes d'export *Sec*, *Tat* (translocase *twin-arginine*), *FEA* (*flagella export apparatus*), *FPE* (*fimbrilin-protein exporter*), *holin* (*hole forming*) sont à la fois utilisés par les bactéries à Gram-négatif mais aussi par les bactéries à Gram-positif.

I.2.1 Les systèmes de sécrétion Sec- et Tat- dépendants

Les systèmes de sécrétion sont des nanomachineries utilisés par les membranes permettant la sécrétion de protéines et parfois d'ADN à l'extérieur de la bactérie. Ces systèmes peuvent être répartis en deux catégories selon le nombre d'étapes nécessaires pour l'acheminement de la protéine sécrétée. En effet, la sécrétion peut se faire en une seule étape (du cytoplasme au milieu extracellulaire) ou bien en deux étapes (ce dernier incluant une étape périplasmique). Les systèmes de sécrétion ayant cette dernière caractéristique peuvent être dépendants des voies de sécrétion *Sec* ou *Tat* (translocase *twin-arginine*) pour assurer le passage au travers de la MI. On retrouve dans cette catégorie : (i) les systèmes de sécrétion de type II (T2SSs); (ii) les systèmes de sécrétion de type IV (T4SSs); (iii) les systèmes de sécrétion de type V (T5SSs) et (iv) les systèmes de sécrétion de type VI (T6SSs).

(i) Le T2SS est le plus souvent présent dans les protéobactéries de type α et γ , et il permet une sécrétion des protéines dans un processus en deux étapes dans le milieu extracellulaire. Le T2SS est encodé par un ensemble de 12 à 16 gènes organisés en un opéron. Le T2SS transporte aussi bien les facteurs de virulence que les enzymes qui permettent la survie de la bactérie dans n'importe quel environnement [16, 17]. Celui-ci utilise la voie d'export (*Sec*) ou la translocase *twin-arginine* (*Tat*) afin d'exporter les protéines au travers de la membrane

interne [18, 19]. De plus, les protéines destinées au milieu externe traversent la membrane externe via une branche terminale principale (*MTB* ou *main terminal branch*) qui constitue un système permettant l'exportation de protéines spécifiques au travers de cette dernière [20]. Les constituants du T2SS interagissent les uns avec les autres afin de former un complexe multi-protéique appelé sécrétion, qui traverse le MP et le ME. Les protéines sécrétées par le T2SS sont caractérisées par la présence d'un peptide signal en N-terminal.

(ii) Étant donné que le sujet de ce mémoire porte sur le T4SS, nous nous attarderons dans les paragraphes I.2.4. et I.2.5, sur le rôle du T4SS en se focalisant sur les aspects structuraux et les mécanismes moléculaires qu'il régule. Les T4SSs sont principalement présents chez les bactéries à Gram-négatif. Le système de transfert de l'ADN-T, chez *A. tumefaciens*, a été le premier T4SS caractérisé et reconnu comme étant responsable du transfert du matériel infectieux vers les cellules eucaryotiques hôtes. Ainsi, il a servi de référence, en termes de nomenclature, pour l'ensemble des T4SSs étudiés par la suite. Chez les bactéries à Gram-négatif, les T4SSs sont des machineries de transport multi-protéiques, qui contrôlent le transfert entre cellules de substrats spécifiques (ADN et/ou complexe ADN/protéine et/ou protéine seule) d'une bactérie dite donneuse à une cellule hôte cible procaryote ou eucaryote. Son rôle dans la pathogénèse d'un grand nombre de bactéries chez l'humain, l'animal et les plantes, sa contribution majeure dans l'échange génétique (au travers de la conjugaison bactérienne) ainsi que sa prise en charge de l'ADN et son relargage dans la cellule hôte, ont suscité un intérêt important de la part de la communauté scientifique durant les 10 dernières années [21-24]. La définition du T4SS a été établie après la découverte de la similarité de séquence existant entre les systèmes de sécrétion de type VirB chez *A. tumefaciens* et *Bordetella pertussis* [25]. Les éléments constitutifs du T4SS ont un ancêtre en commun avec les éléments constitutifs des systèmes de conjugaison bactérien [26]. Cette similarité s'étend à un ensemble de 9 à 11 composants conservés appartenant à la formation d'un complexe de fusion (*MPF*). Ce complexe correspondrait à une structure membranaire en forme de canal surmonté par un pilus exposé à la surface [27]. La protéine de couplage au T4SS ou encore appelée protéine *VirD4-like* est aussi un autre élément conservé chez les T4SSs.

En se basant sur les fonctions, il est possible de regrouper les T4SSs en trois familles : (a) les systèmes de conjugaison permettant le transfert d'ADN vers une cellule réceptrice cible en établissant un contact direct. Ici, le système le mieux caractérisé est le système de sécrétion VirB chez *A. tumefaciens*. Cette bactérie phytopathogène induit la croissance tumorale des tissus végétaux infectés et est responsable d'une maladie appelée galle du collet (*crown-gall disease*) [28]. Cette prolifération anormale des tissus de la plante est due au transfert d'un fragment du plasmide bactérien Ti : ADN-T. Ce plasmide est responsable de la virulence des bactéries. L'ADN-T oncogène, porté par le plasmide Ti, est alors transféré de la bactérie vers la plante et ensuite intégré au génome végétal de la cellule hôte [22, 29]. La deuxième famille de T4SS connue : (b) les systèmes de transport de protéines qui exportent les molécules effectrices du pathogène vers les cellules eucaryotes durant l'infection. Dans ce cas, les T4SSs injectent leur substrat directement dans le cytosol de la cellule eucaryote comme on l'observe souvent chez les T3SSs. À titre d'exemple, on retrouve dans cette catégorie le système de sécrétion de type Cag chez *H. pylori* ou le système Dot/Icm chez *Legionella pneumophila* [30, 31]. La troisième famille de T4SS qu'on peut recenser : (c) les systèmes de sécrétion de «compétence» qui facilitent l'échange d'ADN avec le milieu extracellulaire. On y retrouve le système ComB [32, 33] mais aussi la région *Tra* que l'on retrouve aussi chez *Helicobacter pylori*. Cette région permettrait le transfert conjugatif d'ADN chromosomal entre les cellules chez *H. pylori* [34]. Malgré une disparité apparente existant entre les fonctions des différentes familles de T4SS, il existe cependant une similarité au niveau des protéines. Il est à noter que les T4SSs ne sont pas seulement importants pour le processus de sécrétion d'ADN mais aussi pour l'import.

- (iii) Le T5SS est considéré comme l'un des systèmes les moins complexes parmi les systèmes de sécrétion [35]. Le T5SS, qui est aussi connu en tant que système autotransporteur où le substrat et le pore de sécrétion sont associés afin de former un polypeptide unique. Le T5SS secrète principalement des facteurs de virulence mais il participe aussi dans l'adhésion cellulaire et dans la formation de biofilm [36]. Chaque protéine sécrétée par le T5SS contient une séquence signal en N-terminal qui cible la protéine vers la machinerie *Sec* afin d'assurer son exportation au travers de la MP. Au sein de la famille des T5SSs, on retrouve le système

des autotransporteurs (Va ou AT-1), les systèmes à deux partenaires (Vb) et enfin un système trimérique dit *chaperonne-usher* (Vc ou AT-2) [3, 7, 37]. Comme d'autres systèmes de transport au travers de la ME, le processus de sécrétion ne requiert pas un gradient d'ATP ou de proton [38]. En effet, l'énergie nécessaire au transport provient du repliement du domaine du substrat à la sortie du pore [39].

- (iv) Le T6SS est un système qui a été récemment découvert [40] et qui a été proposé après la découverte du système Vas chez *Vibrio cholerae* [41]. Il est constitué d'un ensemble de 13 protéines essentielles à sa fonction et peut effectuer le transfert de protéines globulaires dont la taille peut aller jusqu'à 50 kDa [42]. Il est responsable de la sécrétion des protéines *Hcp* (*Hemolysin-Coregulated Protein*) et est encodé par les gènes *vas*. Un de ces gènes, *vasK*, possède une forte similarité avec le gène *icmF* (*intracellular multiplication F-like component*) qui est un des composants du T4SS chez *Legionella pneumophila* [43]. Des homologues du gène *icmF* sont retrouvés chez de nombreuses bactéries et la région encadrant les homologues d'*icmF* a été désignée par le sigle *IAHP* (*IcmF Associated Homologous Protein*). De par son rôle dans le contrôle des populations bactériennes, l'étude des T6SSs a suscité beaucoup d'intérêt au sein de la communauté scientifique. Le T6SS est un complexe protéique ancré dans l'enveloppe bactérienne qui agit comme une «micro-seringue» pour injecter des toxines dans les cellules cibles [44]. La machinerie des T6SSs est constituée de deux sous-complexes : un complexe membranaire (incluant des protéines membranaires similaires aux protéines appartenant au T4SS [41, 45]) ainsi que d'un complexe tubulaire cytoplasmique. De nombreuses études montrent que les constituants de ce dernier, sont structurellement et fonctionnellement similaires aux queues contractiles des bactériophages [46].

I.2.2 Les systèmes de sécrétions Sec- indépendants

- (i) Le système de sécrétion de type I (T1SS) est constitué de 3 protéines : un dimère de protéine localisé au niveau de la membrane interne (*ATP binding cassette transporter* ou *ABC*), une protéine de fusion membranaire oligomérique (*MFP*) qui s'associe avec une protéine intégrale de la membrane externe qui forme des pores (*OMFs* ou *Outer Membrane Factors*) [47]. La ME fonctionne comme une barrière sélective qui protège les bactéries contre les antibiotiques et le milieu extérieur. À la différence de la MI, la ME n'est pas stimulée par un gradient de protons et l'ATP n'est pas disponible dans le périplasme. En absence de sources d'énergie aisément disponibles, les substances nutritives passent la ME via une famille d'*OMFs* appelés porines. Les porines forment des canaux remplis d'eau qui permettent alors le passage de petites molécules hydrophiles. Les T1SSs permettent la sécrétion de protéines de tailles et de fonctions différentes. Ce système permet le transport de matériel au travers des deux membranes et de l'espace périplasmique des bactéries à Gram-négatif en une seule étape couplée énergiquement.
- (ii) Le deuxième type de système de sécrétion de ce groupe, le T3SS, est utilisé par des bactéries à Gram-négatif telles que *P. aeruginosa* et *Erwinia spp.* Ce système hautement spécialisé appelé «type III» ou «*contact-dependant*» permet de réaliser une translocation des protéines bactériennes directement dans la cellule de l'organisme hôte. Ces protéines, souvent appelées des effecteurs, détournent les mécanismes biochimiques de la cellule eucaryote afin que ces derniers soient bénéfiques au pathogène. Alors que la structure du T3SS apparaît hautement conservée chez les bactéries, les effecteurs sont des composés hautement variables chez ces pathogènes [48, 49]. Une fois transférés, les effecteurs peuvent être utilisés de plusieurs manières différentes par la bactérie afin d'assurer un effet spécifique et unique sur la cellule hôte.

Le T3SS est l'un des systèmes de sécrétion les plus complexes connus à ce jour. En effet, il est constitué de plus de 20 protéines et il est similaire à l'assemblage flagellaire. Bien que les éléments de base de cette structure aient déjà été identifiés, les mécanismes de sécrétion des effecteurs sont toujours inconnus. Au coeur de ce système, on retrouve une entité

supermoléculaire, de la taille d'une organelle, que l'on appelle : l'injectosome ou la «seringue moléculaire» ou encore le complexe en aiguille. Dans les années 90, *Salmonella typhimurium* est la première bactérie à Gram-négatif à avoir été identifiée comme étant associée au T3SS [50]. Des analyses par microscopie électronique du T3SS chez *Shigella*, *Salmonella* et *Escherichia coli* ont permis de révéler une architecture complexe ancrée dans la MI et la ME de la bactérie [51-53]. Ces structures possèdent de nombreuses ressemblances avec le corps basal des flagelles, mais elles apparaissent aussi dans les souches où le flagelle a été inhibé [54]. Bien que seules les structures du T3SS chez *Shigella* et *Salmonella* aient été élucidées à ce jour, les protéines qui constituent le complexe sont hautement conservées et constituent des facteurs de virulence cruciaux [55]. Au niveau de la structure des T3SSs, on note la présence de trois régions majeures : l'aiguille extracellulaire, les anneaux de la ME et enfin la base qui traverse à la fois la MI et le périplasme. L'archétype du T3SS est celui identifié chez *Yersina spp* et qui permet la sécrétion des protéines *Yop* [56].

La comparaison des différents systèmes de sécrétion suggère que chacun d'entre eux a évolué de manière indépendante et ce, malgré l'existence d'un nombre spécifique de similarités mécanistiques et évolutives.

I.2.3 Le système VirB chez *Brucella*

Brucella est un pathogène zoonotique qui cause des avortements infectieux chez les animaux et la «fièvre méditerranéenne» (aussi connue sous le nom de fièvre de Malte) chez les humains [57, 58]. Cette maladie infectieuse souvent appelée brucellose est causée par le pathogène *Brucella* qui provoque un parasitisme intracellulaire chez les macrophages [59]. Après infection par le biais de blessures ou de muqueuses, *Brucella* infecte les phagocytes professionnels. Les infections subséquentes se produisent dans un premier temps chez les phagocytes amateurs dans les tissus des organes reproductifs, le placenta ou encore le fœtus. Ceci explique pourquoi, la manifestation de la brucellose se produit chez les animaux en gestation : d'où le nom *Brucella abortus*. La pathogenèse de *Brucella* inclut l'invasion mais

aussi la réplication intracellulaire [60]. La survie intracellulaire et la réplication de cette bactérie sont régulées par le système VirB-T4SS [61] qui initie la maturation d'une vacuole contenant le pathogène [62]. Tout comme chez *Legionella pneumophila*, le T4SS chez *Brucella* altère la voie endocytaire du macrophage infecté et bloque la fusion du phagosome et du lysozome. La bactérie peut alors proliférer dans le phagosome, ce qui forme un compartiment lié au reticulum endoplasmique [63].

I.2.4 Le T4SS

La machinerie des T4SSs est un complexe multi-protéique qui traverse la MI et la ME de la bactérie à Gram-négatif dite «donneuse» [27] (Figure 2). Un ensemble de 12 ou 13 protéines sont impliquées dans un réseau d'interactions qui détermine l'architecture globale de l'appareil de sécrétion. De nombreuses analyses génétiques ont permis de déterminer la composition du T4SS. En effet, les études génétiques menées sur les plasmides pKM101, F, R388, R27 ou encore RP4 ont permis de définir les conditions génétiques nécessaires pour avoir des systèmes de sécrétion d'ADN fonctionnels mais elles ont aussi permis de fournir les bases des études structurales et biochimiques subséquentes [26, 64-66]. Les T4SSs, spécialisés dans le transfert de protéines, sont caractérisés par leur fonctionnalité lors du transfert protéique et/ou par la production de structures spécifiques en surface du T4SS. Le premier système de sécrétion de protéines à avoir été caractérisé génétiquement est le système VirB-VirD du plasmide Ti chez *A. tumefaciens* [67-69]. Le nombre grandissant de séquences protéiques disponibles chez le T4SS ont permis de caractériser de nombreux T4SSs dont les substrats étaient inconnus.

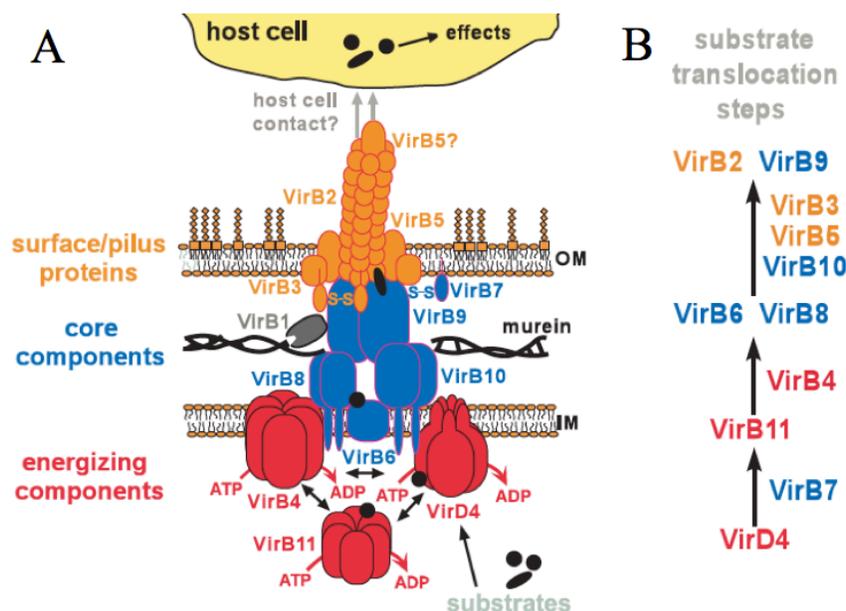


Figure 2. Structure du canal de translocation du T4SS au travers de l'enveloppe cellulaire [70].

(A) Modèle du complexe T4SS qui contient 3 catégories fonctionnelles : une catégorie énergétique représentée en rouge, un complexe central ou *core complex* représenté en bleu et enfin des protéines associées au pilus, qui sont représentées en orange. Le contact avec la cellule hôte entraîne une translocation du substrat, suivi par l'action des effecteurs transloqués dans la cellule hôte. Le pilus initierait un contact direct avec la cellule hôte mais la composition exacte de la structure de contact est encore inconnue. (B) Des essais d'immunoprécipitation de l'ADN-T ont permis de révéler une séquence du T4SS à partir des catégories fonctionnelles qui se lient directement au complexe-T chez *A. tumefaciens* et les autres composants qui sont nécessaires à la progression du substrat le long de la voie de translocation [70].

I.2.5 Le T4SS : une structure élucidée

Chez *A. tumefaciens*, les protéines de VirB1 à VirB11 ainsi que VirB4 constituent une machinerie de sécrétion de protéines et d'ADN fonctionnels. Parmi les T4SSs, les éléments constitutifs sont conservés et on les appelle : les protéines *VirB-like*. Les nombreuses études structurales et biochimiques effectuées sur le T4SS [8, 71-74] ainsi que la résolution à 2,6 Å de la structure cristallographique du canal transmembranaire de la ME [75] ont permis de commencer à comprendre l'échange dynamique existant entre les sous-unités du T4SS lors du transfert de l'ADN-T du cytoplasme vers la membrane externe [21]. Cependant, notre compréhension de la séquence d'interactions qui précède l'assemblage est toujours limitée. La structure macromoléculaire du T4SS peut-être divisée en trois groupes de protéines VirB [1, 29] (Figure 2): (i) le pilus se localisant au niveau de la surface de la bactérie est composé des protéines VirB2 (une sous-unité majeure du pilus-T), VirB5 et VirB7 (toutes deux constituent des éléments mineurs du pilus-T) [76-78]; (ii) le canal transmembranaire est, quant à lui, composé des protéines VirB1, VirB3, VirB6, VirB8 à VirB10 (plus connues sous la dénomination de *core complex*) [79, 80]; (iii) VirB4, VirB11 et VirD4 constituent les moteurs de la machinerie du T4SS. En effet, ces trois NTPases permettent l'apport d'énergie nécessaire à la sécrétion des substrats en hydrolysant les nucléotides lors du processus de translocation [81, 82]. Elles sont localisées du côté cytoplasmique de la MI (Figure 2).

i) Le pilus

Les protéines formant le pilus : VirB2 et VirB5, fonctionneraient en tant qu'adhésines [83]. Ces dernières contrôleraient le ciblage de la cellule-hôte au travers d'interactions entre ces protéines et les composants des matrices extracellulaires des cellules hôtes [83, 84].

VirB2 est le composant majeur du pilus-T de virulence chez *A. tumefaciens* [85]. VirB2 contient une séquence peptide signal qui est clivée résultant en un produit de 7.2 kDa. Ce produit, suite à un processus de cyclisation, devient l'unité de base du pilus T : la piline-T [86].

VirB5 est le composant mineur du pilus-T et il est localisée au bout du pilus [83]. Cette protéine contient une séquence signale en N-terminal qui contrôle l'export vers l'espace

périplasmique. La structure cristallographique de la protéine TraC, un homologue de VirB5 dans le plasmide pKM101, a été résolue [87]. L'analyse des variants et la similarité structurale existant entre VirB5 et le domaine d'adhésion focal (*FAT*), nous suggère que VirB5 pourrait jouer un rôle en tant qu'adhésine [83]. L'attachement des bactéries grâce aux adhésines est un processus clé pour la plupart des maladies infectieuses et il se produit lors des premières étapes de l'infection [88]. De plus, l'absence d'homologue de VirB5 dans le système Ptl chez *B. pertussis* apporte une évidence supplémentaire sur le rôle de VirB5 en tant qu'adhésine. Le substrat transféré (la toxine pertussis) est sécrété dans le milieu extracellulaire et est assimilé par les récepteurs de la cellule hôte. Ainsi, on peut en conclure que la présence de VirB5 n'est pas indispensable au fonctionnement du T4SS, mais elle est présente dans la grande majorité des cas.

ii) Le canal transmembranaire

VirB1 appartient à la superfamille des glycosylases *lysozyme-like* que l'on retrouve dans les T1SSs, T3SSs et T4SSs mais aussi dans les bactériophages [89, 90]. Les membres de cette famille sont capables de cliver la paroi de peptidoglycane des bactéries à Gram-négatif pour permettre la mise en place du T4SS, mais ils ne sont pas essentiels à la virulence [91, 92]. VirB1 interagit avec VirB8, VirB9 et VirB11 [92], ce qui fait de cette protéine une cible intéressante dans le cadre de l'étude du mécanisme d'assemblage du T4SS.

VirB3 est une protéine conservée et un élément essentiel pour le T4SS. Cependant, peu d'informations existent sur cette protéine. Elle est localisée à la fois dans la MI et la ME mais une grande partie de la protéine se situe dans la MI [93]. L'expression stable de cette protéine serait dépendante de la présence de VirB4 [94] et de VirB6 [95]. Ceci suggère ainsi une interaction entre VirB3 et les protéines VirB4 et VirB6.

VirB6 est une protéine appartenant à la MI qui contient cinq segments transmembranaires [96]. Chez *A. tumefaciens*, VirB6 est requise pour l'expression stable des protéines VirB3 et VirB5, mais elle favorise aussi la formation des dimères de VirB7 [95, 96]. Lors de sa solubilisation en présence de détergent, VirB6 forme des complexes, hauts en poids moléculaires, qui co-fractionnent avec VirB7 [97]. D'autres arguments viennent appuyer l'existence d'une

interaction entre VirB6 et VirB7. En effet, VirB6 est requise pour la formation de l'hétérodimère VirB7-VirB9 car elle co-immunoprécipite en présence de ces deux protéines [98]. Par ailleurs, VirB6 pourrait contrôler l'élongation et la rétraction du pilus mais aussi moduler la fonction du canal de sécrétion afin (a) de sécréter VirB2 et VirB5 (permettant ainsi l'élongation du pilus) ou (b) de sécréter des substrats comme VirE2 qui sont par la suite transloqués dans la cellule hôte.

VirB7 est une petite lipoprotéine (4,5 kDa) localisée au niveau de la partie périplasmique de la ME [99]. VirB7 est à la fois une protéine monomérique et dimérique grâce à la formation de ponts disulfures [78]. La portion cellulaire de VirB7 forme aussi des hétérodimères avec VirB9 [100] qui peut être isolée en tant que complexe protéique contenant des ponts disulfures [101]. VirB7 stabilise VirB4, VirB9, VirB10 et VirB11 durant l'assemblage du T4SS [100]. La portion exocellulaire de VirB7 contribuerait au maintien de l'intégrité du pilus-T [78].

VirB8, chez *A. tumefaciens* est localisée dans la MI [102]. La structure en homodimère de VirB8 a été résolue aussi bien chez *A. tumefaciens* que chez *B. suis*. Chaque monomère de VirB8 est constitué de 4 feuillets β associés à 5 hélices α [103] (Figure 3). La structure de VirB8 est similaire au facteur de transport nucléaire 2 (*NTF2*) qui est impliqué dans le transport en provenance et en direction du noyau [104]. Il s'agit d'une protéine constituée d'un court fragment cytoplasmique en N-terminal, suivi d'une séquence transmembranaire et d'une large portion périplasmique en C-terminal [105]. VirB8 forme un complexe VirB8-VirB10 qui a été identifié par essai à deux hybrides dans la levure [106] et par extraction des membranes en présence de détergents [97]. VirB8 semble être nécessaire pour l'assemblage de VirB9 et de VirB10 [107]. De par son rôle central dans l'assemblage du T4SS, VirB8 est désormais considérée comme une «protéine-échafaud» qui interagît avec un grand nombre de protéines afin de polariser l'assemblage du système de sécrétion [108]. Ainsi, VirB8 interagit avec VirB1, VirB4, VirB5, VirB6, VirB8, VirB9, VirB10 et VirB11 [98, 106, 109-112]. Bien que cette protéine soit essentielle à l'assemblage du T4SS, elle requiert la présence de VirB4 afin d'être stable *in vivo* [109].

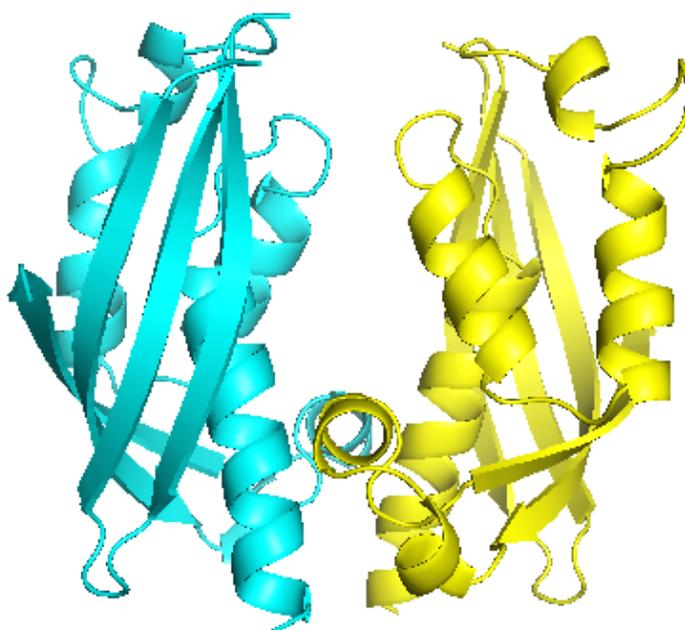


Figure 3. Structure de VirB8 de *B. suis* obtenue par cristallographie à rayons X. Code PDB : 2BHM [103].

VirB9 est localisée en présence de VirB10 à la fois dans la MI et la ME avec une portion hydrophile au niveau du périplasme. La localisation de VirB9 et de VirB10 est dépendante de la présence de VirB8, qui serait responsable de leur recrutement sur un site spécifique d'assemblage du T4SS [107]. VirB9 forme des complexes avec VirB7 par le biais de ponts disulfures. Ces complexes auraient un effet stabilisateur sur VirB10 [79]. La structure d'un complexe de 1 MDa entre les protéines VirB7, VirB9 et VirB10 du plasmide pKM101, a été résolu par microscopie cryo-électronique [8] (Figure 4). Ce *core complex* contient 14 copies de chaque protéine et est composé de deux couches : I (interne) et O (externe). À la suite de cette découverte, une structure cristallographique du *core complex* dans le plasmide pKM101 a été aussi résolue [75]. Ce

complexe de 590 kDa contient 14 copies du domaine C-terminal de VirB10, du domaine C-terminal de VirB9 et de VirB7 dans sa totalité (Figure 5). Contrairement aux prédictions de microscopie cryo-électronique, on constate dans le cristal, que VirB10 forme un anneau qui est entouré par les protéines VirB9 et VirB7 (Figure 4). Fait intéressant, ce serait VirB10 et non pas VirB9 qui forme le canal transmembranaire. En effet, on constate que VirB10 s'insère dans la ME et aussi dans la MI. Le cristal nous montre aussi que la protéine VirB9 est plus ordonnée en présence de VirB10.

VirB10 fait partie du complexe VirB8-VirB9-VirB10 qui est aussi lié à VirB7 à travers de l'interaction VirB7-VirB9. Ce complexe traverse à la fois la MI et la ME. En effet, on constate que VirB8 est localisée dans la MI, VirB7 est localisée dans la ME et le complexe VirB9-VirB10 est localisé dans la ME et MI. En plus du complexe VirB7-VirB9, les trois protéines: VirB1-2 et 3 sont requises pour la localisation de VirB10 dans la ME [80]. Les protéines homologues à VirB10 interagissent aussi avec les protéines *T4CP* (VirD4 chez *A. tumefaciens*), ce qui permet le recrutement des substrats du T4SS à la face cytoplasmique du canal de sécrétion.

iii) Les NTPases

Le T4SS utilise plusieurs ATPases afin d'assurer l'assemblage et/ou le transfert du substrat. Les protéines VirB4, VirD4 et VirB11 contiennent un motif de peptide de liaison au nucléotide (*Walker A Box*) que l'on retrouve typiquement chez les hydrolases ou les synthetases de nucléotides [113].

Les protéines *VirB4-like* sont souvent appelées des «*traffic ATPases*» et elles sont conservées chez la plupart des T4SSs. VirB4 est présente dans tous les T4SSs et est caractérisée par une taille élevée (94 kDa) et un domaine de liaison aux nucléotides. Une ou plusieurs de ces protéines agiraient en tant que moteurs pour le T4SS en convertissant l'énergie chimique libérée par l'hydrolyse du nucléotide en énergie cinétique nécessaire au processus de sécrétion. Les protéines *VirB4-like* représentent l'une des familles les plus importantes au sein des protéines VirB et elles sont localisées sur la face cytoplasmique de la MI [114].

VirB11 appartient à la famille des NTPases présentes à la fois chez les T2SSs et les T4SSs [115-117]. Chez les T4SSs, VirB11 fait partie des trois NTPases potentielles qui permettraient de fournir de l'énergie au processus de sécrétion et/ou à l'assemblage de la machine de sécrétion. La structure cristallographique d'un homologue de VirB11 (HP0525) [118] et l'élucidation de la structure de VirB11 chez *B. suis* [119] ont révélé l'existence d'une structure hexamérique qui est structurellement semblable aux hélicases et aux ATPases associées aux autres types de sécrétion telles que le T2SS et le T3SS. Par ailleurs, VirB11 est essentielle au canal de sécrétion mais aussi pour la formation du pilus [120]. VirB11 hydrolyse l'ATP et son activité est améliorée en présence de lipides ce qui est cohérent avec sa localisation et son association avec la MI bactérienne [121, 122]. Par ailleurs, la protéine effectue des changements conformationnels en présence de lipides [121] et des changements de son site de liaison au nucléotide ont des effets sur la localisation membranaire [123].

VirD4 est une protéine de couplage au T4SS (*T4CP*), qui en partenariat avec VirB4 et VirB11, fournit de l'énergie à la machinerie de sécrétion. Bien que les *T4CPs* soient présentes dans chaque système de conjugaison et dans la plupart des T4SSs (où elles sont essentielles à la sécrétion), elles ne sont pas présentes dans le T4SS chez *Brucella spp* et *B. pertussis*. Les *T4CPs* ont deux motifs en commun qui ressemblent aux motifs Walker A et B des NTPases et des transporteurs ABC [124-126]. Ces motifs sont essentiels pour le transfert des substrats [127, 128], ce qui appuie l'hypothèse selon laquelle l'activité des NTPases serait cruciale pour le T4SS.

I.3. Biogénèse du T4SS

Les protéines substrats transférées par le T4SS sont souvent appelées des effecteurs car elles manipulent les voies cellulaires de l'hôte et les réponses qui y sont liées. De nombreuses études d'interaction et de structures ont permis de construire un modèle fonctionnel pour

l'assemblage du T4SS. Des études d'immunofluorescence ont permis de localiser l'assemblage du T4SS au niveau des pôles cellulaires en présence de la plupart des protéines VirB [107, 108].

Les protéines VirB7, VirB9 et VirB10 s'associent de manière spontanée afin de former un complexe de translocation tétradécamerique à travers deux couches membranaires (Figures 4 et 5). On remarque aussi que VirB8 ne s'associe pas avec ce complexe, et ce, même si ces protéines sont co-exprimées [75]. Cela suggère un état conformationnel différent lors de l'assemblage du complexe de translocation. Par ailleurs, la chronologie de recrutement des ATPases et des protéines VirB de la MI est encore méconnue. Les interactions de VirB10 avec la protéine VirB4 joueraient le rôle de «détecteurs d'énergie». Ces détecteurs répondraient aux ATPases présentes dans le cytoplasme [21]. Des études en microscopie électronique ont montré que VirB4 s'associe avec le complexe transmembranaire en absence de VirB8 et de VirB6 [129]. Cependant, dans ces études, la stoechiométrie d'association serait de trois protéines VirB4 pour un complexe tétradimérique. VirB8 et VirB6 interagiraient avec le *core complex* VirB7–VirB9–VirB10 afin de s'intégrer dans la couche-I pour former un pore de la membrane interne.

VirB3 est stabilisée en présence de trois protéines VirB : VirB4, VirB7 et VirB8, qui formeraient un complexe [93, 130]. Le réseau d'interaction VirB4–VirB8–VirB2–VirB5 a déjà été décrit précédemment [109]. VirB3 jouerait un rôle dans les premières étapes de la biogenèse.

Les protéines appartenant au pilus (VirB2 et VirB5) sont recrutées au niveau du canal de translocation afin de compléter l'assemblage nécessaire à la sécrétion du substrat et à la biogenèse du pilus. Cependant, l'hypothèse selon laquelle le passage du substrat se fait à travers le lumen du pili est encore un sujet de débat. Il a été démontré, par le biais d'un essai TrIP (*Transfer DNA ImmunoPrecipitation*), qu'il existe des contacts entre le substrat et la protéine du pilus VirB2. Les protéines du pilus sont importantes pour la sécrétion du substrat; cependant, le rôle du pilus dans la fonction du T4SS est encore peu clair. Le chevauchement entre les processus régissant la formation du pilus du T4SS et la sécrétion du substrat complique l'analyse [131]. Nous pouvons, cependant, émettre l'hypothèse que le pilus émergent aurait un rôle dans la sécrétion du substrat mais le mécanisme par lequel ce processus se produirait est toujours méconnu.

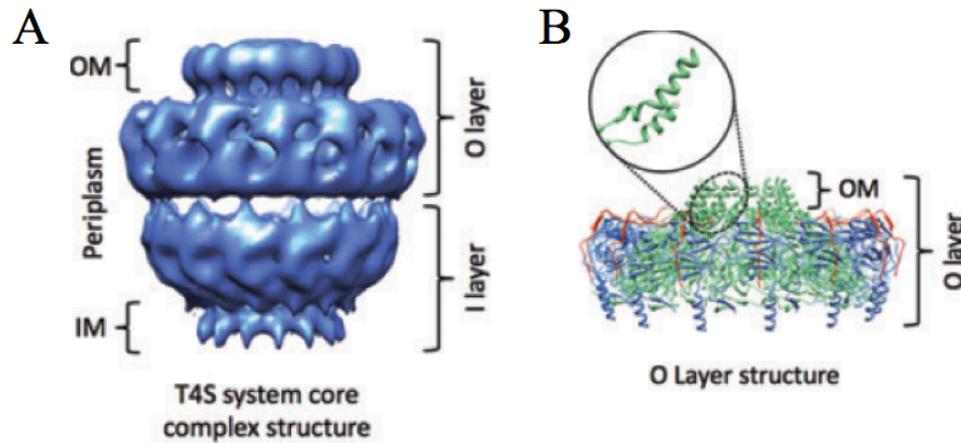


Figure 4. Structure du *core complex* T4SS obtenue par microscopie cryo-électronique des protéines du plasmide de conjugaison pKM101 [71]. (A) Cette structure est constituée des protéines TraN, TraO et TraF complètes, qui correspondent aux protéines homologues VirB7, VirB9 and VirB10 chez *A. tumefaciens*, respectivement. **(B)** Structure cristallographique du complexe de la ME qui comprend la couche-O [132]. On y retrouve les deux hélices caractéristiques de TraF qui traversent la ME. TraN, TraO et TraF sont représentées respectivement en rouge, bleue et vert.

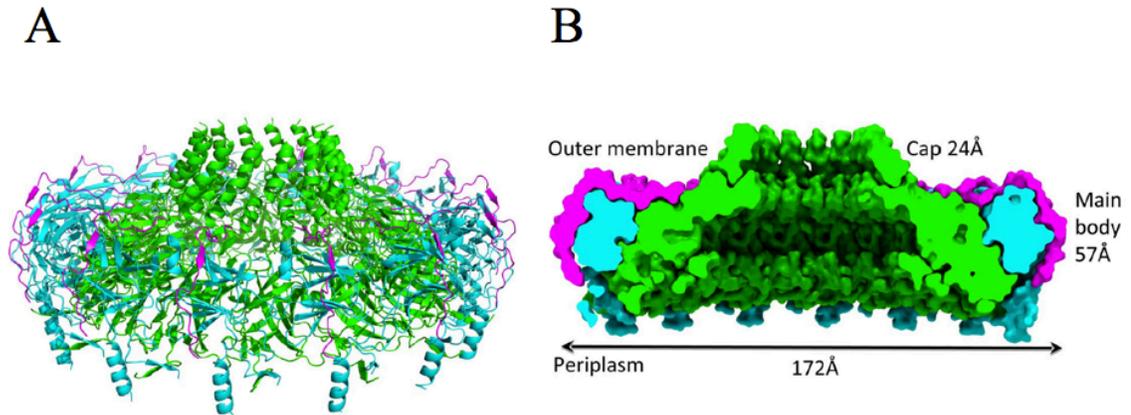


Figure 5. Le complexe de la ME du T4SS. En représentation en ruban (A) et (B), on retrouve le complexe tétradécamerique. Les sous-unités Tra_{CT}, Tra_{OT} et Tra_N sont représentées respectivement en vert, cyan et magenta. En B, les dimensions et les informations concernant les différentes parties du complexes sont aussi indiquées [75].

I.4. Objectifs du mémoire

Jusqu'à présent, le mécanisme moléculaire d'assemblage du T4SS n'a pas été élucidé. Par ailleurs, la résistance à grande échelle développée par les bactéries contre les drogues antimicrobiennes représente un problème majeur. De plus, les approches classiques qui ciblent les voies métaboliques essentielles ont cumulé une pression sélective qui a contribué à l'augmentation des souches de bactéries multi-résistantes. La stratégie de recherche que nous avons adoptée se base sur le développement de drogues d'antivirulence qui cibleraient les facteurs de virulence bactériens afin que la bactérie soit totalement «désarmée» permettant ainsi au système immunitaire d'éliminer le pathogène. La complexité de ce système multi-protéique a ralenti l'avancement de la recherche dans ce domaine. À partir des travaux de recherche effectués dans notre laboratoire [133, 134], nous avons identifié des petites molécules inhibitrices puissantes capable de cibler de manière spécifique un facteur d'assemblage essentiel au T4SS : VirB8. Parmi elles, nous avons pu identifier le site de liaison de B8I-1 par cristallographie et un inhibiteur prometteur : B8I-2. B8I-2 appartient à la classe de composés de type salicylidene acylhydrazide qui sont connus pour inhiber le T3SS [135]. De plus, contrairement aux autres inhibiteurs, ce dernier a été capable de réduire de manière considérable la croissance intracellulaire de *B. suis* dans les macrophages et aussi d'inhiber la homo- et l'hétéro-dimérisation de VirB8 *in vivo* à des basses concentrations de l'ordre du μM . Cependant, la structure tridimensionnelle du complexe VirB8-B8I-2 n'a jamais pu être élucidée par cristallographie. L'objectif de mon projet de recherche est multiple : (a) pouvoir investiguer le rôle et la dynamique existant entre les interactions de VirB8 avec lui-même mais aussi avec un de ses partenaires du T4SS (VirB10) afin de mener à bien (b) des études de relation structure-fonction sur un ensemble de 7 inhibiteurs dont les structures dérivent de l'échafaud de B8I-2. Le but ultime étant de pouvoir obtenir un inhibiteur avec une meilleure solubilité, mais aussi une structure VirB8-inhibiteur qui empêcherait l'assemblage du T4SS. La recherche proposée ci-dessus est translationnelle puisqu'elle nous permettra, à partir de notre compréhension de l'assemblage du T4SS et de sa fonction, d'inciter le développement de drogues.

II. Méthode expérimentale

II.1. Méthodologie expérimentale pour étudier les interactions protéine-protéine

L'information sur la structure des complexes protéiques déposés dans la base de données de protéines (*PDB*) fournit de nombreuses informations concernant la nature et la spécificité des interactions protéines-protéines [136, 137]; malgré de nombreuses avancées en biologie structurale, la détermination de la structure des complexes protéiques demeure néanmoins difficile. En effet, le taux d'élucidation de la structure des complexes protéine-protéine demeure faible [138]. Nous présentons dans ce chapitre, l'ensemble des méthodes et techniques employées pour identifier les déterminants des interactions de VirB8 avec elle-même, avec d'autres partenaires VirB et avec des inhibiteurs potentiels de ces mêmes interactions.

II.1.1. *Phage Display*

L'approche de *phage display* est un outil efficace de criblage à haut débit des interactions protéiques. Le principe du *phage display* repose sur l'expression d'une banque de protéines fusionnées avec le domaine N-terminal d'une des protéines situées à la surface des bactériophages [139]. Les phages recombinants sont ensuite sélectionnés de par leur spécificité de liaison avec la cible (protéines, fragments d'anticorps ou encore des acides nucléiques). De manière générale, le *phage display* peut-être divisée en trois étapes importantes : (a) la création de la librairie, (b) le criblage des clones et enfin (c) la sélection de ces derniers pour l'analyse ou encore le *phage display cycle* (Figure 6)[140].

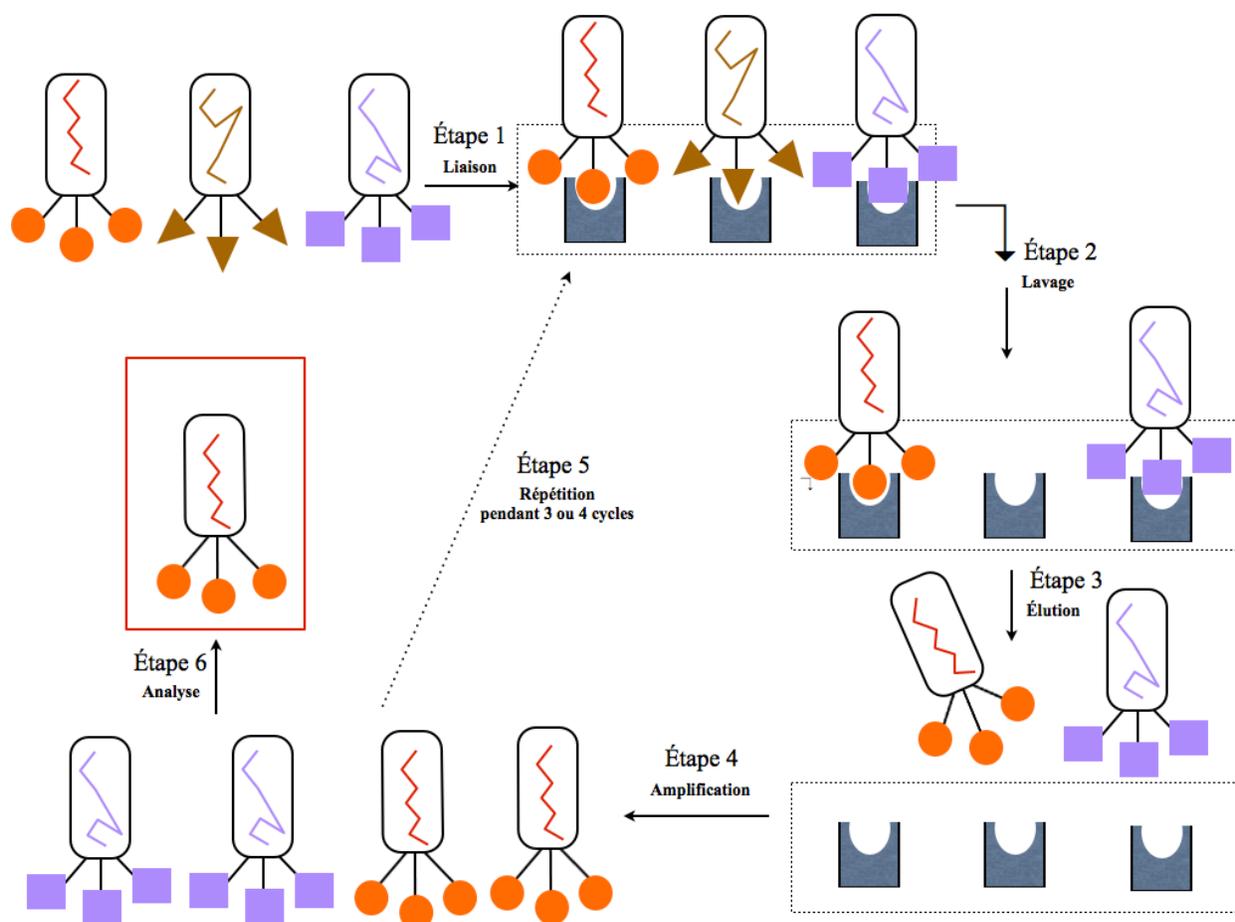


Figure 6. Principe général de l'identification d'interaction protéine–ligand par *phage display*.

(a) Dans un premier temps, les bibliothèques de protéines sont créées en empaquetant une population d'ADN correspondant aux protéines exposées et fusionnées aux récepteurs protéiques du phage [141].

(b) et (c) Dans un dernier temps, le criblage ainsi que la sélection sont faits par un processus de sélection par affinité. Durant cette étape, la bibliothèque de phages est exposée à une cible. Si le phage possède la spécificité appropriée, il se liera à la cible immobilisée. Les phages non liés seront lavés en ajustant la concentration de détergent et le temps de lavage [142]. Le processus de sélection est composé de plusieurs cycles répétitifs : chacun comprenant des étapes de capture, de lavage, d'éluion et d'amplification. Une fois que la banque de phages est exposée à la protéine cible, l'identification des séquences

d'interaction de la banque se fait par séquençage de l'ADN du phage. Les banques de protéines exposées sur le phage peuvent être sélectionnées sur différentes cibles tels que les anticorps monoclonaux afin de caractériser de nouveaux épitopes. Après de nombreux lavages, les phages fixés sont élués puis isolés et amplifiés par infection de bactéries. Les phages se liant de manière spécifiques et non-spécifiques sont ensuite élués en augmentant ou en baissant le pH afin de briser les liens non-covalents ou en utilisant des enzymes de clivage tels que la trypsine. Le phage élué est ensuite amplifié en infectant les bactéries à Gram-négatif (telle que *E.coli*). Les phages amplifiés sont ensuite sélectionnés à nouveau sur la même cible. Après plusieurs tours de sélection-amplification, les phages sélectionnés sont finalement séquencés afin d'identifier les sites exposés[143].

En conclusion, la méthode de *phage display* possède trois avantages majeurs : (i) elle permet de cribler un très grand nombre de molécules de différents types (les bibliothèques peuvent contenir jusqu'à 10^{10} molécules) dans un faible volume; (ii) d'avoir une correspondance entre le génotype et le phénotype, car le gène codant pour la protéine/ peptide est isolé à partir de l'ADN du bactériophage. Ceci permet d'accéder aisément aux séquences des molécules sélectionnées car l'ADN est directement isolé avec la protéine pour laquelle il code; (iii) il est aussi possible après le processus de sélection, d'utiliser le vecteur d'expression pour produire la protéine d'intérêt [140, 144].

Malgré des avantages certains, le *phage display* possède cependant de nombreuses limitations, notamment la taille des bibliothèques et parfois la faible affinité des fragments d'anticorps isolés à partir de banques construites.

II.1.2. Caractérisation des interfaces d'interaction par Mutagenèse de type *Alanine-Scanning*

Cette technique est basée sur le principe de mutagenèse systématique du gène codant de chaque résidu situé dans un site d'interaction, permettant ainsi d'utiliser différentes méthodes biochimiques afin de comprendre le rôle du dit résidu dans la dynamique de liaison avec le ligand. Cette méthode expérimentale est très utilisée lorsqu'on souhaite déterminer les épitopes

fonctionnels situés à la surface des protéines. À l'aide d'une mutagenèse dirigée du gène, la substitution d'un acide aminé par une alanine enlève la chaîne latérale des atomes au delà du carbone- β sans ajouter de flexibilité conformationnelle supplémentaire. De par cette approche, il est possible d'évaluer la contribution énergétique d'une chaîne latérale de l'acide aminé substitué à la liaison protéique ciblée. Ainsi, il est possible d'étudier l'effet de suppression de la chaîne latérale sur la fonction du variant de protéine exprimé. Au milieu des années 1990, la première expérience d'*alanine-scanning* fut menée; celle-ci portait sur l'étude de l'interaction entre l'hormone de croissance humaine et son récepteur [145]. Ils réussirent ainsi à montrer que le changement de certains résidus (encore appelés *hot spots*) en alanine entraînait une baisse significative de l'énergie libre de liaison.

II.1.3. Prédiction du site d'interaction protéine-protéine par arrimage moléculaire

L'intérêt de la communauté scientifique pour le T4SS a permis d'élucider la structure de VirB8sp mais aussi d'étudier son importance dans la dynamique et l'assemblage du T4SS. Cependant, les éléments structuraux déterminants de l'interaction VirB8-VirB10 ne sont toujours pas clairement définis. En effet, en absence de données cristallographiques sur le complexe VirB8-VirB10, nous avons opté pour une méthode d'arrimage *in silico* afin d'identifier les zones d'interaction situées à la surface de ces protéines. La difficulté liée à l'étude des complexes, du fait de la nature transitoire ou hydrophobes de leurs interactions (comme dans les complexes membranaires), font de l'arrimage moléculaire ou *docking* une alternative expérimentale attrayante. Celle-ci consiste en une modélisation de la structure tridimensionnelle d'un complexe. Ceci apporte de nombreuses informations structurales notamment concernant l'interface d'interaction entre les partenaires du dit complexe. Cette modélisation peut se faire de deux manières : *ab initio* (sans données complémentaires) ou encore à partir de données expérimentales concernant la zone d'interaction à l'étude. Pour ce faire, nous avons utilisé le logiciel d'arrimage HADDOCK 2.2 [146]. Notre choix s'est porté sur ce dernier car il permet (i) de contrôler les étapes d'échantillonnages à l'aide de données connues concernant les zones de

contact entre les protéines d'intérêt. Une fois ces données obtenues à partir d'expériences d'*alanine-scanning mutagenesis*, ceci nous a permis de mieux définir les résidus qui se situent potentiellement dans l'interface du complexe sur tous les partenaires d'arrimage; (ii) il permet aussi d'inclure un paramètre de flexibilité au processus d'arrimage moléculaire. Dans un premier temps, le logiciel effectue une minimisation de l'énergie sur corps rigide suivi par une étape d'introduction de semi-flexibilité au niveau de la torsion des angles. La dernière étape consiste en un raffinement du complexe *in silico* dans un solvant : l'eau. L'avantage de la modélisation computationnelle des interactions protéine-protéine réside dans sa capacité à identifier de nouvelles interactions ou encore les interactions qui, d'un point de vue énergétique, seraient plus favorables.

Malgré de nombreux avantages, ce type d'approche possède cependant une limitation de taille. En effet, l'arrimage moléculaire entre protéines suppose à priori qu'il existe une interaction entre les partenaires considérés.

II.1.4. Essai bactérien à deux hybrides : études des interactions protéine-protéine *in vivo*

L'essai bactérien à deux hybrides est une méthode efficace pour étudier les interactions protéine-protéine [147, 148]. Ce système est basé sur l'activation transcriptionnelle du gène reporteur contrôlée par une interaction protéine-protéine (ou par une interaction protéine-ADN). Comme présenté dans la Figure 7, deux protéines X et Y sont fusionnées à deux fragments complémentaires du domaine catalytique de l'Adenylate Cyclase: T25 et T18 et co-exprimées dans les cellules *cya* chez *E.coli*. L'interaction des protéines hybrides est détectée par l'apparition d'un phénotype simple à analyser : celle-ci résulte en une complémentarité fonctionnelle entre les deux fragments (T25 et T18) menant à la synthèse de cAMP. Ce dernier se lie à une protéine activatrice des catabolites déclenchant une expression des opérons cataboliques chez *E.coli*. Une interaction productive entre deux protéines d'intérêt entraînera une activation transcriptionnelle d'un gène reporteur adjacent tel que *lacZ* [147].

L'efficacité de la complémentation est déterminée grâce à la mesure des activités de β -galactosidase dans les cellules transformées. Cette méthode permet de détecter les interactions *in vivo*. Elle est sensible, rapide, simple à mettre en œuvre et ne nécessite aucune purification préalable. Ce système permet d'étudier tous les types de protéines participant aux différents processus cellulaires, y compris les protéines membranaires. Il permet de détecter les interactions faibles et transitoires. Cette technique permet aussi l'identification de complexes protéiques mais aussi d'interaction de protéines avec des petites molécules inhibitrices (tel que présenté dans ce mémoire). Couplée à la mutagenèse dirigée, il est possible d'identifier des domaines d'interaction ainsi que des résidus critiques pour l'interaction à l'étude. Pour notre étude, l'avantage de cette technique réside donc dans trois points majeurs : l'identification, l'optimisation et la modification des interactions protéine-protéine ou protéine-inhibiteurs. De plus, cette méthode peut être utilisée comme une méthode de criblage à haut débit [133] afin d'identifier de potentiels inhibiteurs d'une interaction protéine-protéine. L'un des inconvénients majeurs liés à l'utilisation de l'essai bactérien à deux hybrides est la production de nombreux faux positifs qui peuvent être dus à des interactions non spécifiques.

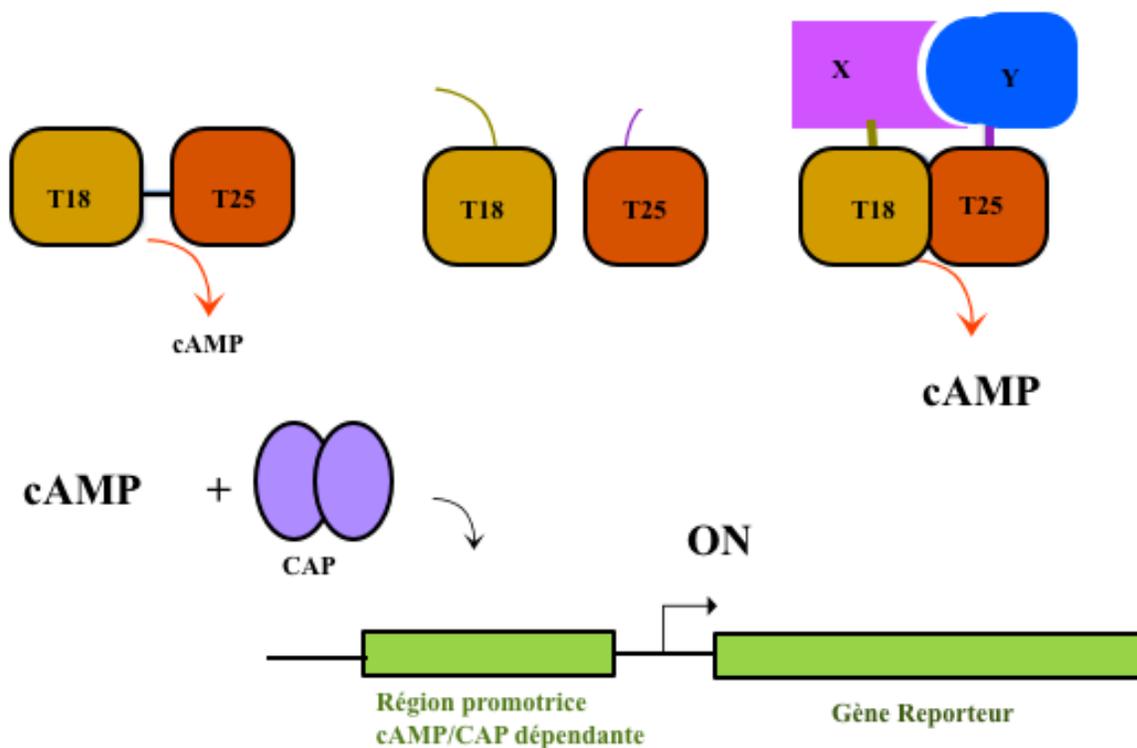


Figure 7. Principe de l'essai bactérien à deux hybrides [147]. Deux protéines X et Y sont respectivement fusionnées aux fragments complémentaires (T18 et T25) du domaine catalytique de l' AC (adenylate cyclase de *B. pertussis*). Celles ci sont ensuite co-exprimées dans les cellules BTH101 *cya* déficientes. L'interaction est mesurée suite à la complémentation des deux fragments (T18 et T25) qui entraîne une production de cAMP et ensuite de β -galactosidase en présence de X-gal (5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranoside) comme substrat.

II.1.5. Chemical crosslinking

Le principe de *chemical crosslinking* est basé sur l'introduction d'un lien covalent entre les acides aminés de deux peptide localisés à proximité. Il permet de «figer» la structure tridimensionnelle d'un complexe protéine-protéine mais aussi de stabiliser les interactions existant entre les deux partenaires [149, 150]. L'un des avantages d'une telle technique est sa capacité à stabiliser des interactions dynamiques entre protéines. Par ailleurs, une fois le *crosslinking* effectué, les complexes protéiques peuvent être soumis à des lavages successifs sans pour autant les déstabiliser. Cela peut aussi avoir comme effet néfaste de rendre plus difficiles les

étapes de solubilisation de l'échantillon protéique en présence détergents. Nous avons utilisé l'approche du *crosslinking* dans ce mémoire afin d'atteindre deux objectifs:

- Analyse de l'homodimerization de VirB8sp.
- Analyse de la perturbation de complexe VirB8sp-VirB8sp en présence de concentrations croissantes d'inhibiteurs.

II.2. Méthodologie expérimentale pour étudier les interactions protéine-ligand *in vitro*

II.2.1. La spectroscopie de fluorescence

En luminescence, les molécules fluorescentes (fluorophores) peuvent absorber (lumière d'excitation) et émettre de l'énergie lumineuse (lumière d'émission) lorsqu'elles sont excitées par certaines longueurs d'onde. En fluorescence, une fois l'énergie du photon absorbée, le fluorophore fait la transition d'un état basal (état singulet S₀) à un état électroniquement excité (état singulet S₁) (Figure 8). En fluorescence, le retour à l'état basal peut se faire par l'émission d'un photon très rapidement. La spectroscopie de fluorescence est utilisée très largement pour suivre les interactions entre protéines-ligands et acides nucléiques-ligands. Ceci peut-être effectué de deux manières : (i) en prenant en compte la fluorescence intrinsèque du tryptophane des protéines ou (ii) en marquant les fluorophores. Le spectrophotomètre à fluorescence fournit deux types de spectres : spectre à émission et spectre à excitation.

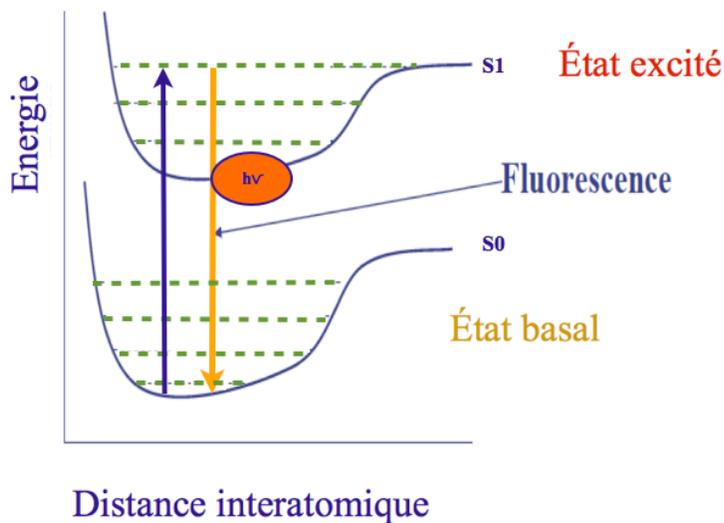


Figure 8. Principe général de la spectroscopie de fluorescence. Les états excité et basal aussi sont représentés.

II.2.1.1 La fluorescence des résidus tryptophanes

La fluorescence d'une protéine repliée correspond à l'ensemble de la fluorescence de ces acides aminés aromatiques. Le plus souvent, la fluorescence intrinsèque d'une protéine est due à l'excitation de ces tryptophanes. Le tryptophane possède un maximum d'absorption à 280 nm (Figure 9) et un pic d'émission s'étendant de 300 à 350 nm selon la polarité de l'environnement [151].

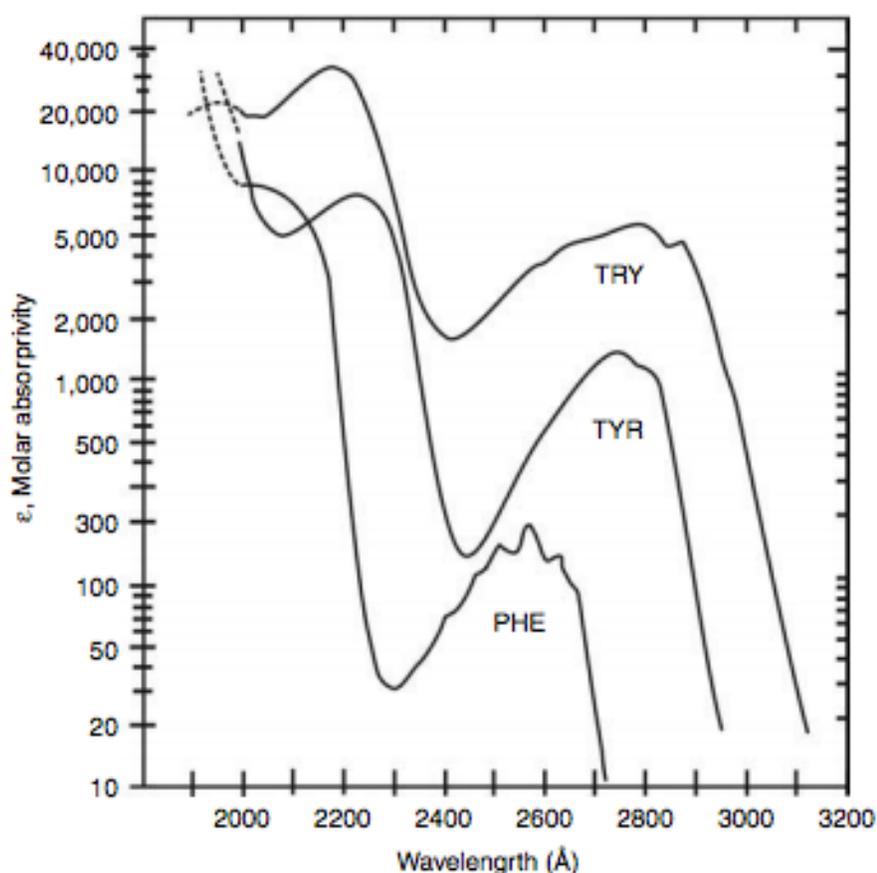


Figure 9. Spectres d'absorption de différents acides aminés : tryptophane, tyrosine et phenylalanine dans de l'eau [152].

Parmi les trois acides aminés fluorescent d'une protéines, le tryptophane est le plus abondant [153]. La contribution de la phenylalanine, en terme de fluorescence intrinsèque de la protéine, est négligeable due à sa faible absorptivité en complément de son faible ratio photons absorbés/ photons émis par fluorescence. Bien que la tyrosine possède un ratio photons absorbés/ photons émis par fluorescence similaire à celui du tryptophane, son groupe indole est responsable de l'absorption UV à ≈ 280 nm et d'une émission à ≈ 350 nm chez les protéines [154]. De plus, dans les protéines natives, l'émission de la tyrosine est souvent amoindrie via transfert d'énergie au tryptophanes[153]. Ceci fait de l'étude de la fluorescence des tryptophanes une méthode sensible pour mesurer l'état conformationnel de chaque résidu. En effet, ses propriétés spectroscopiques, sa haute sensibilité à son environnement en font un objet d'étude attrayant.

II.2.1.2 *Difference spectrum*

Quand l'observation d'un spectre indique la présence de caractéristiques particulières d'interaction entre molécules, il est possible de calculer un *difference spectrum*. Il s'agit là d'une technique très sensible qui permet de détecter mais aussi de localiser des changements locaux dans un spectre [155]. Un *difference spectrum* est un spectre d'absorption obtenu en soustrayant le spectre d'absorption d'une substance à une autre.

III. Article - New insights into small-molecule inhibitors and protein-protein interactions of VirB8: a critical conserved component of the type IV secretion system

III.1. Contribution des auteurs

Ingrid Um Nlend a produit et a purifié les protéines VirB8 et VirB10. Elle a généré l'ensemble des variants de VirB8 et VirB10 et a effectué l'ensemble des expériences d'essai à deux hybrides ainsi que leur optimisation dans le cadre de l'étude de l'interaction VirB8-inhibiteurs et TraE-inhibiteurs (données supplémentaires). Elle a aussi effectué les essais de spectroscopie par fluorescence, dans le cadre de l'interaction VirB8-inhibiteurs, en collaboration avec **Jonathan Smart**. Elle a effectué, sous la supervision d'**Ana Villamil Giraldo** les expériences de *phage display* concernant l'interaction VirB8-VirB10. **Ingrid Um Nlend** a aussi réalisé l'ensemble des essais biochimiques subséquents. Pour finir, elle a rédigé l'article avec le **Docteur Christian Baron**.

III.2. Texte de l'article

New insights into small molecule inhibitors and protein-protein interactions of VirB8: a critical conserved component of the type IV secretion system (T4SS)

Ingrid Um Nlend¹, Jonathan Smart¹, Ana Villamil Giraldo¹, Jurgen Sygusch¹ and Christian Baron

¹*

¹ Département de biochimie et médecine moléculaire, Université de Montréal C.P. 6128
Succursale Centre-Ville, Montréal, QC H3C 3J7 Canada.

*Corresponding author: Christian Baron, Département de biochimie et médecine moléculaire,
Université de Montréal, C.P. 6128 Succursale Centre-Ville, Montréal, QC H3C 3J7 Canada.

III.2.1 Abstract

Secretion systems translocate virulence factors of many bacterial pathogens, enabling their survival inside the host organism. Consequently, their inhibition strongly attenuates pathogenicity and can be considered a target for novel antimicrobial drugs. The type IV secretion system (T4SS) of the intracellular pathogen *Brucella suis* is a prerequisite for its virulence, and in this work we targeted the interactions of the essential assembly factor VirB8 using derivatives of the inhibitor B8I-2. We identified several potent and specific inhibitors, and we conducted several experiments in order to identify the target-binding site of these inhibitors by fluorescence binding studies, *in silico* docking and bacterial two hybrid assay. We hypothesized, based on previous studies [1, 2], that VirB8 interaction inhibitors bind to a surface groove opposite to the dimerization interface. With this structure-based study, we identified (a) essential residues for the interaction of VirB8 with VirB10 and (b) several small-molecule inhibitors that possessed potent inhibitor activities on VirB8 homodimerization and heterodimerization *in vivo*.

III.2.2 Highlights

► Identification of a potential binding domain of VirB8 with VirB10 ► Assessment of the VirB8-VirB10 interaction site using VirB8 protein variants to determine key interaction residues identified by *in vivo* and *in silico* methods ► Identification of potent inhibitors of VirB8 homo- and heterodimerization using BTH assay ► Verification of the interaction of VirB8 with inhibitor (BAR-068) using fluorescence spectroscopy and chemical cross-linking.

III.2.3 Introduction

The increasing resistance to classical antibiotics necessitates the development of alternative therapeutic strategies against microbial infectious diseases [2-4]. Genomics-based approaches, which are aimed at identifying novel targets [2, 5], have potential to yield new therapeutic approaches; it is nevertheless foreseeable that resistance will eventually develop against drugs that target vital cell functions. Alternative strategies comprise phage therapy, the stimulation of the host immune system, and the development of “antivirulence” drugs that specifically target bacterial virulence functions but not vital cell functions [2, 6]. The rationale underlying the latter approach is that these molecules will disarm pathogens, permitting their elimination from the body by the immune system, and that the selection pressure for the development of resistance mutations will be reduced, as they do not target vital cellular functions. Recent years have seen significant advances in this area, especially in research targeting T3SS, where promising molecules were discovered [7, 8]. Interestingly, many of the active molecules belong to the class of salicylidene acylhydrazides and have broad-spectrum activity against *Yersinia*, *Chlamydia*, *Salmonella*, and *Shigella* species [9-11]. These molecules were isolated using cell-based high-throughput screening (HTS) measuring T3SS system functions in living cells, and their targets have not been unequivocally identified. In contrast, we have pursued a different approach based on a well-characterized target with known X-ray structure from the *Brucella* type IV secretion T4SS [12].

Here, we pursued an approach inspired by previous X-ray crystallographic studies and structure-function analyses suggesting that dimerization is important for VirB8 functionality [1, 2, 12, 13]. VirB8 is a bitopic inner membrane protein that undergoes multiple interactions with other T4SS components via its periplasmic C-terminal domain, and it is an essential assembly factor [14]. We previously designed a cell-based assay for the isolation of small molecule inhibitors of VirB8 interactions with the goal of isolating T4SS inhibitors [2]. Screening a small-molecule library identified several specific inhibitors of VirB8 interactions, and one of these molecules strongly reduced the intracellular proliferation of *Brucella abortus* 2308: B8I-2 [2]. Our results show that we have identified specific VirB8 interaction inhibitors that may be

suitable for development into leads for antivirulence drugs that disarm *Brucella*. Here, we report the identification of BAR-068: an inhibitor of VirB8 interactions and site-directed mutagenesis to change critical amino acids at the binding site of VirB8 and VirB10. BAR-068 binding mode is not yet known, but our results suggest that it may interact with VirB8 in a transient manner and inhibit a conformational change that is required for protein function.

III.2.4 Results

III.2.4.1. Peptide array analysis identifies a domain of VirB8 as a potential interaction site with VirB10.

```

mfgrkqspqksvknngqgnapsvydealnweeahvrlvekserrawkiaga 50
                                IDAPANQRLQK
fgtitvllgigiagmplkqhvpvlrvnaqtgapdiltsldeksvsydt 100
                                GMPVAL
vmdkywlsqyviaretydwytlqkdyetvgmlsspsegqsyasqfqqdka 150
                                PPLSAPN
                                LSSPTSN
                                NRGQLST
ldkqygsnvrtsvtivsvipngkqigtvrfakttkrtnetgdgetthwia 200
                                KWWPPLTSIVFS
                                NLRTDSLTLVIR
                                NLRTDSLTLVIR
                                KVWMPNNRSPVP
tigyqyvnpslmsesarltnplgfnvtsyrvdpemgvvq 250
                                WMADTSPSLAST

```

Figure 1. Identification of VirB10 binding peptides by phage display. Purified VirB10 protein was subjected to three rounds of panning using the phage display library and the isolated peptides were aligned with VirB8 protein sequence using pepitope server [15]. The primary sequence of VirB8 displayed is aligned with VirB10 affinity-selected peptides from libraries Ph.D.-12 and Ph.D.-C7C (NEB) aligned above and below respectively (identified peptides can be found in supplementary data Table S1). Identical residues in the protein and peptide sequences are highlighted in red, and conserved residues are highlighted in yellow.

We have previously reported that VirB8 interacts with itself and with VirB10 [16]. To identify VirB8 interaction sites with VirB10, we used a phage display approach previously presented by our group [17]. The purified periplasmic domain of VirB8 from *B. suis* (VirB8_{sp}) was incubated with libraries of M13 phages that displayed random 12-mer peptides on the surface of the pIII protein (Ph.D.-12), and 7-mer constrained peptides (Ph.D.-C7C), respectively, and binding phages were enriched by three rounds of panning. VirB8 from *B. suis* was used as bait with these two combinatorial libraries to isolate peptides that bind VirB8. Single-stranded phage DNA was isolated, followed by PCR amplification, and sequenced to identify the surface-exposed peptides. We identified several unique peptides from both libraries, and these were aligned with the VirB8 protein sequence using the pepitope server (<http://pepitope.tau.ac>) [15]. This analysis revealed potential interacting peptides of VirB8 with VirB10. Alignment of unique peptides with VirB8 resulted in 10 peptides that had similarities (Figure 1). Interestingly, a cluster of peptides that were similar to VirB8 (amino acids 157-170) were localized on a surface exposed domain of VirB8 (on the β sheets). To substantiate the significance of these results, we also conducted mutational studies and several rounds of *in silico* docking analysis in order to verify the binding of VirB10 by the domain of VirB8_{sp} identified through phage display analysis.

III.2.4.2. Characterization of VirB8 heterodimerization with VirB10.

To complement the phage display analysis with a more biologically relevant assay, we applied the BTH assay system that is based on the reconstitution of the enzymatic activity of Adenylate Cyclase (AC) by interacting proteins fused to its two domains. Full lengths versions and variants of VirB8 (VirB8_{FL} and variants of VirB8 respectively) and VirB10 (VirB10_{FL}) were expressed in *E. coli* as fusions to the cytoplasmic T18 and T25 domains of AC and the interaction VirB8_{FL}-VirB10_{FL} was shown to restore cAMP production and ultimately β -galactosidase activity as readout [18, 19] (Figure 3).

Alanine-scanning mutagenesis, a method of systematic alanine substitution, has been particularly useful for the identification of interaction sites. VirB8 variants were generated by

using alanine scanning mutagenesis of the gene (Figure 2). To further investigate the interaction between *B. suis* VirB8_{FL} and VirB10_{FL}, we completed alanine scanning mutagenesis on the potential interacting regions of VirB8_{FL} previously identified by phage display (Figure 1). The ability of these VirB8_{sp} and the 13 tested variants to interact with VirB10_{FL} was detected by restoration of β -galactosidase activity (Figure 3). We first tested as a positive control known interactions with full-length VirB8 and VirB10 fusions (pKT25–VirB10 and pUT18C–VirB8) (Figure 3).

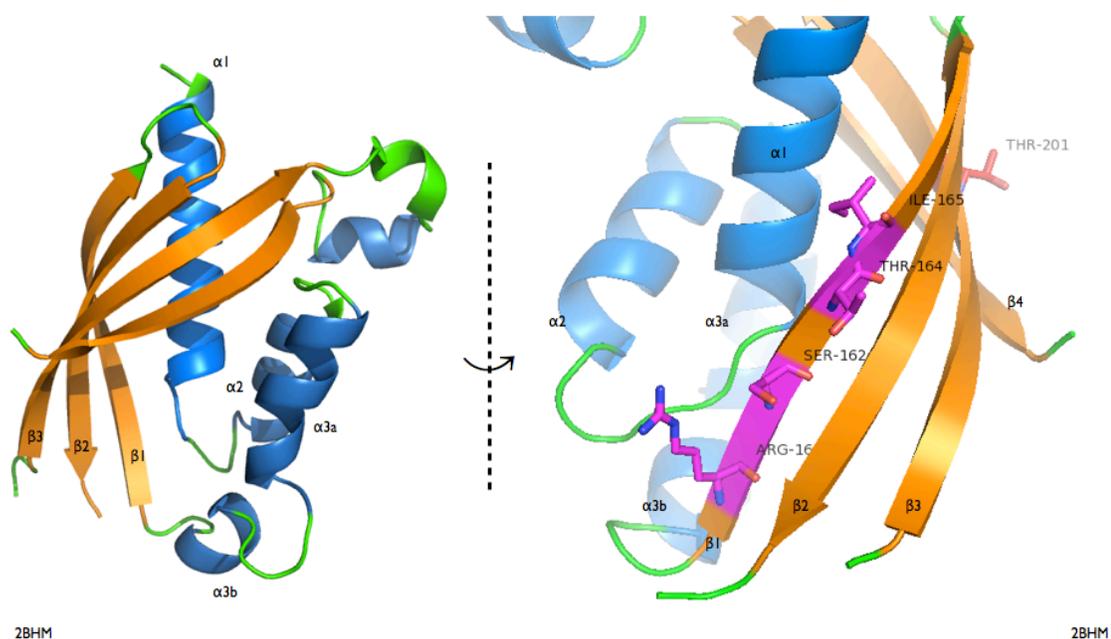


Figure 2. Localization of amino acids changed in this study shown on the *B. suis* VirB8sp x-ray structure. Cartoon representation showing a model of the VirB8sp structure in two different orientations. β -sheet solvent-exposed residues which induced a reduction of VirB8 dimer formation after mutagenesis are represented in fushia (R160, S162, T164 and I165) and red stick for T201[13]. The model was generated using MACPYMOL (<http://pymol.org/>) and was retrieved from www.rcsb.org (PDB Code : 2BHM).

As we have previously shown, VirB8 interacts with VirB10 via its specific residues positioned on the solvent exposed β -sheet [13]. Accordingly, we observed a reduction of the formation of this complex only in case of changes in the β -sheet region at T201A (as previously shown [13]), R160A, S162A, T164A and I165A suggesting that those residues are important for the heterodimerization of VirB8 with VirB10. These results were consistent with the phage display results which highlighted an interaction in this particular region (Figure 2). This suggests that R160, S162, T164 and I165 that are exposed on the β -sheet face of VirB8 are involved in interaction with VirB10 as their change to Alanine leads to a decrease in the association of VirB8 with VirB10.

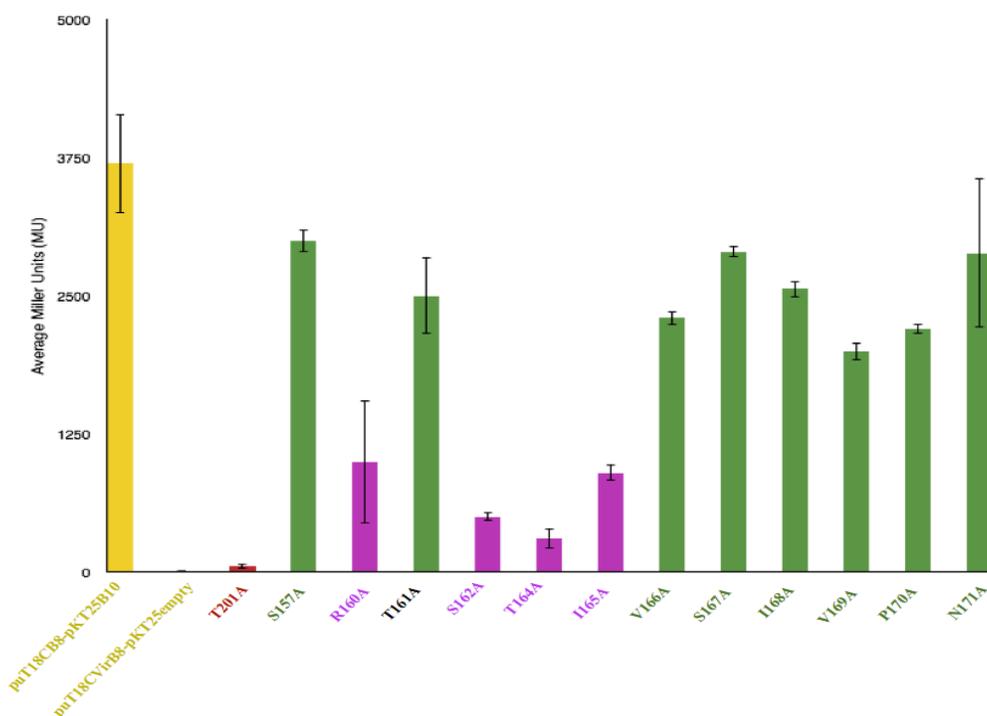


Figure 3. BTH β -galactosidase activity assay reveals critical residues in the interaction of VirB8 and VirB10. In all cases, BTH negative control strains contained empty pKT25 and pUT18C-VirB8 vectors and positive control strains contained the pKT25-VirB10_{FL} and pUT18C-VirB8_{FL} fusions (both highlighted in yellow). VirB8 variants that showed a decrease in interactions with VirB10 are highlighted in red (T201) and in fuchsia (R160, S162, T164 and I165). The other interactions tested between VirB8 variants and VirB10 are highlighted in light green. Error bars represent the standard deviation of 8 independent measurements.

III.2.4.3. *In silico* study of VirB8 heterodimerization with VirB10.

To complement the VirB8 dimerization analysis using phage display and mutagenesis, we conducted several rounds of *in silico* docking analysis on the heterodimerization of VirB8 with VirB10 in order to identify the residues involved in their interaction (Figure 4). These analyses were carried out by means of the rigid-body docking algorithm of HADDOCK 2.2 [20, 21]. As the structure of VirB10_{FL} is not known, we generated a model of this structure using MODELLER 9.14 [22] based on the elucidated X-ray structure of the C-terminal portion of its homologs in pKM101: TraF_{CT} [23, 24]. The latter was extracted, using Pymol, from the crystal structure of a 0.6 MDa outer membrane complex consisting of 14 copies of VirB7/TraN, VirB9/TraO and VirB10/TraF encoded in the plasmid pKM101 [25, 26]. The extracted portion consisted of 226 amino acids, all located in the C-terminal part of the complex (residues 160 to 386) (PDB code: 3JQO). After modelling, the predicted structure of VirB10_{FL} was consistent with that of its homologs TraF_{CT} and ComB10 [12] (PDB code: 2BHV) (See Figure S1). However, due to its proline rich region located in the N-terminal portion of VirB10_{FL}, we could not rely on the modelling of this domain as it was highly unstructured and thus could not be predicted with precision (See figure S1). We focused only on the secondary structural elements that showed consistency with previously obtained structures: the C-terminus and a portion of the N-terminus.

Based on the available X-ray structure of VirB8 from *B. suis* (PDB code : 2BHM) and the predicted model of VirB10_{FL}, we calculated an *in silico* model of the complex VirB8-VirB10 and the lowest-energy HADDOCK cluster obtained included 45 conformers with backbone RMSD of 1.2 ± 0.9 Å (See Table S2 in supplemental data). From this cluster, ten structural models showed a well defined complex between VirB8 and VirB10. The model also shows some interface residues (including R160, S162, T164 and I165; see Figure 4) that are predicted to be involved in making multiple contacts with VirB10_{FL} in a manner fully consistent with our phage display and our alanine-scanning mutagenesis results (Figure 4).

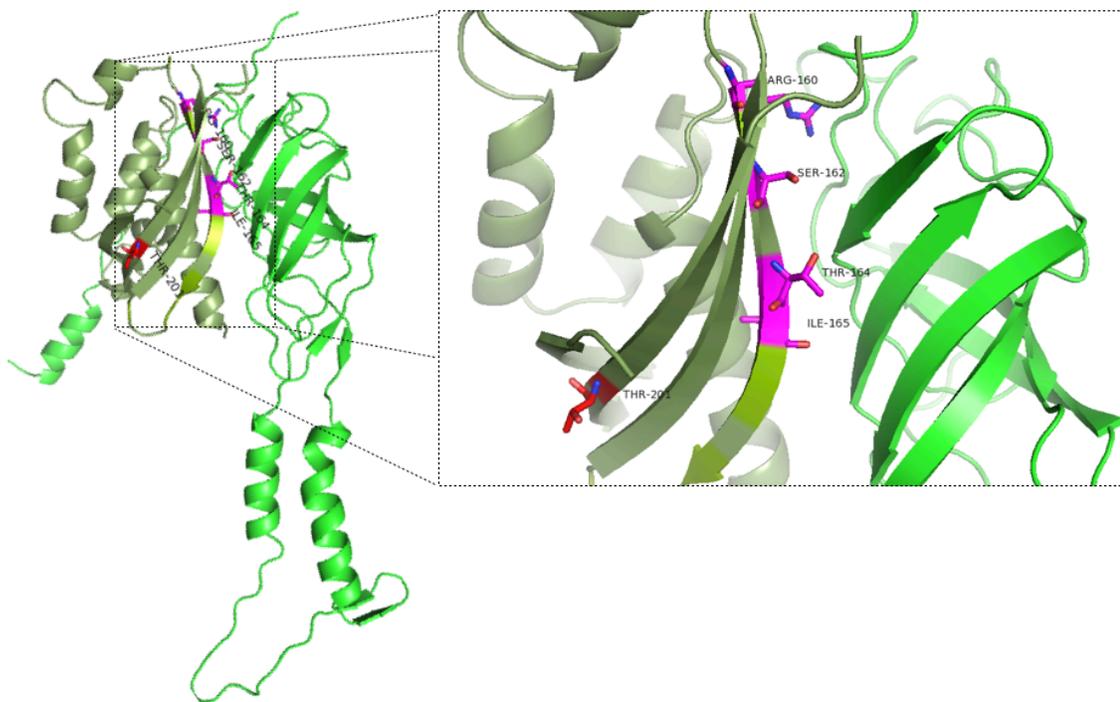


Figure 4. A cartoon representation of the VirB8-VirB10 complex with residues at the interface predicted to participate in the dimer interaction. The residues represented in sticks and highlighted in fuchsia correspond to residues elucidated as being part of interacting domain using phage-display analysis (R160, S162, T164 and I165). T201 is represented in sticks and highlighted in red. In dark green, we represent VirB8 and in fluorescent green, we represent the model of VirB10_{FL} obtained using his homolog in pKM101: TraF. The model was generated using MACPYMOL (<http://pymol.org/>) and the structure of VirB8 was retrieved from www.rcsb.org (PDB Code: 2BHM).

III.2.4.4. Characterization of VirB8 inhibitors

VirB8 interaction inhibitors were originally identified in studies that used the BTH assay as a high-throughput screening tool [1, 2]. This assay relies on a reporter system that is based on the restoration of interactions between two domains (T18 and T25) of adenylate cyclase (AC) that are independently fused to the N-terminal domain of VirB8_{FL} (cytoplasmic), such that the C-terminal (periplasmic) domain of VirB8_{FL} is localized in the periplasm of *E. coli*, simulating the natural environment of VirB8 *in vivo* [27]. Among the 20 initial inhibitors of VirB8-VirB8 interactions, eight of which were found to inhibit both VirB8-VirB8 and VirB8-VirB10 interactions [2]. We focused on B8I-2 as it was one of the four most active molecules which had a low EC₅₀ values (effective concentration of 50% inhibition in an *in vivo* system) and it inhibited both VirB8-VirB8 and VirB8-VirB10 interactions in the BTH assay [1, 2]. Also, B8I-2 was the only molecule that inhibited *B. suis* replication in mammalian cells.

Molecular recognition in biological systems relies on the existence of specific interactions between partner molecules. Structure-based drug design seeks to identify and optimize such interactions between ligands and their targets, typically proteins, based on their three-dimensional structures. This optimization process requires knowledge about interaction geometries and approximate affinity contributions of attractive interactions that can be deduced from crystal structures and associated affinity data. On the basis of structural analyses, our collaborators from Dr. Pierre Lavallée's laboratory synthesized small-molecule inhibitors derived from the scaffold of B8I-2 in order to improve pharmacokinetic properties and solubility. We further synthesized 7 new compounds derived from B8I-2 in order to probe the requirements for chemical functionality opposing the central N-N hydrazide bond on both the left-hand side (LHS) 2-hydroxybenzamide moiety of the salicylidene ring, and the right-hand side (RHS) furyl and 2-nitrophenyl moieties of the B8I-2 basic structure (Figure 5). We tested the molecules using the BTH assay and we observed that subtle changes to the LHS and RHS portions of B8I-2 scaffold led to molecules that retained activity (Table 1). The small changes consisted in adding an atom from the halogen family in position ortho-, meta- and para- from the hydroxyl group on the LHS and/or swapping of -NO₂ to a -Cl atom (Figure 5). As the LHS similarly appears to

tolerate only modest changes [1], we only proceeded to the addition of atoms belonging to the halogen family (-Cl, -I and -F) in position para or meta of the -OH group (Figure 5). We used these halogen atoms as they operate as strong electron-withdrawing substituents relative to hydrogen and may have effects on the reactivities of para- and meta-substituted hydroxybenzamide moiety.

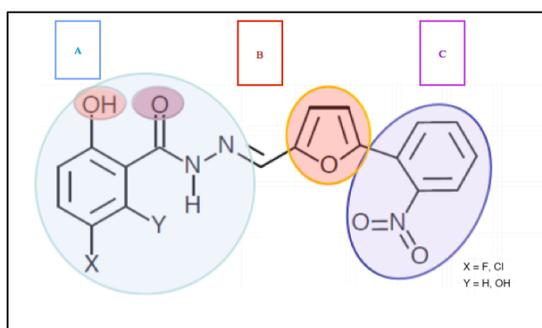


Figure 5. Framework of chemical synthesis applied on the scaffold of inhibitor B8I-2. (A) The left-hand side (LHS) of the structure is highlighted in light blue, with X representing Fluor (-F) and Chlorine (-Cl) atoms and Y representing Hydrogen atom (-H) and hydroxyle (-OH). (B) Highlighted in red is the molecular spacer and (C) in purple is represented the right-hand side (RHS) which contains a 2-nitrophenyl group.

Based on previous work conducted by our research group [1], we now know that VirB8 interaction inhibitors bind to a surface groove of the protein located on the opposite side of the predicted dimerization site [28]. Consequently, we hypothesized that B8I-2 derivatives would also interact with VirB8 monomer following the same binding mode. We conducted several rounds of experiments using the BTH assay in order to evaluate the effect of 7 B8I-2 derivatives (BAR-068, BAR-069, BAR-070, BAR-071, BAR-072, BAR-073 and BAR-074; see Table 1 and

supplemental data) on VirB8 homodimerization and heterodimerization with VirB10. As the B8I-2 derivatives are specifically targeting VirB8, we also evaluated their effects on VirB10 homodimerization as a negative control. First, we observed that one of B8I-2 derivatives (BAR-068, Figure 6A) strongly decreased the homodimerization of VirB8 ($EC_{50} = 2.2$ nM; Figure 6B and Table 1) and its heterodimerization with VirB10 ($EC_{50} = 2.8$ μ M, Figure 6C and Table 1). Additionally, we also confirmed that BAR-068 had no effect on VirB10 homodimerization which confirmed its specificity in targeting VirB8 (figure 6D). The shape of the curve in Figure 6C suggests a single binding site for BAR-068 when interacting with the heterodimer of VirB8. This is due to the change of the readout of the β -galactosidase activity, which cover two log units change in concentration. Surprisingly this is not coherent with the steepness of the curve obtained when looking at the interaction of BAR-068 in presence of the homodimer of ViB8 (Figure 6B). Indeed, the steepness of the latter curve suggests a binding that does not follow the law of mass action with a single site, as the change of the readout of the β -galactosidase activity covers approximately 4 log units in concentration. However, the steepness of the fitted curves in both cases (Figures 6B and 6C) implies cooperative binding. Of interest, five of the molecules derived from B8I-2 scaffold (BAR-068, BAR-070, BAR-071, BAR-073 and BAR-074) inhibited both VirB8-VirB8, VirB8-VirB10 interactions and had no effect on VirB0-VirB10 interactions in the BTH assay (see Table 1 and figures S3; S7; S8; S13 and S15). These results clearly suggest that the interaction of these derivatives with VirB8 causes conformational changes that affect interactions of VirB8 with itself and with other VirB partners including VirB10.

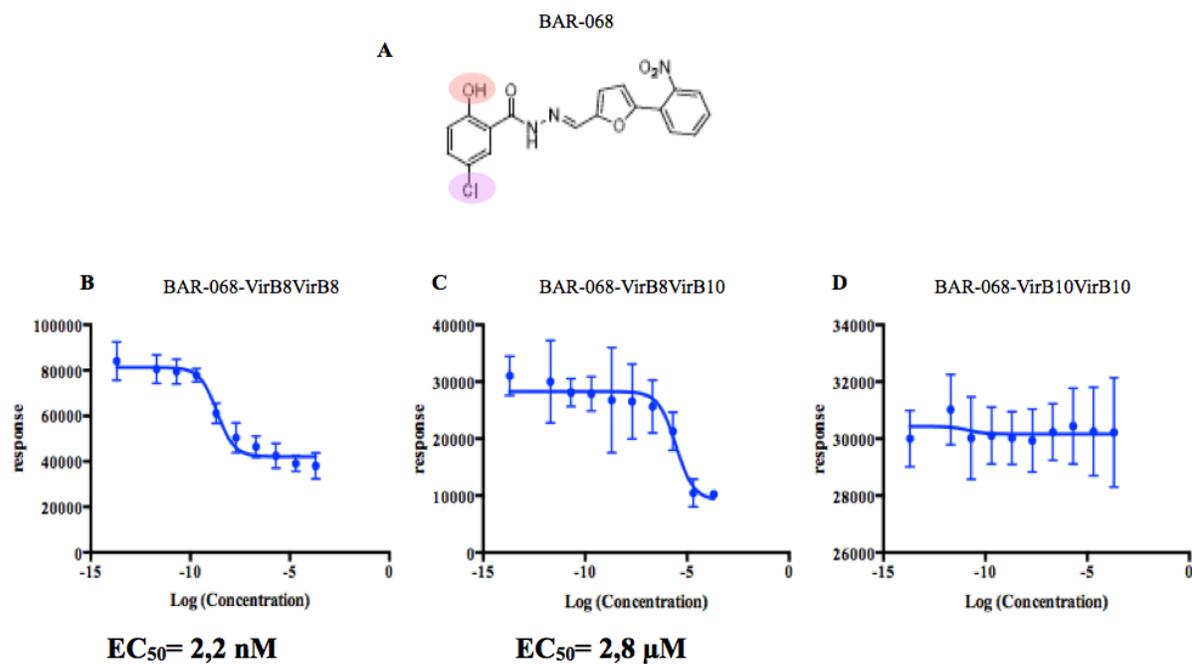


Figure 6. Dose response and determination of the effect of BAR-068 on VirB8 interactions. (A) Structure of BAR-068 with X= -Cl in position para of the -OH group highlighted in red. (B), (C) et (D) *E. coli* strain BTH101 expressing fusions of VirB8_{FL} to the T18 and T25 domains of adenylate cyclase was cultivated in 96-well microtiter plates in TGYEP medium, and the β -galactosidase activities reflecting the protein-protein interaction were determined in the presence of inhibitor BAR-068 at concentrations from 2 μ M to 2 mM. The EC₅₀ values are indicated for each inhibitors.. The average from 24 replicates for each concentration of considered inhibitor is given and the standard deviation is shown (See also Figures S3, S5, S7, S9, S11, S13 and S15 in supplementary data).

Compound name	Inhibition of interaction :				
	VirB8-VirB8	EC ₅₀ (μM) for VirB8-VirB8	VirB8-VirB10	EC ₅₀ (μM) for VirB8-VirB10	VirB10-VirB10
B8I-1	+	4,70	+	NA	-
B8I-2	+	2,3	+	NA	-
B8I-3	+	1,4	+	NA	-
B8I-16	+	no effect	+	NA	-
BAR-068 ^a	+	2,2x10e-3	+	2,8	-
BAR-069 ^a	-	no effect	-	no effect	-
BAR-070 ^a	+	0,016	+	0,12	-
BAR-071 ^a	+	0,49	+	0,13	-
BAR-072 ^a	-	no effect	-	no effect	-
BAR-073 ^a	+	0,23	+	1,6x10e-2	-
BAR-074 ^a	+	0,46	+	0,5	-

Table 1. Compounds used in this study and their impact on VirB8-VirB8 and VirB8-VirB10 interactions *in vivo*. The EC₅₀ values of the inhibitor obtained after testing on VirB8 homo- and heterodimerization are also reported. Inhibitors who were revealed to be inactive in presence of VirB8-interactions lack EC₅₀ values in μM. Previously tested compounds were used as positive control (B8I-1; B8I-2; B8I-3 and B8I-16) on VirB8 homodimerization; (a) Names of all synthesized derivatives from B8I-2 scaffold; NA = not available.

III.2.4.5. Characterization of inhibitor binding to VirB8_{sp} using fluorescence spectroscopy

Fluorescence-based techniques provide diverse ways of probing the chemical environments and intermolecular interactions and they were extensively applied to understand receptor-mediated signaling. Changes in intrinsic tryptophan fluorescence of periplasmic binding proteins have been widely exploited as a useful reporter of ligand-induced conformational

changes [29]. VirB8_{sp} contains three tryptophan residues (W106, W119 and W198) located in the vicinity of the previously defined binding pocket [1] (Figure 7), which could undergo conformational changes upon binding of a particular ligand. As B8I-2 and B8I-1 possess a similar binding mode [1], we hypothesized that B8I-2 derivatives would also follow the same mode of interaction with VirB8. This interaction could cause a disruption in the tryptophan located near the binding, and as a consequence, help us in the characterization of the binding mode of the considered inhibitors.

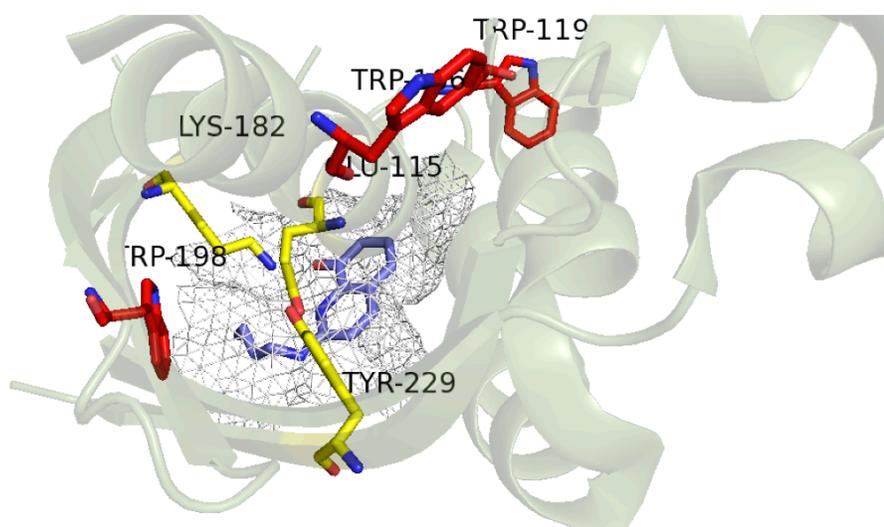


Figure 7. Identification of tryptophan residues located around the inhibitor binding site of VirB8_{sp}. A cartoon representation of the monomer of VirB8_{sp} is shown in dark green and in red sticks are represented the tryptophan residues (W106, W119 and W198) located at the vicinity of the binding site. In yellow sticks are represented residues K182-E115-Y229 that are directly interacting with B8I-1 in the surface groove [1]. The model was generated using MACPYMOL (<http://pymol.org/>) and the structure of VirB8_{sp} was retrieved from www.rcsb.org (PDB Code : 4AKY).

To address this possibility, we used a fluorescence spectroscopy assay to detect and characterize conformational changes in VirB8_{sp} induced by the binding of a specific inhibitor. Excitation at 280 nm resulted in an emission maximum at 340 nm for VirB8_{sp} (data not shown). Upon addition of each inhibitor at different concentrations (from 2 μ M to 2 mM) to VirB8_{sp} (180 μ M), we

observed a decrease of the fluorescence emission peak at 340 nm (See Table 2). Indeed, in most cases, we observed a quenching of $\approx 45\%$ when adding a final concentration of 2 mM of inhibitor (see supplementary figures S2, S4, S6, S8, S10, S12, S14 and S16), suggesting that all these molecules bind to VirB8sp with relatively similar affinity.

Compound name	IC ₅₀ (μM) for VirB8sp-inhibitor
B8I-2	12,98
BAR-068 ^a	14,53
BAR-069 ^a	13,96
BAR-070 ^a	6,94
BAR-071 ^a	5,56
BAR-072 ^a	17,50
BAR-073 ^a	7,8
BAR-074 ^a	9,9

Table 2. Titration of B8I-2 derivatives against VirB8sp monomer in vitro. The IC₅₀ values obtained direct titrations of derivatives of B8I-2 against VirB8_{sp} in Tris, NaCl buffer at pH=8 are presented. All IC₅₀ values are in μM. B8I-2 was used as a positive control; (a) Names of all synthesized derivatives from B8I-2 scaffold; All curves associated with the above are presented in supplementary data (Figures S4, S6, S8, S10, S12, S14 and S16).

III.2.4.6. Conformational changes upon binding of BAR-068 to VirB8

The possibility of conformational alterations of the protein upon formation of complexes with VirB8_{sp} and BAR-068 was investigated using UV/Visible difference spectroscopy. Unlike most analytical methods, which are separative and thus allow for quantification of isolated protein, spectra are a convolution of all of the components of a sample. Changes in the sample spectrum are determined relative to a spectrum of a reference state: we used the spectra of VirB8_{sp} alone and of BAR-068 as references. As demonstrated several times in the literature, UV/visible difference spectroscopy can assess structural changes to the protein in the solid state [30, 31]. After 30 minutes of incubation, the protein-minus-inhibitor difference spectrum showed maxima at 280 nm, 340 nm, 400 nm, and a broad shoulder at 500 nm. After adding a concentration of 10 μ M of BAR-068, the absorbance at 280 nm (A_{280}) decreased until reaching a stable baseline with no further change observed for up to at least 30 min (Figure 8). When reaching a concentration of 50 μ M, the A_{280} decreased to \approx 15% of the original intensity with apparition of maxima at 340 and 400 nm until reaching a baseline (Figure 8). Since the maximum at 280 nm is typical of proteins, the decrease in the absorption at this wavelength can indicate several phenomena such as: conformational changes in the protein (a) due to the formation of a complex upon binding of the inhibitor or (b) due the environmental changes caused by the addition of BAR-068 (10% DMSO final percentage in cuvette). As a control, we also added 10% DMSO in presence of VirB8_{sp} which showed that the presence of the DMSO did not affect the overall environment of the protein. In addition to the decrease in A_{280} of the protein, we observe an increase of the value of the absorbance at longer wavelength depending on the concentration of BAR-068 added, suggesting that the complex VirB8_{sp}-BAR-068 is concentration dependant. Changes in the UV absorbance are evident. The difference spectrum highlights the changes at 280, 340 and 400 nm (Figure 8). The latter indicates perturbations of several chromophores upon formation of the complex when considering a broad range wavelength scan (200 nm to 800 nm).

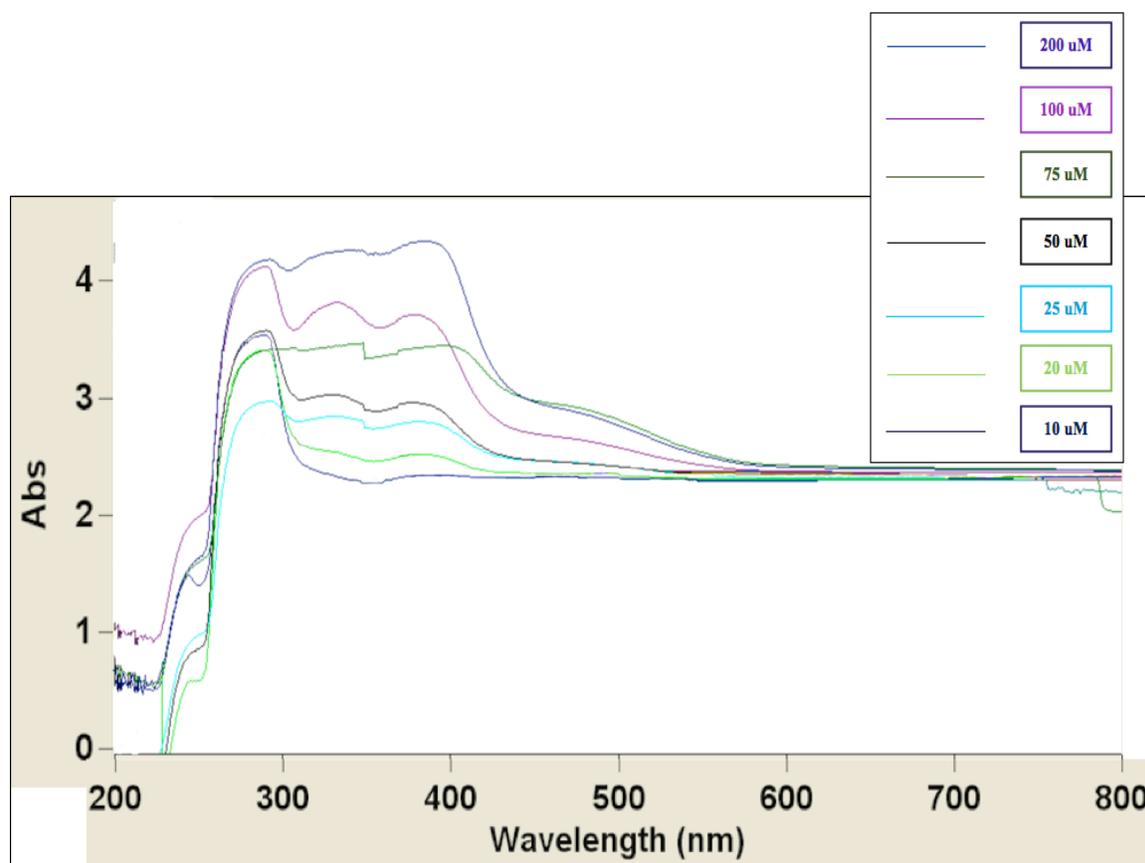


Figure 8. Absorption spectra of VirB8_{sp} before and after exposure to increasing concentration of inhibitors. The difference spectrum of VirB8_{sp} (3.2 mg/ml) in presence of BAR-068 was recorded under aerobic conditions at 26°C and after mixing the cuvette contents for 30 min. This difference spectrum is the end result after subtraction of the spectrum of BAR-068 and the VirB8_{sp} spectrum alone.

III.2.4.7. Cross-linking analysis of VirB8-BAR-068 interaction

As an alternative method to evaluate binding of VirB8_{sp} (at concentration of 180 μ M) to BAR-068, we applied the cross-linking agent disuccinimidyl suberate (DSS) to the mixture of VirB8_{sp}-BAR-068, followed by SDS-PAGE analysis. As previously shown [13], application of different concentrations of DSS (25 μ M to 1 mM) to VirB8_{sp} led to the formation of higher molecular mass complexes, indicating the formation of homomultimers. As a positive control, we reproduced the aforementioned experiment and we were able to obtain similar results [13] (data not shown). Once the optimal concentration of DSS was chosen (50 μ M), we conducted the same experiment with increasing concentration of inhibitor from 50 μ M to 50 mM (Figure 9A) and we observed slight changes of the cross-linking patterns. Novel complexes appeared when VirB8_{sp} was cross-linked in the presence of BAR-068. However, the SDS-PAGE analysis did not provide conclusive results that could help us evaluate clearly if BAR-068 was able to inhibit the DSS-induced homomultimer formed by VirB8_{sp} at dimeric concentrations. Next, we quantified each signal obtained on the SDS-PAGE in order to evaluate the efficiency of inhibition of BAR-068 (Figure 9B). This analysis suggests that in presence of DSS and of higher concentrations of inhibitor (i.e. 50 mM), the complex was reduced by approximately 40% as compared to VirB8_{sp} in presence of DSS alone.

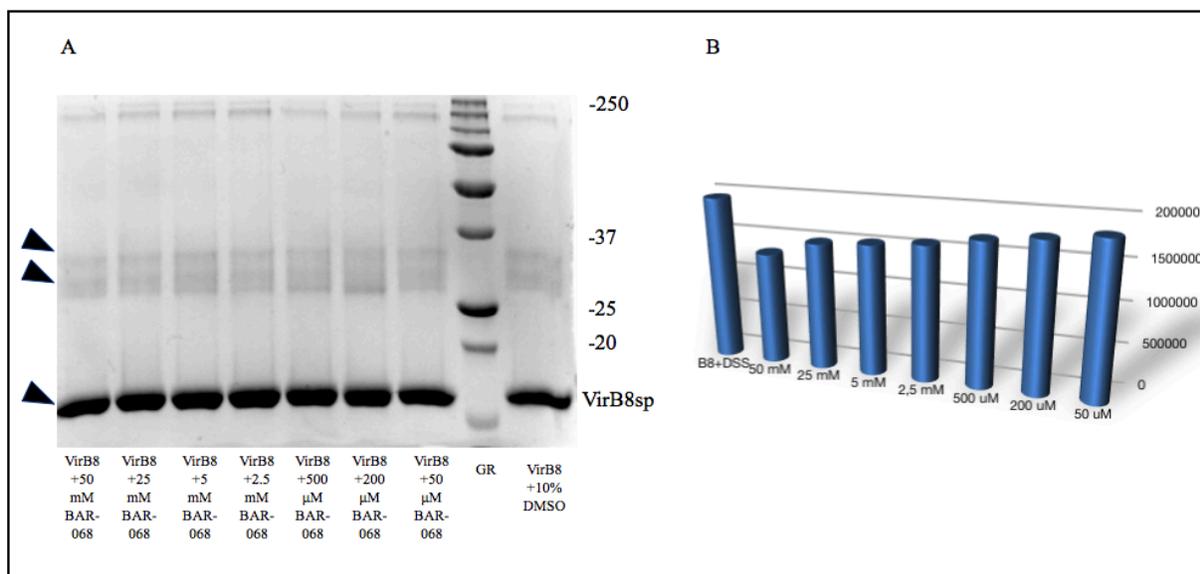


Figure 9. Cross-linking experiments show effects of BAR-068 on dimerization of VirB8_{sp}. Analyses were performed by SDS-PAGE. (A) Mixtures of VirB8_{sp} (180 μM) were incubated with DSS (50 μM) and with increasing concentrations of the inhibitor BAR-068 (50 μM to 50 mM) prior to SDS-PAGE. Arrows indicate monomeric proteins and cross-linking products. Molecular masses of reference proteins are shown on the right (in kDa). (B) Quantification of signals obtained after cross-linking of VirB8_{sp} in presence of BAR-068 using BioRad software to check density of each band presented.

III.2.5. Discussion

Here, we present the results of a structure-inspired structure-activity-relationship (SAR) approach aimed at identifying a potential hotspot of interaction between VirB8 and VirB10, and also T4SS inhibitors targeting the dimerization of one of its key dynamic components: VirB8. The latter was conducted in two steps:

(a) First, we identified amino acids which are required for VirB8 heterodimerization with VirB10. As a consequence, they may be important for virulence. In this study, the exploration of the VirB8 interaction with VirB10 was taken a step further by analysing the ability of VirB8 variants to interact with VirB10. The periplasmic domain of VirB8 from *B. suis* was previously crystallized and consists of β -sheets and five α -helices [12]. The dimer interface comprises α -helix number 1 with amino acids M102 and Y105 [1]. We found, using the BTH assay and phage display analysis, that the VirB8-VirB10 interaction interface is located on the exposed β -sheet surface and changes in R160, S162, T164 and I165 reduced their association. Therefore, the dimerization interface comprising R160, S162, T164, I165 and T201 interface is involved in interaction with VirB10.

(b) Despite the intriguing role of VirB8 in the T4SSs, we are the only research group who has tried to find inhibitors against its dimerization and who has tried to validate their effects *in vivo*. Despite our interest, the lack of potent, specific and soluble inhibitors has clearly hindered the exploitation of VirB8 as drug targets.

Based on a structurally well-characterized target [1, 2, 12], we conducted several inhibition studies in order to identify compounds that interfere with interactions which are required for T4SS function. This approach may facilitate future development of more potent small-molecules through iterations of chemical synthesis, followed by functional assays and structural analysis of VirB8-inhibitor complexes. The SAR approach advanced in this work, analyzed the effect of seven potential inhibitors. They are derivatives from the B8I-2 scaffold, on VirB8 homo- and heterodimerization and were tested also on VirB10 homodimerization as negative control. Previously, B8I-2 was selected as a lead compound, because of its potential ability to penetrate

the cells due to its significant impact on the intracellular growth of *B. abortus* 2308 in macrophages [2]. We successfully reproduced previously obtained results that showed the effect of B8I-1 and B8I-2 on the dimerization of VirB8 with itself and with VirB10 [1, 2]. Based on B8I-2 scaffold, we designed seven derivatives in order to obtain better potency and solubility. We identified 5 inhibitors acting as specific inhibitors of VirB8 interactions. Based on our results, a notable exception was molecule BAR-068, which inhibited VirB8 interactions in the BTH assay with promising values of EC_{50} (2.2 nM). This contributes a remarkable 1000-fold increase in capacity against VirB8 in the BTH assay compared to B8I-2 *in vivo* (2.35 μ M) [1, 2] (Table 1). This has been achieved by the interchange of a hydrogen by a chlorine atom, which apparently offered better binding affinities. Aside from BAR-068, we also characterized other four other small-molecule inhibitors with interesting inhibition potency *in vivo*, but lesser effect than BAR-068 against VirB8 homodimerization. The most notable changes in activity were observed when we added an atom from the halogen family to the para position on the LHS, which led to an increase of activity in comparison to B8I-2 (Table 1; Figure 6; Figure S3, S7, S9, S13 and S15). This could suggest that at this position, the halogen atoms increase electron withdrawing from the LHS –OH and as a consequence may increase the strength of binding. In contrast, an atom from the halogen family positioned on the meta position on the LHS of the derivative resulted in inactive molecules (see molecule BAR-069; Figure S5). This suggests that an optimal N-N hydrazide distance, in conjunction with a para-substituted halogen hydroxybenzamide moiety and an optimal orientation of the nitro group may be required for activity *in vivo*. In addition, replacement of a iodine (BAR-070) by a fluorine (BAR-071) also showed better results in terms of inhibition of VirB8 homodimerization. This seems surprising as the electronegativity (EN) of each of these atoms follow this ranking : $EN_{\text{Fluor}} > EN_{\text{Chloride}} > EN_{\text{Iodine}}$, which normally would infer that BAR-071 would have a greater electron-withdrawing power from the LHS –OH group than BAR-068. However, this is only confirmed when looking at the inhibition potency of BAR-068 compared to that of BAR-070. Even though these results seems counterintuitive, we can hypothesize that the replacement of a hydrogen bond (B8I-2) by an atom belonging to the halogen group led to better results in terms of inhibition of VirB8 interactions *in vivo*. Although halogen bonds are known as weak bonds, we can conclude that they still enable specific

interactions that can lead to clear gains in terms of binding affinity *in vivo*. In parallel, the substitution on the RHS of the -NO₂ group by a -Cl yielded two molecules with activity similar to that of B8I-2 in the BTH assay. However, when we compare -NO₂ molecules with a -NO₂ and with a -Cl at the same position in the RHS, we observe that *in vivo* activities are in the same range in terms of EC₅₀. This suggests that the substitution of a -NO₂ by a -Cl does not change the activity of the inhibitor in the BTH assay.

We also conducted fluorescence spectroscopy experiments in order to determine *in vitro* ligand interactions with VirB8_{sp} (see Table 2 and Annexe). All of our *in vitro* experiments were realized on a truncated VirB8 (VirB8_{sp}) with concentrations corresponding to the dimer version of VirB8 and in a controlled environment. We observe that the high-affinity compounds are more efficient *in vivo* compared to their lower affinity binding *in vitro*. This discrepancy could be due to the fact that the BTH assay is conducted with the full-length version of VirB8 and in a cell compartment containing many other factors that could affect VirB8 interactions. Alternatively, *in vivo*, the effective inhibitor BAR-068 may be able to bind other targets in addition to the inhibition of VirB8_{FL}.

Because of the magnitude of the fluorescence quench observed when adding B8I-2 derivatives to VirB8_{sp} (data not shown), we proceeded to the titration of its fluorescence signal in presence of each small-molecule (see Table 2 and Annexe). The titration of VirB8_{sp} in the presence of BAR-068 revealed a moderate binding with a $K_D \approx 9.68 \mu\text{M}$ and an approximate 1:1 stoichiometry (Table 2 and Figure S4). From our results, we conclude that all of B8I-2 derivatives (including B8I-2) are binding according to a model which satisfies the 1:1 binding model. We then proceeded by using crosslinking and difference spectrum techniques in order to evaluate the conformational changes induced by BAR-068 upon binding to VirB8_{sp} (Figures 8 and 9). We only presented a range of concentrations for BAR-068 from 50 μM and 50 mM and not under, because at lower concentrations we could not see any noticeable changes. Even though we were able to show that the addition of increasing concentrations of BAR-068 induced conformational changes, we were not able to prove that BAR-068 was able to inhibit or even destabilize the

homomultimer formed by VirB8 using crosslinking. Consequently, *in vitro*, BAR-068 seems to be able to inhibit the dimerization of VirB8_{sp} at higher concentration. However, the concentrations used here are high and may be toxic *in vivo* for the cell. This could lead to the conclusion that the binding between BAR-068 and VirB8_{sp} may occur but in a transient manner as it requires higher concentration of inhibitor to see an effect. Therefore, as our *in vitro* experiments did not clearly outline generally improved inhibitory properties for the derivatives of B8I-2, we need to further investigate their effects on VirB8_{sp} dimer with other biochemical studies.

The molecule BAR-068 is the most promising inhibitor resulting from these studies, and several features underline this conclusion. First, the BAR-068 structure derives from B8I-2, which is a salicylidene acylhydrazide and is structurally similar to a class of molecules that have broad-spectrum activity against T3SS [8]. Salicylidene acylhydrazides are a class of small-molecules that can inhibit the T3SS even if it does not contain VirB8 homologs that could serve as target. However, the T3SS target could have structural similarities to VirB8, and it would therefore be interesting to test the effect of BAR-068 on the T3SS. Second, BAR-068 was identified based on its specific activity against one common target in the T4SSs: VirB8. It is very unlikely that it inhibits different alternative targets, but it is plausible that the interaction with VirB8 inhibits the dimer formation (VirB8-VirB8 and VirB8-VirB10), and as a consequence, other T4SS components do not assemble properly and are destabilized. We focused the study presented in this work on BAR-068 since it obtained the best results in terms of *in vivo* inhibition efficiency. As previously shown, we know that the BTH assay also monitors the homodimerization of VirB8 and VirB10 and the formation of VirB8-VirB10 heterodimers so they served as controls for inhibitor specificity during the course of the study (Table 2). Although the BTH assay provides a useful tool for *in vivo* screening and quantitative analysis of inhibitor potency, the results reflect the sum of different processes, including inhibitor diffusion across the outer membrane and stability inside the cell. Consequently, the efficacy of an inhibitor, its effective direct binding to the targeted protein and its respective target concentration within the cell are not well defined,

which in turn limits the quantitative analyses of inhibitor binding that are required for a SAR analysis.

In summary, the work described here may lead to the development of other inhibitors based on BAR-068 framework and thereby advance the understanding of inhibition of T4SS in *B. suis*.

In conclusion, using a SAR approach in a cell-based assay, we have isolated more potent inhibitors that may serve as potential leads for the development of antivirulence drugs. The development of more effective biochemical assays to measure target interaction and structural studies are the next steps required on the path to drug development. Given the abundance of structural information on secretion systems, similar approaches to identify inhibitors of type III or other secretion systems should discover molecules that are suitable for drug development in future. In addition to their potential as drugs, secretion system inhibitors could prove to be valuable tools for investigating the mechanisms of secretion systems or the time course of T4SS activity during infection [5].

III.2.6. Experimental procedures

Bacterial growth conditions

Escherichia coli strain JM109 was used as the host for cloning, and strain BTH101 was used for bacterial two-hybrid (BTH) assays in LB or phosphate-buffered tryptone-glucose-yeast extract-phosphate (TGYPE) medium, as indicated [2, 27].

Plasmid, Strain Constructions, and Mutagenesis.

Plasmids for bacterial two-hybrid assays were constructed using standard procedures, and assays were conducted as described previously [16] DNA manipulations followed standard procedures [33]. Site-directed mutagenesis and Alanine scanning were performed using

pUT18CVirB8 and pKT25VirB8 as a templates for inverse polymerase chain reaction (PCR) (See Table S2 in supplementary data) [34]. Here, the use of overlapping sequences of PCR primers along with DpnI treatment of the PCR product at 37 °C for 1 h allowed direct cloning in *E. coli* without the need for ligation.

Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS–PAGE) and Western Blotting.

Cells and protein samples were incubated in Laemmli sample buffer (SB) for 5 min at 100 °C, followed by SDS–PAGE [35-37]. Western blotting was performed following standard protocols with VirB protein-specific antisera[13].

Growth of cultures and reporter enzyme assay

The quantification of the functional complementation mediated by interaction between two proteins was obtained by measuring β -galactosidase activities in liquid cultures. Cultures of the *cya*-deficient strain BTH101 [19] containing the appropriate vectors were cultivated by shaking (200 rpm) at 25°C during 16 hours in 3 ml TGYEP medium supplemented with the appropriate amount of antibiotics (100 μ g/ml ampicillin and 50 μ g/ml kanamycin) and 1 mM isopropyl- β -d-thiogalactopyranoside to induce expression of the T18 and T25 fusion proteins. The β -galactosidase activities were measured from 20 μ l culture incubated with 80 μ l Z buffer (0.06 M Na₂HPO₄·7H₂O, 0.04 M NaH₂PO₄·H₂O, 0.01 M KCl, 0.001 M MgSO₄) containing 8 mg/ml 2-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, 0.01% SDS, and 50 mM β -mercaptoethanol (modified from reference [19]). The reaction mixtures were incubated for 0.5 h at room temperature, and the reactions were stopped with 100 μ l 1 M Na₂CO₃. The end products were measured at 420 nm and 550 nm with an Envision plate Reader (Molecular Devices) plate reader. Specific activity was calculated as follows: Miller units = $[\text{OD}_{420} - (1.75 \times \text{OD}_{550})]/[t \times \text{OD}_{600} \times (\text{volume in ml})] \times 1,000$, where OD₆₀₀ is the optical density at 600 nm after 12 h of incubation and *t* is the time needed for color formation.

Bacterial two hybrid assay in presence of inhibitor

Plasmids pUT18CB8 and pKT25B8 (positive control) and pUTC18VirB8 and pKT25 empty (negative control) were freshly transformed into strain BTH101 and used to inoculate the overnight cultures for screening in TGYEP medium (100 µg/ml ampicillin and 50 µg/ml kanamycin). The 96-well plates were pre-filled in the wells of columns 3 to 12 with 3 µl of 1 mM the different compound solutions to be tested dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (15 µM final concentration); the wells of columns 1 and 2 were filled with 3 µl of pure DMSO and were used for the negative and positive controls without compounds. TGYEP medium supplemented with 1 mM isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside (IPTG) and antibiotics as described above was inoculated with the appropriate overnight cultures to an OD₆₀₀ of 0.05 and immediately added in a volume of 0.2 ml to the predetermined wells of 96-well plates with the compounds to give a 15 µM final concentration or with 3 µl of DMSO for positive and negative controls. OD readings of the 96-well plates at 420, 550, and 600 nm were subsequently collected in the Envision plate reader (Molecular Devices). The plates were incubated standing at 37°C for 12 h, and 20 µl of the cultures was subsequently transferred to a new empty 96-well plates, followed by determination of the β-galactosidase activity, as described above, in duplicate.

The data analysis was performed in Microsoft Excel and GraphPad Prism software. The wells containing the positive and negative controls were used to determine the relative activities per plate and to calculate the activity values for each well containing the compounds.

BTH assay, Dose response Determination of EC₅₀ Values

EC₅₀ determinations were performed as above with strain BTH101 freshly transformed with pUT18CB8 and pKT25B8 (or pUT18CVirB8 and pKT25VirB10 and also pUT18CVirB10 and pKT25VirB10 depending on the assay conducted), and the compounds were added at concentrations of 2 nM to 2 mM. Data analysis was conducted with the use of GraphPad Prism. Specific activity was calculated as follows: Miller units = $[\text{OD}_{420} - (1.75 \times \text{OD}_{550})] / [t \times \text{OD}_{600} \times$

(volume in ml)] \times 1,000, where OD_{600} is the optical density at 600 nm after 12 hours of incubation and t is the time needed for colour formation.

Chemical cross-linking

5 μ l each of 10 pmol/ μ l stock solutions of purified VirB8sp in phosphate buffer were mixed for 5 min at 22°C, 90 μ l of CLB (50 mM MES-KOH, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 6.5) were added, and the mixture was incubated for 30 min at RT. The cross-linking agent disuccinimidyl suberate (DSS) (10 mM stock in DMSO) was added in different concentrations (25 μ M and 1 mM), and the samples were incubated for 1 h at 22 °C, followed by the addition of 1 volume of Laemmli sample buffer and analysis by SDS-PAGE as previously shown [13, 32].

Docking Simulation experiments

Haddock software [38] was used to add polar hydrogen to the VirB8sp subunit A structure of PDB code 2BHM [12]. The docking was performed with HADDOCK 2.2 with calculation of the average relative solvent-accessible surface area for each residue using NACCESS (<http://wolf.bms.umist.ac.uk/naccess/>). The docking was performed following the standard HADDOCK 2.2 protocols during the semiflexible simulated annealing part of the protocol rather than during the rigid-body energy minimization. Rotational minimization was allowed in the initial rigid body energy minimization to allow the molecules to face each other properly prior to docking. The 200 solutions from the rigid-body energy minimization were then subjected to the standard semiflexible simulated annealing (SA) in torsion angle space in HADDOCK 2.2, but with an increased number of integration steps to allow for the docking during the simulated annealing part. This part consisted of the following a rigid-body molecular dynamics search (12,000 steps at 2000 K) followed by a semiflexible simulated annealing, during which side chains at the interface are free to move (2000 steps from 2000 to 50 K).

UV/Visible Difference Spectroscopy

Absorbance spectra were measured using a Cary Varian spectrophotometer at 20°C. Tris, NaCl buffer pH=8 was used for the titration assay. Absorbance spectra were measured by a method described previously [39]. Absorption spectra were scanned between 200 and 800 nm and recorded as a function of time. Measurements were initiated by the addition of inhibitors at various final concentrations (20 μ M-200 μ M) to Tris buffer containing a fixed concentration of VirB8sp (180 μ M). The measured absorption spectra of the protein- complex were corrected for absorption by DMSO, buffer, inhibitor, and VirB8 alone. The resulting difference absorption spectra were used to verify the formation of the complex VirB8-inhibitor and to measure the effect of increasing concentrations of inhibitors on the absorbance spectra.

Protein biochemical work

VirB8 was overproduced and purified as described previously [13].

III.2.7 Acknowledgments

We thank the coworkers of the Université de Montréal laboratory, especially Benoît Bessette, for assistance and consultation. We thank Durga Sivanesan for assistance with BTH assay and consultation. We thank our collaborators from Dr. Pierre Lavallée for the synthesis of B8I-2 small-molecule derivatives. This work was supported by grants to Christian Baron from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-64300 and MOP-84239), the Groupe d'Études des Protéines Membranaires (funded by the Fonds de Recherche du Québec-Santé), the Canada Foundation for Innovation, and the Fonds de Recherche du Québec-Santé.

Bibliographie de l'article

1. Smith MA, Coincon M, Paschos A, Jolicoeur B, Lavallee P, Sygusch J, Baron C: Identification of the binding site of *Brucella* VirB8 interaction inhibitors. *Chemistry & biology* 2012, 19(8):1041-1048.
2. Paschos A, den Hartigh A, Smith MA, Atluri VL, Sivanesan D, Tsolis RM, Baron C: An in vivo high-throughput screening approach targeting the type IV secretion system component VirB8 identified inhibitors of *Brucella abortus* 2308 proliferation. *Infect Immun* 2011, 79(3):1033-1043.
3. Levy SB, Marshall B: Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 2004, 10(12 Suppl):S122-129.
4. Walsh C: Where will new antibiotics come from? *Nat Rev Microbiol* 2003, 1(1):65-70.
5. Hughes D: Exploiting genomics, genetics and chemistry to combat antibiotic resistance. *Nat Rev Genet* 2003, 4(6):432-441.
6. Hung DT, Shakhnovich EA, Pierson E, Mekalanos JJ: Small-molecule inhibitor of *Vibrio cholerae* virulence and intestinal colonization. *Science* 2005, 310(5748):670-674.
7. Felise HB, Nguyen HV, Pfuetzner RA, Barry KC, Jackson SR, Blanc MP, Bronstein PA, Kline T, Miller SI: An inhibitor of gram-negative bacterial virulence protein secretion. *Cell Host Microbe* 2008, 4(4):325-336.
8. Keyser P, Elofsson M, Rosell S, Wolf-Watz H: Virulence blockers as alternatives to antibiotics: type III secretion inhibitors against Gram-negative bacteria. *J Intern Med* 2008, 264(1):17-29.
9. Kauppi AM, Nordfelth R, Uvell H, Wolf-Watz H, Elofsson M: Targeting bacterial virulence: inhibitors of type III secretion in *Yersinia*. *Chem Biol* 2003, 10(3):241-249.
10. Muschiol S, Bailey L, Gylfe A, Sundin C, Hultenby K, Bergstrom S, Elofsson M, Wolf-Watz H, Normark S, Henriques-Normark B: A small-molecule inhibitor of type III secretion inhibits different stages of the infectious cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(39):14566-14571.
11. Nordfelth R, Kauppi AM, Norberg HA, Wolf-Watz H, Elofsson M: Small-molecule inhibitors specifically targeting type III secretion. *Infect Immun* 2005, 73(5):3104-3114.
12. Terradot L, Bayliss R, Oomen C, Leonard GA, Baron C, Waksman G: Structures of two core subunits of the bacterial type IV secretion system, VirB8 from *Brucella suis* and ComB10 from *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(12):4596-4601.
13. Paschos A, Patey G, Sivanesan D, Gao C, Bayliss R, Waksman G, O'Callaghan D, Baron C: Dimerization and interactions of *Brucella suis* VirB8 with VirB4 and VirB10 are required for its biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(19):7252-7257.
14. Baron C: VirB8: a conserved type IV secretion system assembly factor and drug target. *Biochem Cell Biol* 2006, 84(6):890-899.
15. Mayrose I, Penn O, Erez E, Rubinstein ND, Shlomi T, Freund NT, Bublil EM, Ruppin E, Sharan R, Gershoni JM *et al*: Pepitope: epitope mapping from affinity-selected peptides. *Bioinformatics* 2007, 23(23):3244-3246.

16. Sivanesan D, Hancock MA, Villamil Giraldo AM, Baron C: Quantitative analysis of VirB8-VirB9-VirB10 interactions provides a dynamic model of type IV secretion system core complex assembly. *Biochemistry* 2010, 49(21):4483-4493.
17. Villamil Giraldo AM, Sivanesan D, Carle A, Paschos A, Smith MA, Plesa M, Coulton J, Baron C: Type IV secretion system core component VirB8 from *Brucella* binds to the globular domain of VirB5 and to a periplasmic domain of VirB6. *Biochemistry* 2012, 51(18):3881-3890.
18. Bourg G, Sube R, O'Callaghan D, Patey G: Interactions between *Brucella suis* VirB8 and its homolog TraJ from the plasmid pSB102 underline the dynamic nature of type IV secretion systems. *J Bacteriol* 2009, 191(9):2985-2992.
19. Karimova G, Ullmann A, Ladant D: A bacterial two-hybrid system that exploits a cAMP signaling cascade in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 2000, 328:59-73.
20. Dominguez C, Boelens R, Bonvin AM: HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J Am Chem Soc* 2003, 125(7): 1731-1737.
21. de Vries SJ, van Dijk AD, Krzeminski M, van Dijk M, Thureau A, Hsu V, Wassenaar T, Bonvin AM: HADDOCK versus HADDOCK: new features and performance of HADDOCK2.0 on the CAPRI targets. *Proteins* 2007, 69(4):726-733.
22. Eswar N, Eramian D, Webb B, Shen MY, Sali A: Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol* 2008, 426:145-159.
23. Banta LM, Kerr JE, Cascales E, Giuliano ME, Bailey ME, McKay C, Chandran V, Waksman G, Christie PJ: An *Agrobacterium* VirB10 mutation conferring a type IV secretion system gating defect. *J Bacteriol* 2011, 193(10):2566-2574.
24. Chandran Darbari V, Waksman G: Structural Biology of Bacterial Type IV Secretion Systems. *Annu Rev Biochem* 2015, 84:603-629.
25. Fronzes R, Schafer E, Wang L, Saibil HR, Orlova EV, Waksman G: Structure of a type IV secretion system core complex. *Science* 2009, 323(5911):266-268.
26. Chandran V, Fronzes R, Duquerroy S, Cronin N, Navaza J, Waksman G: Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature* 2009, 462(7276): 1011-1015.
27. Karimova G, Dautin N, Ladant D: Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J Bacteriol* 2005, 187(7):2233-2243.
28. Sivanesan D, Baron C: The dimer interface of *Agrobacterium tumefaciens* VirB8 is important for type IV secretion system function, stability, and association of VirB2 with the core complex. *J Bacteriol* 2011, 193(9):2097-2106.
29. ALBANI JR: Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy: Blackwell Science, a Blackwell Publishing company; 2007.
30. J.R. L: Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed. edn. Berlin/ Heidelberg, Germany; 2006.
31. Ghisaidoobe AT, van den Berg RJ, Butt SS, Strijland A, Donker-Koopman WE, Scheij S, van den Nieuwendijk AM, Koomen GJ, van Loevezijn A, Leemhuis M *et al*: Identification and development of biphenyl substituted iminosugars as improved dual

- glucosylceramide synthase/neutral glucosylceramidase inhibitors. *J Med Chem* 2014, 57(21):9096-9104.
32. Yuan Q, Carle A, Gao C, Sivanesan D, Aly KA, Hoppner C, Krall L, Domke N, Baron C: Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *J Biol Chem* 2005, 280(28):26349-26359.
 33. Maniatis TA, Fritsch, E.F., J. and Sambrook, J.: Molecular Cloning : A laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 1982.
 34. Ansaldi M, Lepelletier M, Mejean V: Site-specific mutagenesis by using an accurate recombinant polymerase chain reaction method. *Anal Biochem* 1996, 234(1):110-111.
 35. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227(5259):680-685.
 36. Schagger H: Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* 2006, 1(1):16-22.
 37. Schagger H, von Jagow G: Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 1987, 166(2):368-379.
 38. Morris GM, Huey R, Olson AJ: Using AutoDock for ligand-receptor docking. *Curr Protoc Bioinformatics* 2008, Chapter 8:Unit 8 14.
 39. Dax C, Coincon M, Sygusch J, Blonski C: Hydroxynaphthaldehyde phosphate derivatives as potent covalent Schiff base inhibitors of fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *Biochemistry* 2005, 44(14):5430-5443.

IV. Discussion

IV.1. Retour sur les résultats de l'article

Dans l'ensemble, les résultats et les expériences présentés dans ce mémoire donnent de nouvelles perspectives pour de futurs travaux. En effet, nous avons obtenu des résultats prometteurs en termes d'identification des domaines impliqués dans l'interaction entre VirB8 et VirB10. Pour ce faire, nous avons utilisé deux méthodes complémentaires : le *phage display* et l'essai à deux hybrides bactérien. Les résultats obtenus nous ont permis de confirmer un site d'interaction VirB8-VirB10 tout en précisant les déterminants de l'interaction au niveau d'un feuillet β . VirB8 est un excellent modèle pour l'analyse des facteurs d'assemblage, mais elle peut aussi être considérée comme une cible pour les molécules inhibitrices qui priveraient les bactéries utilisant le T4SS pour leur virulence. Nous sommes le seul groupe dans le monde à avoir développé des techniques biochimiques de quantification qui permettent de mieux comprendre et d'analyser les interactions transitoires existant entre les différentes protéines des T4SSs. Nous avons utilisé un ensemble de techniques de biochimie et de bio-informatique afin de comprendre la dynamique des interactions entre les protéines de type VirB. Nous sommes aussi les premiers à avoir utilisé une méthode basée sur la structure de la cible visée afin d'identifier les inhibiteurs potentiels de ces mêmes interactions. Les résultats présentés dans ce mémoire nous ont permis d'identifier un inhibiteur plus puissant des interactions de VirB8. Nous avons réussi à montrer que son action est spécifique à une cible essentielle à l'établissement du T4SS : VirB8. De par l'utilisation de méthodes biochimiques *in vitro*, nous avons aussi démontré que la liaison entre VirB8 et BAR-068 s'effectue et que celle-ci est dépendante de la concentration de l'inhibiteur. Bien que les résultats *in vivo* et *in vitro*, ne soient pas du même ordre en termes de pouvoir d'inhibition, ceux-ci suggèrent l'existence d'une inhibition *in vivo*. Enfin, l'analyse structure-fonction des T4SSs ouvre de nouvelles opportunités en termes de développement de nouveaux inhibiteurs avec des applications thérapeutiques potentielles. Les molécules capables d'inhiber l'association des facteurs de virulence du T4SS, pourraient «désarmer» les mécanismes importants nécessaires à la mise en place de la virulence sans pour

autant tuer la bactérie. Ceci fait des inhibiteurs du T4SS des candidats attrayants pour le développement d'une nouvelle classe d'inhibiteurs antimicrobiens.

IV.2. Travaux futurs et conclusion

Les résultats obtenus par le *Phage Display* et l'essai à deux hybrides nous ont permis de déterminer un domaine d'interaction entre VirB8 et VirB10. Cependant, la stoechiométrie d'interactions existant entre ces partenaires VirB demeure toujours inconnue. Pour poursuivre l'analyse structurale présentée ici, il serait intéressant d'utiliser la Spectroscopie de corrélation de fluorescence afin de quantifier les interactions existants entre VirB8 et VirB10. Avant toute mesure, une des protéines d'intérêt est étiquetée à l'aide un colorant fluorescent tandis que l'autre demeure sans étiquetage. Après interaction en solution, les données obtenues permettent d'évaluer la portion de protéine étiquetée qui a interagi avec la protéine non étiquetée. Cette méthode quantitative permettrait de mesurer une valeur de K_D entre VirB8 et VirB10, d'étudier la dynamique de liaison au cours du temps mais aussi d'évaluer la taille des complexes formés afin de déduire la stoechiométrie d'assemblage. Ces résultats pourraient aussi être exploités pour mieux comprendre la séquence d'assemblage de VirB8 avec les autres protéines VirB du T4SS. Les résultats de mutagenèse présentés dans ce manuscrit constituent une méthode alternative de déstabilisation de l'assemblage de la machinerie du T4SS.

Par ailleurs, les résultats prometteurs obtenus suite à la mesure du pouvoir inhibiteur *in vivo* de 5 dérivés de B8I-2 se présentent aussi comme une méthode alternative de déstabilisation du T4SS. Il serait intéressant de vérifier *in vivo* si l'inhibiteur BAR-068 est capable d'atteindre et d'inhiber sa cible chez *B. suis* (Résultats en cours d'obtention). Ces résultats, une fois obtenus, nous permettraient de comparer l'effet de BAR-068 avec d'autres inhibiteurs identifiés dans d'autres systèmes de sécrétion bactériens.

Il serait intéressant de tester *in vivo* les molécules ayant le plus d'efficacité en terme d'inhibition de la dimérisation de VirB8, sur les protéines dites *VirB8-like*. Nous avons déjà

débuté cette étude en optimisant les temps d'incubation utilisé protocole expérimental présenté dans ce manuscrit [1]. Ceci nous a ainsi permis d'évaluer l'efficacité de l'inhibiteur B8I-2 sur la dimérisation de TraE_{FL} à l'aide de l'essai bactérien à deux hybrides en suivant le même protocole expérimental présenté dans ce manuscrit (Figure S17). Il serait donc intéressant de poursuivre cette études avec d'autres dérivés de B8I-2 dans les conditions expérimentales optimisées afin e déterminer si ces derniers pourraient être efficaces contre différentes cibles *VirB8-like*.

Bien que nous ayons utilisé de nombreuses techniques d'études structurales (Crystallographie par rayons X, RMN, *Surface Plasmon Resonance (SPR)* et *SAXS*) afin de déterminer le mode de liaison entre BAR-068 et VirB8_{sp}, les résultats obtenus ne nous ont pas permis d'émettre de conclusion concernant cette problématique. En effet, les nombreux problèmes liés à la solubilité et au % de DMSO utilisés pour dissoudre les composés, se sont révélés être des paramètres limitants à l'élucidation des structures des complexes à l'étude. Afin d'augmenter la solubilité des dits composés, il serait intéressant de tester différentes techniques de solubilisation notamment en présence de co-solvants (PEG ou encore propylène glycol) [156]. Ces co-solvants sont un mélange d'eau et de solvants miscibles à l'eau. Ces derniers permettent de créer un environnement pour le composé qui faciliterait sa solubilisation en solution aqueuse. Il serait donc intéressant d'appliquer cette technique de solubilisation aux différents composés dérivés de B8I-2 et de voir si elle pourrait être exploitée afin de réaliser les expériences de co-cristallisation ou encore de *SPR (Surface Plasmon Resonance)* de VirB8_{sp} en présence de petites molécules inhibitrices.

Afin d'évaluer la spécificité d'interaction avec la cible, il serait intéressant de tester BAR-068 chez d'autres T4SSs. Il serait aussi intéressant de rechercher des fragments chimiques dont la structure serait similaire à celle de BAR-068 afin de réaliser d'autres essais de co-cristallisation. En effet, malgré de nombreux essais de co-cristallisation et de *soaking* en présence de BAR-068, nous n'avons pas été en mesure d'obtenir une structure cristalline du complexe VirB8/BAR-068 (voir Annexe). Nous avons toutefois optimisé les conditions de cristallisation de VirB8_{sp} en présence de glycérol avec une haute résolution de 1.9 Å (voir Figure S18).

Dans nos travaux de recherche précédents, nous avons tenté d'utiliser différentes méthodes biochimiques afin de déstabiliser le complexe formé par la machinerie du T4SS mais aussi de comprendre les déterminants des interactions entre partenaires VirB. Cette étude représente un pas supplémentaire vers la compréhension des mécanismes d'inhibition de l'assemblage des T4SSs.

Bibliographie

1. Christie PJ, Atmakuri K, Krishnamoorthy V, Jakubowski S, Cascales E: Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol* 2005, 59:451-485.
2. Davis BD, Tai PC: The mechanism of protein secretion across membranes. *Nature* 1980, 283(5746):433-438.
3. Desvaux M, Parham NJ, Henderson IR: Type V protein secretion: simplicity gone awry? *Curr Issues Mol Biol* 2004, 6(2):111-124.
4. Markiewicz Z: Structure and functions of the periplasmic space. *Acta Microbiol Pol* 1989, 38(3-4):199-206.
5. Beveridge TJ: Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall. *Int Rev Cytol* 1981, 72:229-317.
6. Fecycz IT, Campbell JN: Mechanisms of activation and secretion of a cell-associated precursor of an exocellular protease of *Pseudomonas aeruginosa* 34362A. *Eur J Biochem* 1985, 146(1):35-42.
7. Economou A, Christie PJ, Fernandez RC, Palmer T, Plano GV, Pugsley AP: Secretion by numbers: Protein traffic in prokaryotes. *Mol Microbiol* 2006, 62(2):308-319.
8. Fronzes R, Christie PJ, Waksman G: The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 2009, 7(10):703-714.
9. Alvarez-Martinez CE, Christie PJ: Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009, 73(4):775-808.
10. Desvaux M, Hebraud M, Talon R, Henderson IR: Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol* 2009, 17(4):139-145.
11. Desvaux M, Hebraud M, Talon R, Henderson IR: Outer membrane translocation: numerical protein secretion nomenclature in question in mycobacteria. *Trends Microbiol* 2009, 17(8):338-340.
12. Saier MH, Jr.: Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *J Membr Biol* 2006, 214(2):75-90.
13. Dums F, Dow JM, Daniels MJ: Structural characterization of protein secretion genes of the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*: relatedness to secretion systems of other gram-negative bacteria. *Mol Gen Genet* 1991, 229(3):357-364.
14. Saier MH, Jr.: Families of transmembrane sugar transport proteins. *Mol Microbiol* 2000, 35(4):699-710.
15. Saier MH, Jr.: Families of proteins forming transmembrane channels. *J Membr Biol* 2000, 175(3):165-180.
16. Cianciotto NP: Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol* 2005, 13(12):581-588.
17. Rossier O, Dao J, Cianciotto NP: The type II secretion system of *Legionella pneumophila* elaborates two aminopeptidases, as well as a metalloprotease that contributes to differential infection among protozoan hosts. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74(3):753-761.

18. Peter Howard S: Assembly of the type II secretion system. *Res Microbiol* 2013, 164(6): 535-544.
19. Korotkov KV, Sandkvist M, Hol WG: The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol* 2012, 10(5):336-351.
20. Kostakioti M, Newman CL, Thanassi DG, Stathopoulos C: Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *J Bacteriol* 2005, 187(13):4306-4314.
21. Cascales E, Christie PJ: *Agrobacterium* VirB10, an ATP energy sensor required for type IV secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(49):17228-17233.
22. Cascales E, Christie PJ: The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 2003, 1(2):137-149.
23. Ding Z, Atmakuri K, Christie PJ: The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. *Trends Microbiol* 2003, 11(11):527-535.
24. Ding Z, Christie PJ: *Agrobacterium tumefaciens* twin-arginine-dependent translocation is important for virulence, flagellation, and chemotaxis but not type IV secretion. *J Bacteriol* 2003, 185(3):760-771.
25. Salmond GPC: Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 1994, 32:181-200.
26. Lessl M, D. Balzer, K. Weyrauch, and E. Lanka: The mating pair formation system of plasmid RP4 defined by RSF1010 mobilization and donor-specific phage propagation. *J Bacteriol* 1993, 175:6415-6425.
27. Grahn AM, Haase J, Bamford DH, Lanka E: Components of the RP4 conjugative transfer apparatus form an envelope structure bridging inner and outer membranes of donor cells: implications for related macromolecule transport systems. *J Bacteriol* 2000, 182(6): 1564-1574.
28. Smith EF, Townsend CO: A Plant-Tumor of Bacterial Origin. *Science* 1907, 25(643): 671-673.
29. Cascales E, Atmakuri K, Liu Z, Binns AN, Christie PJ: *Agrobacterium tumefaciens* oncogenic suppressors inhibit T-DNA and VirE2 protein substrate binding to the VirD4 coupling protein. *Mol Microbiol* 2005, 58(2):565-579.
30. Segal G, Purcell M, Shuman HA: Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(4):1669-1674.
31. Segal G, Shuman HA: Intracellular multiplication and human macrophage killing by *Legionella pneumophila* are inhibited by conjugal components of IncQ plasmid RSF1010. *Mol Microbiol* 1998, 30(1):197-208.
32. Hofreuter D, Odenbreit S, Haas R: Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol Microbiol* 2001, 41(2):379-391.
33. Hofreuter D, Karnholz A, Haas R: Topology and membrane interaction of *Helicobacter pylori* ComB proteins involved in natural transformation competence. *Int J Med Microbiol* 2003, 293(2-3):153-165.
34. Backert S, Churin Y, Meyer TF: *Helicobacter pylori* type IV secretion, host cell signalling and vaccine development. *Keio J Med* 2002, 51 Suppl 2:6-14.

35. Henderson IR, Cappello R, Nataro JP: Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion. *Trends Microbiol* 2000, 8(12):529-532.
36. Leo JC, Grin I, Linke D: Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2012, 367(1592):1088-1101.
37. Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D: Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004, 68(4):692-744.
38. Thanassi DG, Hultgren SJ: Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol* 2000, 12(4):420-430.
39. Junker M, Besingi RN, Clark PL: Vectorial transport and folding of an autotransporter virulence protein during outer membrane secretion. *Mol Microbiol* 2009, 71(5):1323-1332.
40. Cascales E, Cambillau C: Structural biology of type VI secretion systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2012, 367(1592):1102-1111.
41. Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson WC, Heidelberg JF, Mekalanos JJ: Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(5):1528-1533.
42. Silverman JM, Brunet YR, Cascales E, Mougous JD: Structure and regulation of the type VI secretion system. *Annu Rev Microbiol* 2012, 66:453-472.
43. Das S, Chaudhuri K: Identification of a unique IAHP (IcmF associated homologous proteins) cluster in *Vibrio cholerae* and other proteobacteria through in silico analysis. *In Silico Biol* 2003, 3(3):287-300.
44. Costa TR, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M, Waksman G: Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* 2015, 13(6):343-359.
45. Ma LS, Lin JS, Lai EM: An IcmF family protein, ImpLM, is an integral inner membrane protein interacting with ImpKL, and its walker a motif is required for type VI secretion system-mediated Hcp secretion in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 2009, 191(13):4316-4329.
46. Leiman PG, Basler M, Ramagopal UA, Bonanno JB, Sauder JM, Pukatzki S, Burley SK, Almo SC, Mekalanos JJ: Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106(11):4154-4159.
47. Delepelaire P: Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1694(1-3):149-161.
48. Buttner D, Bonas U: Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J* 2002, 21(20):5313-5322.
49. Cornelis GR, Van Gijsegem F: Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* 2000, 54:735-774.

50. Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, Galan JE, Aizawa SI: Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 1998, 280(5363):602-605.
51. Cordes FS, Komoriya K, Larquet E, Yang S, Egelman EH, Blocker A, Lea SM: Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *J Biol Chem* 2003, 278(19):17103-17107.
52. Blocker A, Holden D, Cornelis G: Type III secretion systems: what is the translocator and what is translocated? *Cell Microbiol* 2000, 2(5):387-390.
53. Kimbrough TG, Miller SI: Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97(20):11008-11013.
54. Kubori T, Sukhan A, Aizawa SI, Galan JE: Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97(18):10225-10230.
55. Troisfontaines P, Cornelis GR: Type III secretion: more systems than you think. *Physiology (Bethesda)* 2005, 20:326-339.
56. Michiels T, Wattiau P, Brasseur R, Ruyschaert JM, Cornelis G: Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infect Immun* 1990, 58(9):2840-2849.
57. Samartino LE, Enright FM: Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1993, 16(2):95-101.
58. Corbel MJ: Recent advances in brucellosis. *J Med Microbiol* 1997, 46(2):101-103.
59. Boschioli ML, Foulongne V, O'Callaghan D: Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* 2001, 4(1):58-64.
60. Gorvel JP, Moreno E: Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* 2002, 90(1-4):281-297.
61. O'Callaghan D, Cazevieille C, Allardet-Servent A, Boschioli ML, Bourg G, Foulongne V, Frutos P, Kulakov Y, Ramuz M: A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol Microbiol* 1999, 33(6):1210-1220.
62. Comerci DJ, Martinez-Lorenzo MJ, Sieira R, Gorvel JP, Ugalde RA: Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol* 2001, 3(3):159-168.
63. Celli J, de Chastellier C, Franchini DM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP: *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 2003, 198(4):545-556.
64. Willetts N, Johnson D: pED100, a conjugative F plasmid derivative without insertion sequences. *Mol Gen Genet* 1981, 182(3):520-522.
65. Sherburne CK, Lawley TD, Gilmour MW, Blattner FR, Burland V, Grotbeck E, Rose DJ, Taylor DE: The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer. *Nucleic Acids Res* 2000, 28(10):2177-2186.

66. Lessl M, Balzer D, Pansegrau W, Lanka E: Sequence similarities between the RP4 Tra2 and the Ti VirB region strongly support the conjugation model for T-DNA transfer. *J Biol Chem* 1992, 267(28):20471-20480.
67. Stachel SE, Zambryski PC: *Agrobacterium tumefaciens* and the susceptible plant cell: a novel adaptation of extracellular recognition and DNA conjugation. *Cell* 1986, 47(2): 155-157.
68. Stachel SE, Nester EW: The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J* 1986, 5(7):1445-1454.
69. Stachel SE, Zambryski PC: virA and virG control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*. *Cell* 1986, 46(3):325-333.
70. Baron C: VirB8: a conserved type IV secretion system assembly factor and drug target. *Biochem Cell Biol* 2006, 84(6):890-899.
71. Fronzes R, Schafer E, Wang L, Saibil HR, Orlova EV, Waksman G: Structure of a type IV secretion system core complex. *Science* 2009, 323(5911):266-268.
72. Low HH, Gubellini F, Rivera-Calzada A, Braun N, Connery S, Dujeancourt A, Lu F, Redzej A, Fronzes R, Orlova EV *et al*: Structure of a type IV secretion system. *Nature* 2014, 508(7497):550-553.
73. Rivera-Calzada A, Fronzes R, Savva CG, Chandran V, Lian PW, Laeremans T, Pardon E, Steyaert J, Remaut H, Waksman G *et al*: Structure of a bacterial type IV secretion core complex at subnanometre resolution. *EMBO J* 2013, 32(8):1195-1204.
74. Trokter M, Felisberto-Rodrigues C, Christie PJ, Waksman G: Recent advances in the structural and molecular biology of type IV secretion systems. *Curr Opin Struct Biol* 2014, 27:16-23.
75. Chandran V, Fronzes R, Duquerroy S, Cronin N, Navaza J, Waksman G: Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature* 2009, 462(7276): 1011-1015.
76. Eisenbrandt R, Kalkum M, Lai EM, Lurz R, Kado CI, Lanka E: Conjugative pili of IncP plasmids, and the Ti plasmid T pilus are composed of cyclic subunits. *J Biol Chem* 1999, 274(32):22548-22555.
77. Lai EM, Kado CI: Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 1998, 180(10):2711-2717.
78. Sagulenko V, Sagulenko E, Jakubowski S, Spudich E, Christie PJ: VirB7 lipoprotein is exocellular and associates with the *Agrobacterium tumefaciens* T pilus. *J Bacteriol* 2001, 183(12):3642-3651.
79. Beaupre CE, Bohne J, Dale EM, Binns AN: Interactions between VirB9 and VirB10 membrane proteins involved in movement of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. *J Bacteriol* 1997, 179(1):78-89.
80. Liu Z, Binns AN: Functional subsets of the virB type IV transport complex proteins involved in the capacity of *Agrobacterium tumefaciens* to serve as a recipient in virB-mediated conjugal transfer of plasmid RSF1010. *J Bacteriol* 2003, 185(11):3259-3269.
81. Dang TA, Zhou XR, Graf B, Christie PJ: Dimerization of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB4 ATPase and the effect of ATP-binding cassette mutations on the assembly and function of the T-DNA transporter. *Mol Microbiol* 1999, 32(6):1239-1253.

82. Gomis-Ruth FX, Moncalian G, de la Cruz F, Coll M: Conjugative plasmid protein TrwB, an integral membrane type IV secretion system coupling protein. Detailed structural features and mapping of the active site cleft. *J Biol Chem* 2002, 277(9):7556-7566.
83. Backert S, Fronzes R, Waksman G: VirB2 and VirB5 proteins: specialized adhesins in bacterial type-IV secretion systems? *Trends Microbiol* 2008, 16(9):409-413.
84. Aly KA, Krall L, Lottspeich F, Baron C: The type IV secretion system component VirB5 binds to the trans-zeatin biosynthetic enzyme Tzs and enables its translocation to the cell surface of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 2008, 190(5):1595-1604.
85. Schmidt-Eisenlohr H, Domke N, Angerer C, Wanner G, Zambryski PC, Baron C: Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 1999, 181(24):7485-7492.
86. Lai EM, Kado CI: The *Agrobacterium tumefaciens* T pilus composed of cyclic T pilin is highly resilient to extreme environments. *FEMS Microbiol Lett* 2002, 210(1):111-114.
87. Yeo HJ, Waksman G: Unveiling molecular scaffolds of the type IV secretion system. *J Bacteriol* 2004, 186(7):1919-1926.
88. Soto GE, Hultgren SJ: Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol* 1999, 181(4):1059-1071.
89. Koraimann G: Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cell Mol Life Sci* 2003, 60(11):2371-2388.
90. Mushegian AR, Fullner KJ, Koonin EV, Nester EW: A family of lysozyme-like virulence factors in bacterial pathogens of plants and animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93(14):7321-7326.
91. Bayer M, Iberer R, Bischof K, Rassi E, Stabentheiner E, Zellnig G, Koraimann G: Functional and mutational analysis of p19, a DNA transfer protein with muramidase activity. *J Bacteriol* 2001, 183(10):3176-3183.
92. Hoppner C, Carle A, Sivanesan D, Hoepfner S, Baron C: The putative lytic transglycosylase VirB1 from *Brucella suis* interacts with the type IV secretion system core components VirB8, VirB9 and VirB11. *Microbiology* 2005, 151(Pt 11):3469-3482.
93. Mossey P, Hudacek A, Das A: *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion protein VirB3 is an inner membrane protein and requires VirB4, VirB7, and VirB8 for stabilization. *J Bacteriol* 2010, 192(11):2830-2838.
94. Jones AL, Shirasu K, Kado CI: The product of the virB4 gene of *Agrobacterium tumefaciens* promotes accumulation of VirB3 protein. *J Bacteriol* 1994, 176(17):5255-5261.
95. Hapfelmeier S, Domke N, Zambryski PC, Baron C: VirB6 is required for stabilization of VirB5 and VirB3 and formation of VirB7 homodimers in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 2000, 182(16):4505-4511.
96. Jakubowski SJ, Krishnamoorthy V, Cascales E, Christie PJ: *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 domains direct the ordered export of a DNA substrate through a type IV secretion System. *J Mol Biol* 2004, 341(4):961-977.
97. Krall L, Wiedemann U, Unsin G, Weiss S, Domke N, Baron C: Detergent extraction identifies different VirB protein subassemblies of the type IV secretion machinery in the

- membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99(17):11405-11410.
98. Jakubowski SJ, Krishnamoorthy V, Christie PJ: *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 protein participates in formation of VirB7 and VirB9 complexes required for type IV secretion. *J Bacteriol* 2003, 185(9):2867-2878.
 99. Fernandez D, Dang TA, Spudich GM, Zhou XR, Berger BR, Christie PJ: The *Agrobacterium tumefaciens* virB7 gene product, a proposed component of the T-complex transport apparatus, is a membrane-associated lipoprotein exposed at the periplasmic surface. *J Bacteriol* 1996, 178(11):3156-3167.
 100. Fernandez D, Spudich GM, Zhou XR, Christie PJ: The *Agrobacterium tumefaciens* VirB7 lipoprotein is required for stabilization of VirB proteins during assembly of the T-complex transport apparatus. *J Bacteriol* 1996, 178(11):3168-3176.
 101. Baron C, Thorstenson YR, Zambryski PC: The lipoprotein VirB7 interacts with VirB9 in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 1997, 179(4):1211-1218.
 102. Thorstenson YR, Zambryski PC: The essential virulence protein VirB8 localizes to the inner membrane of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 1994, 176(6):1711-1717.
 103. Terradot L, Bayliss R, Oomen C, Leonard GA, Baron C, Waksman G: Structures of two core subunits of the bacterial type IV secretion system, VirB8 from *Brucella suis* and ComB10 from *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(12):4596-4601.
 104. Chaillan-Huntington C, Butler PJ, Huntington JA, Akin D, Feldherr C, Stewart M: NTF2 monomer-dimer equilibrium. *J Mol Biol* 2001, 314(3):465-477.
 105. Das A, Xie YH: Construction of transposon Tn3phoA: its application in defining the membrane topology of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer proteins. *Mol Microbiol* 1998, 27(2):405-414.
 106. Das A, Xie YH: The *Agrobacterium* T-DNA transport pore proteins VirB8, VirB9, and VirB10 interact with one another. *J Bacteriol* 2000, 182(3):758-763.
 107. Kumar RB, Xie YH, Das A: Subcellular localization of the *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA transport pore proteins: VirB8 is essential for the assembly of the transport pore. *Mol Microbiol* 2000, 36(3):608-617.
 108. Judd PK, Kumar RB, Das A: Spatial location and requirements for the assembly of the *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(32):11498-11503.
 109. Yuan Q, Carle A, Gao C, Sivanesan D, Aly KA, Hoppner C, Krall L, Domke N, Baron C: Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *J Biol Chem* 2005, 280(28):26349-26359.
 110. Villamil Giraldo AM, Sivanesan D, Carle A, Paschos A, Smith MA, Plesa M, Coulton J, Baron C: Type IV secretion system core component VirB8 from *Brucella* binds to the globular domain of VirB5 and to a periplasmic domain of VirB6. *Biochemistry* 2012, 51(18):3881-3890.
 111. Sivanesan D, Baron C: The dimer interface of *Agrobacterium tumefaciens* VirB8 is important for type IV secretion system function, stability, and association of VirB2 with the core complex. *J Bacteriol* 2011, 193(9):2097-2106.

112. Sivanesan D, Hancock MA, Villamil Giraldo AM, Baron C: Quantitative analysis of VirB8-VirB9-VirB10 interactions provides a dynamic model of type IV secretion system core complex assembly. *Biochemistry* 2010, 49(21):4483-4493.
113. Walker JE, Saraste M, Gay NJ: E. coli F1-ATPase interacts with a membrane protein component of a proton channel. *Nature* 1982, 298(5877):867-869.
114. Middleton R, Sjolander K, Krishnamurthy N, Foley J, Zambryski P: Predicted hexameric structure of the *Agrobacterium* VirB4 C terminus suggests VirB4 acts as a docking site during type IV secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(5):1685-1690.
115. Motallebi-Veshareh M, Balzer D, Lanka E, Jagura-Burdzy G, Thomas CM: Conjugative transfer functions of broad-host-range plasmid RK2 are coregulated with vegetative replication. *Mol Microbiol* 1992, 6(7):907-920.
116. Whitchurch CB, Hobbs M, Livingston SP, Krishnapillai V, Mattick JS: Characterisation of a *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility gene and evidence for a specialised protein export system widespread in eubacteria. *Gene* 1991, 101(1):33-44.
117. Planet PJ, Kachlany SC, DeSalle R, Figurski DH: Phylogeny of genes for secretion NTPases: identification of the widespread tadA subfamily and development of a diagnostic key for gene classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98(5):2503-2508.
118. Yeo HJ, Savvides SN, Herr AB, Lanka E, Waksman G: Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Mol Cell* 2000, 6(6):1461-1472.
119. Hare S, Fischer W, Williams R, Terradot L, Bayliss R, Haas R, Waksman G: Identification, structure and mode of action of a new regulator of the *Helicobacter pylori* HP0525 ATPase. *EMBO J* 2007, 26(23):4926-4934.
120. Sagulenko E, Sagulenko V, Chen J, Christie PJ: Role of *Agrobacterium* VirB11 ATPase in T-pilus assembly and substrate selection. *J Bacteriol* 2001, 183(20):5813-5825.
121. Krause S, Pansegrau W, Lurz R, de la Cruz F, Lanka E: Enzymology of type IV macromolecule secretion systems: the conjugative transfer regions of plasmids RP4 and R388 and the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encode structurally and functionally related nucleoside triphosphate hydrolases. *J Bacteriol* 2000, 182(10):2761-2770.
122. Rivas S, Bolland S, Cabezon E, Goni FM, de la Cruz F: TrwD, a protein encoded by the IncW plasmid R388, displays an ATP hydrolase activity essential for bacterial conjugation. *J Biol Chem* 1997, 272(41):25583-25590.
123. Sexton JA, Vogel JP: Type IVB secretion by intracellular pathogens. *Traffic* 2002, 3(3):178-185.
124. Lessl M, Pansegrau W, Lanka E: Relationship of DNA-transfer-systems: essential transfer factors of plasmids RP4, Ti and F share common sequences. *Nucleic Acids Res* 1992, 20(22):6099-6100.
125. Schneider E, Hunke S: ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev* 1998, 22(1):1-20.
126. Llosa M, Bolland S, de la Cruz F: Genetic organization of the conjugal DNA processing region of the IncW plasmid R388. *J Mol Biol* 1994, 235(2):448-464.

127. Kumar RB, Das A: Polar location and functional domains of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer protein VirD4. *Mol Microbiol* 2002, 43(6):1523-1532.
128. Balzer D, Pansegrau W, Lanka E: Essential motifs of relaxase (TraI) and TraG proteins involved in conjugative transfer of plasmid RP4. *J Bacteriol* 1994, 176(14):4285-4295.
129. Wallden K, Williams R, Yan J, Lian PW, Wang L, Thalassinos K, Orlova EV, Waksman G: Structure of the VirB4 ATPase, alone and bound to the core complex of a type IV secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109(28):11348-11353.
130. Batchelor RA, Pearson BM, Friis LM, Guerry P, Wells JM: Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different *Campylobacter* species. *Microbiology* 2004, 150(Pt 10):3507-3517.
131. Johnson EM, Gaddy JA, Voss BJ, Hennig EE, Cover TL: Genes required for assembly of pili associated with the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. *Infect Immun* 2014, 82(8):3457-3470.
132. Waksman G, Fronzes R: Molecular architecture of bacterial type IV secretion systems. *Trends Biochem Sci* 2010, 35(12):691-698.
133. Paschos A, den Hartigh A, Smith MA, Atluri VL, Sivanesan D, Tsolis RM, Baron C: An in vivo high-throughput screening approach targeting the type IV secretion system component VirB8 identified inhibitors of *Brucella abortus* 2308 proliferation. *Infect Immun* 2011, 79(3):1033-1043.
134. Smith MA, Coincon M, Paschos A, Jolicoeur B, Lavallee P, Sygusch J, Baron C: Identification of the binding site of *Brucella* VirB8 interaction inhibitors. *Chemistry & biology* 2012, 19(8):1041-1048.
135. Keyser P, Elofsson M, Rosell S, Wolf-Watz H: Virulence blockers as alternatives to antibiotics: type III secretion inhibitors against Gram-negative bacteria. *J Intern Med* 2008, 264(1):17-29.
136. Berman H, Henrick K, Nakamura H, Markley JL: The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB data. *Nucleic Acids Res* 2007, 35(Database issue):D301-303.
137. Berman HM, Henrick K, Nakamura H, Markley J, Bourne PE, Westbrook J: Realism about PDB. *Nat Biotechnol* 2007, 25(8):845-846; author reply 846.
138. Russell RB, Alber F, Aloy P, Davis FP, Korkin D, Pichaud M, Topf M, Sali A: A structural perspective on protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol* 2004, 14(3):313-324.
139. Smith GP: Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985, 228(4705):1315-1317.
140. Hoogenboom HR, de Bruine AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC: Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 1998, 4(1):1-20.
141. Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G: Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 1991, 352(6336):624-628.
142. Petrenko VA, Smith GP: Phages from landscape libraries as substitute antibodies. *Protein Eng* 2000, 13(8):589-592.

143. Willats WG: Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol* 2002, 50(6): 837-854.
144. Bratkovic T: Progress in phage display: evolution of the technique and its application. *Cell Mol Life Sci* 2010, 67(5):749-767.
145. Clackson T, Wells JA: A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science* 1995, 267(5196):383-386.
146. Dominguez C, Boelens R, Bonvin AM: HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J Am Chem Soc* 2003, 125(7): 1731-1737.
147. Karimova G, Ullmann A, Ladant D: A bacterial two-hybrid system that exploits a cAMP signaling cascade in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 2000, 328:59-73.
148. Dove SL, Hochschild A: A bacterial two-hybrid system based on transcription activation. *Methods Mol Biol* 2004, 261:231-246.
149. Sinz A: Investigation of protein-protein interactions in living cells by chemical crosslinking and mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2010, 397(8):3433-3440.
150. Fancy DA: Elucidation of protein-protein interactions using chemical cross-linking or label transfer techniques. *Curr Opin Chem Biol* 2000, 4(1):28-33.
151. Ghisaidoobe AB, Chung SJ: Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Forster resonance energy transfer techniques. *Int J Mol Sci* 2014, 15(12):22518-22538.
152. ALBANI JR: Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy: Blackwell Science, a Blackwell Publishing company; 2007.
153. J.R. L: Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed. edn. Berlin/ Heidelberg, Germany; 2006.
154. Ghisaidoobe AT, van den Berg RJ, Butt SS, Strijland A, Donker-Koopman WE, Scheij S, van den Nieuwendijk AM, Koomen GJ, van Loevezijn A, Leemhuis M *et al*: Identification and development of biphenyl substituted iminosugars as improved dual glucosylceramide synthase/neutral glucosylceramidase inhibitors. *J Med Chem* 2014, 57(21):9096-9104.
155. Dax C, Coincon M, Sygusch J, Blonski C: Hydroxynaphthaldehyde phosphate derivatives as potent covalent Schiff base inhibitors of fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *Biochemistry* 2005, 44(14):5430-5443.
156. Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK: Drug solubility: importance and enhancement techniques. *ISRN Pharm* 2012, 2012:195727.

VI. Annexe

	Peptides sequences
	T T N S P P L
	P A H R V P S
	P P L S A P N
	S G T P W H P
	A P S P W K Q
	M E R P A H L
	R L P H S V G
	T F L D T R A
	G E T P N P H
	P S K L Q E H
	M R N D G A N
	P L W D K R H
	D S L Q Y P A
	P L W D K R H
	M S K H Q A Y
	Q W T N H A L
	L S S P T S N
	D P F H V H N
	N D F K L Q F
	F G N P H G H
	T N P V T E S
	L S Y L H P T
	D A Q W A F M
	G P K M F R I
	H P Q L P S I
	Y K L P S R H
	Q K A H H E Q
	P A T Y T S A
	N S W P P S R
	F S S S R N Y
	Q W T N H A L
	S T H T S R L
	T L P L P N L
	N R Y T P T A

	P H T L S R T
	D P G A S H P
	P E A A L S S
	P K K L D S I
	K S A K T Y H
	T Q P W T R A
	A L G H S A K
	P V P Y P Q L
	R L P H S V G
	N R G Q L S T
	S G T P W H P
	G M M P V A L
	L K I T G E D
	K A T A Q G A
	H N P L L S F
	K P A S H N A
	T T N S P P L
	P L W D K R H
	G F L G K N Q
	V I P Q P Q Q
	S Y P T R P T
	W A A I F P L
	F S N Q T M L
	N S W P P S R
	H E A R S T M
	D P F H V H N
	C S T P T P H
	H F K P M Q P A H P I P
	A Y T T S I P N R N Q L
	K V W P P L T S I V P S

	SHPWNAQRELSV
	NSTLKVLPGWM
	LSLNFDRESETN
	VSRHQSWHPHDL
	DPALRHTHHNLR
	FPAMSFAXKKLA
	AWPPPSMGPLAY
	TILKAWPNITQL
	NADNQMTWRHVL
	AWPPPSMGPLAY
	KIXIFYPFKSPLI
	AVPHRVGGLHSL
	SWNSKAWIVVPA
	KVWISPQSLGAT
	LLXKTLNNRLYD
	KVWQLQPSNSVT
	AWPPPSMGPLAY
	TPFPFAPLGRPP
	ILANDLTAPGPR
	KVWPPMYLSHTF
	AYTTSIPNRNQL
	KISQPTTVASLQ
	KVVQLSELSRLL
	KVWISPQSLGAT
	NQRVLPPSHSWL
	NLRTDSLTLVIR
	KCCFTTASSTSI
	KVWISPQSLGAT
	MKVSEPLHAHFS
	VSRHQSWHPHDL
	ILANDLTAPGPR
	KCCTLPRPLEML
	KVWXMAPTTAFS
	AYTTSIPNRNQL
	GLKIWSLPPHGG

	K V W M P N N R G P V P
	I L A N D L T A P G P R
	W M A D T S P S L A S T
	S I H R H H D D H F L T
	T P F P F A P L G R P P
	L S L N F D R E S E T N
	K V W M P N N R G P V P
	K V W M P N N R G P V P
	A Y T T S I P N R N Q L
	H P H H E T S V M R L Q
	K V W P P M Y L S H T F
	K I S Q P T T V A S L Q
	S T M N D I H M E L H R
	H S P S N L G F Q S P P
	K C C T L P R P L E M L
	T I L K A W P N I T Q L
	K V W M P N N R G P V P

	A H S H K L F L L S N R
	K A W V L T E W Q T T K
	A V P H R V G G L H S L
	T P F P F A P L G R P P
	I D A P A N Q R L L Q K
	N Q R V L P P S H S W L
	K I W Q M D Q D S V R N

Table S1. Sequences of VirB10 binding peptides isolated by phage display.

Primer name	Sequence
VirB8spS157A5'	5'-AAGCAGTACGGCAGCGCCGTGAGAACCAGCGTGACCATCGTG-3'
VirB8spS157A3'	3'-TTCGTCATGCCGTCGCGGCACTCTTGGTCGCACTGGTAGCAC-5'
VirB8spR160A5'	5'-TACGGCAGCAACGTGGCCACCAGCGTCACCATCGTGAGC-3'
VirB8spR160A3'	3'-ATGCCGTCGTTGCACCGGTGGTCGCAGTGGTAGCATCG-5'
VirB8spT161A5'	5'-GGCAGCAACGTGAGAGCCAGCGTGACCATCGTGAGCATCGTG-3'
VirB8spT161A3'	3'-CCGTCGTTGCACTCTCGGTCGCACTGGTAGCACTCGTAGCAC-5'
VirB8spS162A5'	5'-AGCAACGTGAGAACCGCCGTGACCATCGTGAGCATCGTGCCC-3'
VirB8spS162A3'	3'-TCGTTGCACTCTTGGCGGCACTGGTAGCACTCGTAGCACGGG-5'
VirB8spT164A5'	5'-GTGAGAACCAGCGTGGCCATCGTGAGCATCGTGCCCAACGGC-3'
VirB8spT164A3'	3'-CACTCTTGGTCGCACCGGTAGCACTCGTAGCACGGGTTGCCG-5'
VirB8spI165A5'	5'-AGAACCAGCGTGACCGCCGTGAGCATCGTGCCCAACGGCAAG-3'
VirB8spI165A3'	3'-TCTTGGTCGCACTGGCGGCACTCGTAGCACGGGTTGCCGTTTC-5'
VirB8spV166A5'	5'-AACGTGAGAACCAGCGCCACCATCGTGAGCATCGTGCCCAAC-3'
VirB8spV166A3'	3'-TTGCACTCTTGGTCGCGGTGGTAGCACTCGTAGCACGGGTTG-5'
VirB8spS167A5'	5'-AGCAACGTGAGAACCGCCGTGACCATCGTGAGCATCGTGCCC-3'
VirB8spS167A3'	3'-TCGTTGCACTCTTGGCGGACACTGGTAGCACTCGTAGCACGGG-5'
VirB8spI168A5'	5'-GTGACCATCGTGAGCGCCGTGCCCAACGGCAAGGGCATCGGC
VirB8spI168A3'	3'-CACTGGTAGCACTCGCGGCACGGGTTGCCGTTCCCGTAGCCG-5'
VirB8spV169A5'	5'-ACCATCGTGAGCATCGCCCCAACGGCAAGGGCATCGGCACC
VirB8spV169A3'	3'-TGGTACDACTCGTAGCGGGGGTTGCCGTTCCCGTAGCCGTGG-5'
VirB8spP170A5'	5'-ATCGTGAGCATCGTGGCCAACGGCAAGGGCATC-3'
VirB8spP170A3'	3'-TAGCACTCGTAGCACCGGTTGCCGTTCCCGTAG-5'
VirB8spN171A5'	5'-GTGAGCATCGTGCCCCGCCGCAAGGGCATCGGCACCGTGAGA-3'
VirB8spN171A3'	3'-CACTCGTAGCACGGGCGGCCGTTCCCGTAGCCGTGGCACTCT-5'
VirB8spG172A5'	5'-GTGCCCAACGGCAAGGCCATCGGCACCGTGAGATTCGCCAAG-3'
VirB8spG172A3'	3'-CACGGGTTGCCGTTCCGGTAGCCGTGGCACTCTAAGCGGTTTC-5'

Table S2. Oligonucleotides used in the study of the interaction of Δ VirB8-VirB10 using bacterial two-hybrid assay.

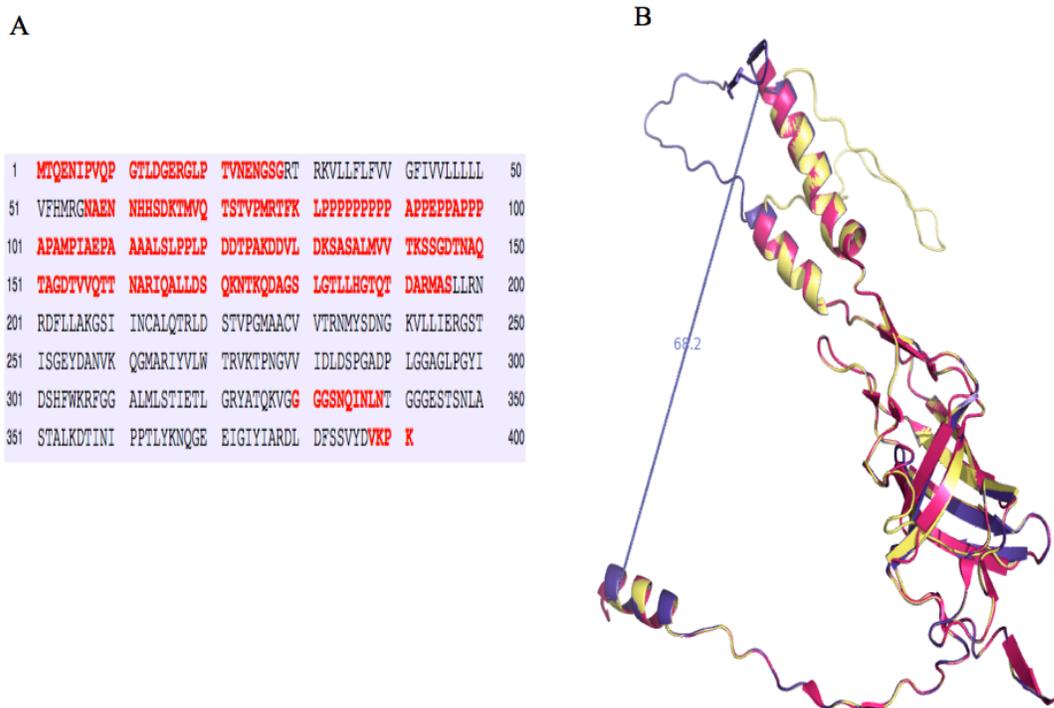


Figure S1. Superimposition of the structures of VirB10_{FL} model and its homologs : TraF_{CT} and ComB10. (A) Sequence of VirB10_{FL} with residues belonging to its N-terminal domain highlighted in red (Amino acids 1 to 160) (B)The generated model was obtained using the software MODELLER [179]. Highlighted in hot pink is the X-ray structure of TraF_{CT} (PDB code : 3JQO), in yellow the X-ray structure of ComB10 *H. pylori* (PDB code : 3BHV)[104] and in purple the model generated for VirB10_{FL} using the software MODELLER.

	VirB8sp-VirB10model		
Cluster #	#1	#2	#3
Cluster Size	45	10	20
HADDOCK score	-70 ± 7.3	-41.3 ± 5	-35.4 ± 2.0
RMSD (Å) (for the complex with the lowest energy)	1.2 ± 0.9	5.4 ± 0.4	9.3 ± 0.5

Electrostatic energy (kcal/mol)	-305.7 ± 50.2	-154.3 ± 20.8	-146.2 ± 38.9
Van de Waal energy (kcal/mol)	-59 ± 10	-25.5 ± 5.6	-34.4 ± 2.5

Desolvation energy (kcal/mol)	45.8 ± 3.2	21.7 ± 4.3	10.1 ± 2.1
-------------------------------	----------------	----------------	----------------

Table S3. Top three clusters of docking results obtained after docking simulation of VirB8sp with VirB10model using HADDOCK.

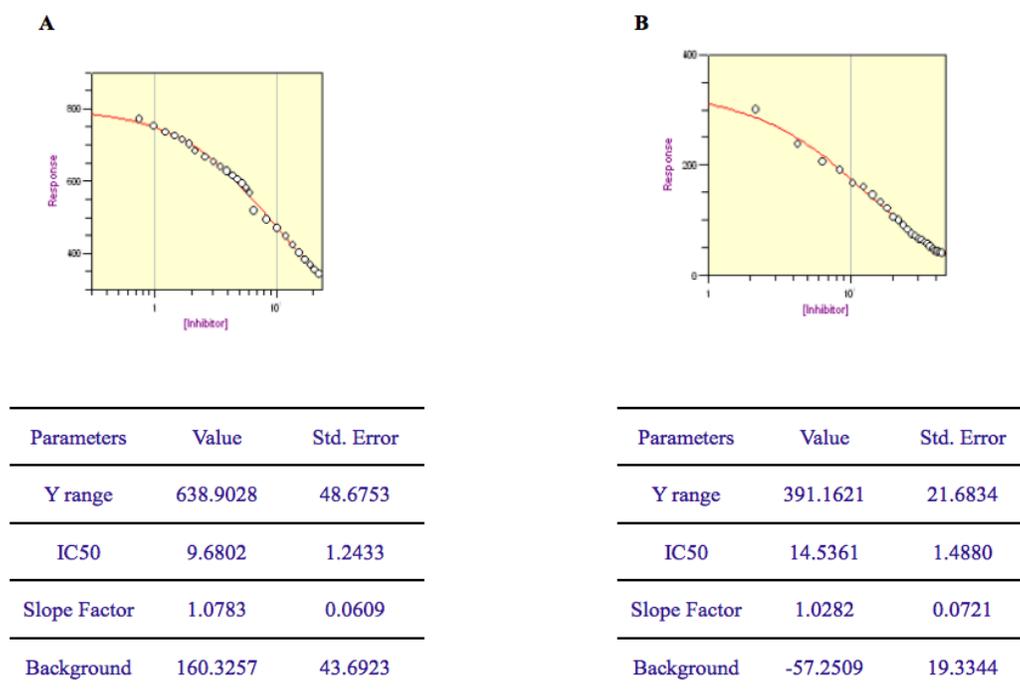


Figure S2. Direct titrations of BAR-068 against VirB8_{sp} in (A) Tris, NaCl buffer at pH=8 and (B) in crystallization buffers respectively. The data were fitted, and dissociation constants determined, as described in Experimental procedures. The data shown are representative of three independent titrations that were used to calculate K_D values.

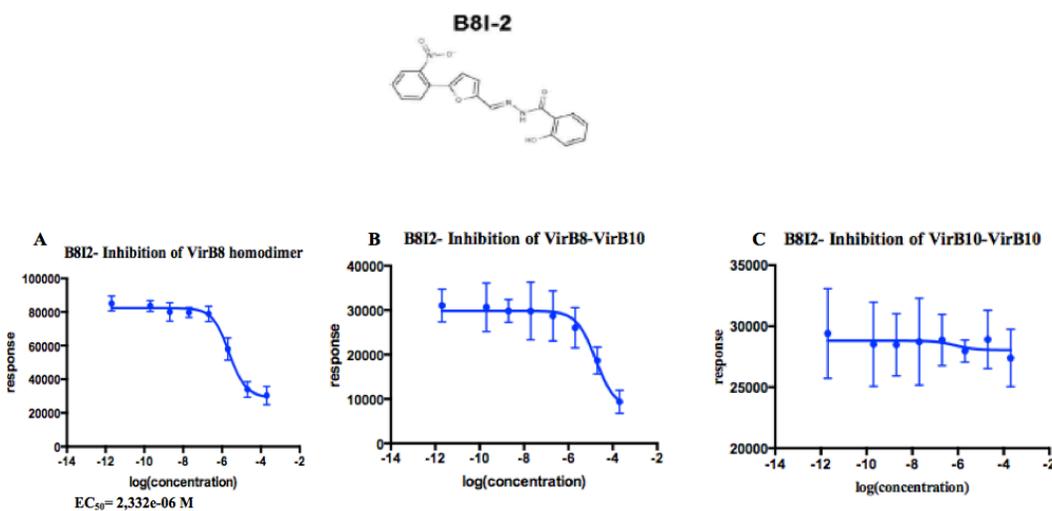


Figure S3. Dose response and determination of the effect of B8I-2 on VirB8 interactions.

E. coli strain BTH101 expressing fusions of VirB8_{FL} to the T18 and T25 domains of adenylate cyclase was cultivated in 96-well microtiter plates in TGYEP medium, and the β -galactosidase activities reflecting the protein-protein interaction were determined in the presence of inhibitor B8I-2 at concentrations from 2 μM to 2 mM. The EC_{50} values are indicated. The average from 24 replicates for each concentration of considered inhibitor is given and the standard deviation is shown. (A) The β -galactosidase activities reflecting the VirB8 homodimerization were determined in the presence of inhibitors B8I-2 at concentrations from 2 μM to 2 mM. (B) The β -galactosidase activities reflecting the VirB8-VirB10 interaction were determined in the presence of inhibitors B8I-2 at concentrations from 2 μM to 2 mM. (C) The β -galactosidase activities reflecting the VirB10-VirB10 interaction were determined in the presence of inhibitors B8I-2 at concentrations from 2 μM to 2 mM.

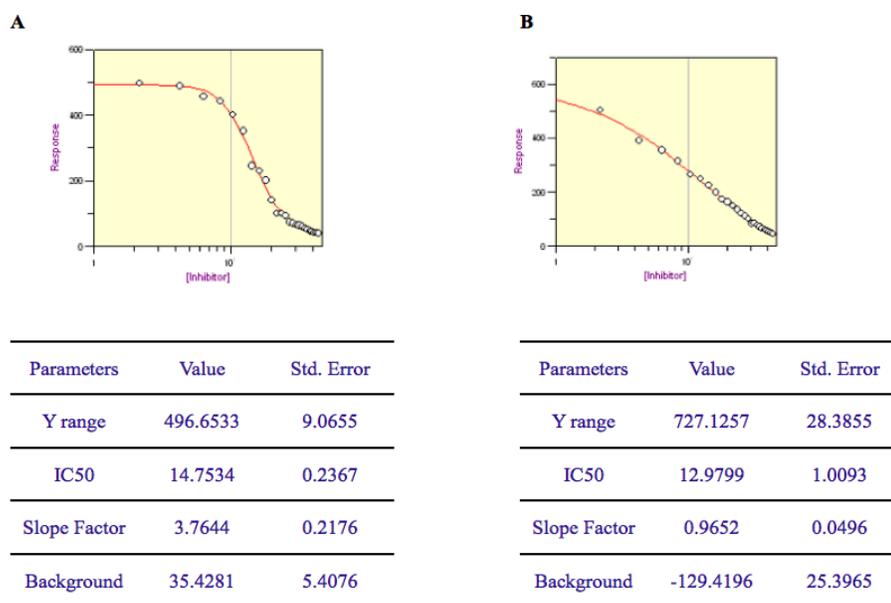


Figure S4. Direct titrations of B8I-2 against VirB8_{sp} in (A) Tris, NaCl buffer at pH=8 and (B) in crystallization buffers respectively. The data were fitted, and dissociation constants determined, as described in Experimental procedures. The data shown are representative of three independent titrations that were used to calculate K_D values.

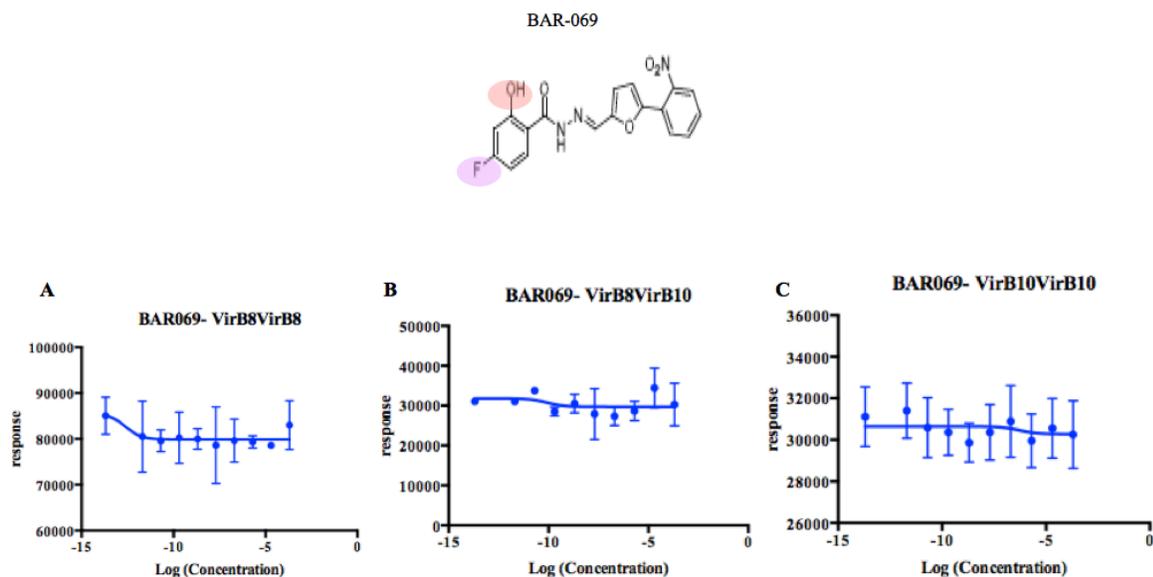
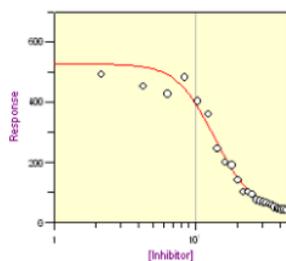


Figure S5. Dose response and determination of the effect of BAR-069 on VirB8 interactions. *E. coli* strain BTH101 expressing fusions of VirB8_{FL} to the T18 and T25 domains of adenylate cyclase was cultivated in 96-well microtiter plates in TGYEP medium, and the β -galactosidase activities reflecting the protein-protein interaction were determined in the presence of inhibitor BAR-069 at concentrations from 2 μ M to 2 mM. The EC₅₀ values are indicated. The average from 24 replicates for each concentration of considered inhibitor is given and the standard deviation is shown. (A) The β -galactosidase activities reflecting the VirB8 homodimerization were determined in the presence of inhibitors BAR-069 at concentrations from 2 μ M to 2 mM. (B) The β -galactosidase activities reflecting the VirB8-VirB10 interaction were determined in the presence of inhibitors BAR-069 at concentrations from 2 μ M to 2 mM. (C) The β -galactosidase activities reflecting the VirB10-VirB10 interaction were determined in the presence of inhibitors BAR-069 at concentrations from 2 μ M to 2 mM.



Parameters	Value	Std. Error
Y range	500.9111	34.5990
IC50	13.9634	0.8059
Slope Factor	3.2060	0.5280
Background	26.5261	21.4076

Figure S6. Direct titrations of BAR-069 against VirB8_{sp} in Tris, NaCl buffer at pH=8. The data were fitted, and dissociation constants determined, as described in Experimental procedures. The data shown are representative of three independent titrations that were used to calculate K_D values.

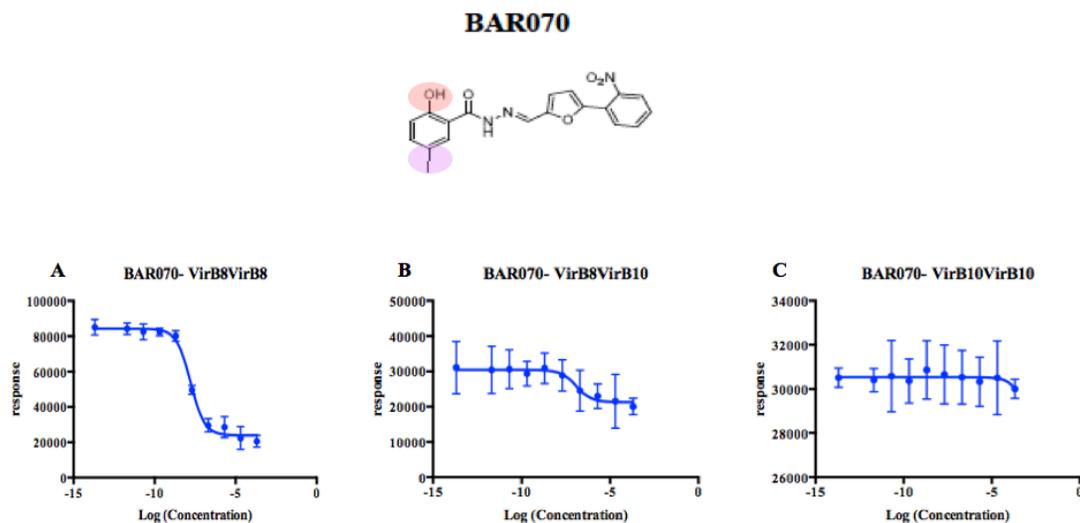
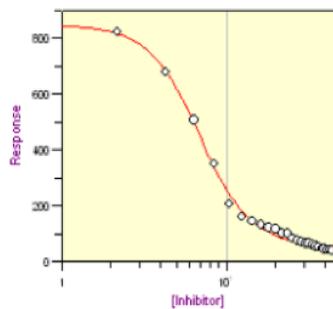


Figure S7. Dose response and determination of the effect of BAR-070 on VirB8 interactions. *E. coli* strain BTH101 expressing fusions of VirB8_{FL} to the T18 and T25 domains of adenylate cyclase was cultivated in 96-well microtiter plates in TGYEP medium, and the β -galactosidase activities reflecting the protein-protein interaction were determined in the presence of inhibitor BAR-070 at concentrations from 2 μ M to 2 mM. The EC₅₀ values are indicated. The average from 24 replicates for each concentration of considered inhibitor is given and the standard deviation is shown. (A) The β -galactosidase activities reflecting the VirB8 homodimerization were determined in the presence of inhibitors BAR-070 at concentrations from 2 μ M to 2 mM. (B) The β -galactosidase activities reflecting the VirB8-VirB10 interaction were determined in the presence of inhibitors BAR-070 at concentrations from 2 μ M to 2 mM. (C) The β -galactosidase activities reflecting the VirB10-VirB10 interaction were determined in the presence of inhibitors BAR-070 at concentrations from 2 μ M to 2 mM.



Parameters	Value	Std. Error
Y range	796.3992	14.7238
IC50	6.9442	0.1567
Slope Factor	2.7641	0.1395
Background	50.3130	5.4205

Figure S8. Direct titrations of BAR-070 against VirB8_{sp} in Tris, NaCl buffer at pH=8. The data were fitted, and dissociation constants determined, as described in Experimental procedures. The data shown are representative of three independent titrations that were used to calculate K_D values.

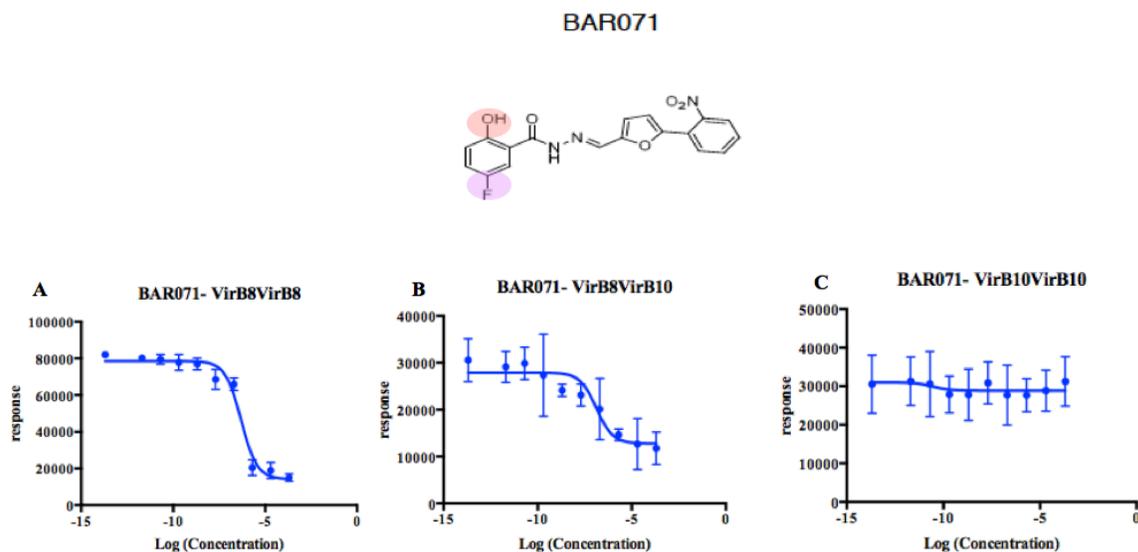
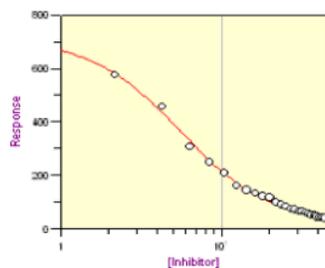


Figure S9. Dose response and determination of the effect of BAR-071 on VirB8 interactions. *E. coli* strain BTH101 expressing fusions of VirB8_{FL} to the T18 and T25 domains of adenylate cyclase was cultivated in 96-well microtiter plates in TGYEP medium, and the β -galactosidase activities reflecting the protein-protein interaction were determined in the presence of inhibitor BAR-071 at concentrations from 2 μ M to 2 mM. The EC₅₀ values are indicated. The average from 24 replicates for each concentration of considered inhibitor is given and the standard deviation is shown. (A) The β -galactosidase activities reflecting the VirB8 homodimerization were determined in the presence of inhibitors BAR-071 at concentrations from 2 μ M to 2 mM. (B) The β -galactosidase activities reflecting the VirB8-VirB10 interaction were determined in the presence of inhibitors BAR-071 at concentrations from 2 μ M to 2 mM. (C) The β -galactosidase activities reflecting the VirB10-VirB10 interaction were determined in the presence of inhibitors BAR-071 at concentrations from 2 μ M to 2 mM.



Parameters	Value	Std. Error
Y range	692.7955	11.7384
IC50	5.5607	0.1466
Slope Factor	1.5558	0.0610
Background	18.4436	5.9605

Figure S10. Direct titrations of BAR-071 against VirB8_{sp} in Tris, NaCl buffer at pH=8. The data were fitted, and dissociation constants determined, as described in Experimental procedures. The data shown are representative of three independent titrations that were used to calculate K_D values.

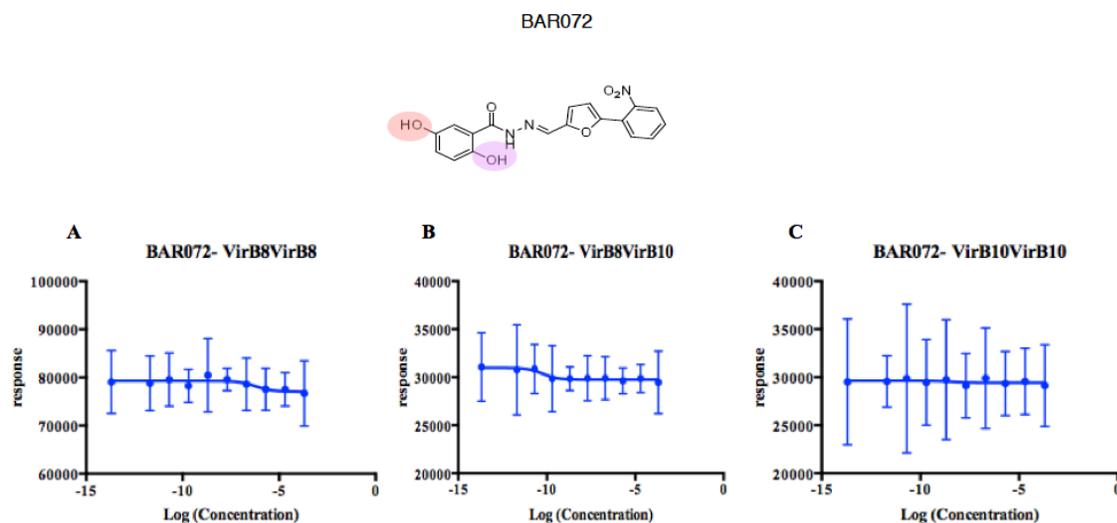
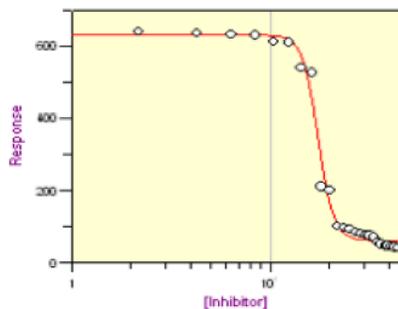


Figure S11. Dose response and determination of the effect of BAR-072 on VirB8 interactions. *E. coli* strain BTH101 expressing fusions of VirB8_{FL} to the T18 and T25 domains of adenylate cyclase was cultivated in 96-well microtiter plates in TGYEP medium, and the β -galactosidase activities reflecting the protein-protein interaction were determined in the presence of inhibitor BAR-072 at concentrations from 2 μ M to 2 mM. The EC₅₀ values are indicated. The average from 24 replicates for each concentration of considered inhibitor is given and the standard deviation is shown. (A) The β -galactosidase activities reflecting the VirB8 homodimerization were determined in the presence of inhibitors BAR-072 at concentrations from 2 μ M to 2 mM. (B) The β -galactosidase activities reflecting the VirB8-VirB10 interaction were determined in the presence of inhibitors BAR-072 at concentrations from 2 μ M to 2 mM. (C) The β -galactosidase activities reflecting the VirB10-VirB10 interaction were determined in the presence of inhibitors BAR-072 at concentrations from 2 μ M to 2 mM.



Parameters	Value	Std. Error
Y range	588.0616	13.8747
IC50	17.5018	0.2367
Slope Factor	11.2436	1.3775
Background	61.4287	7.9343

Figure S12. Direct titrations of BAR-072 against VirB8_{sp} in Tris, NaCl buffer at pH=8. The data were fitted, and dissociation constants determined, as described in Experimental procedures. The data shown are representative of three independent titrations that were used to calculate K_D values.

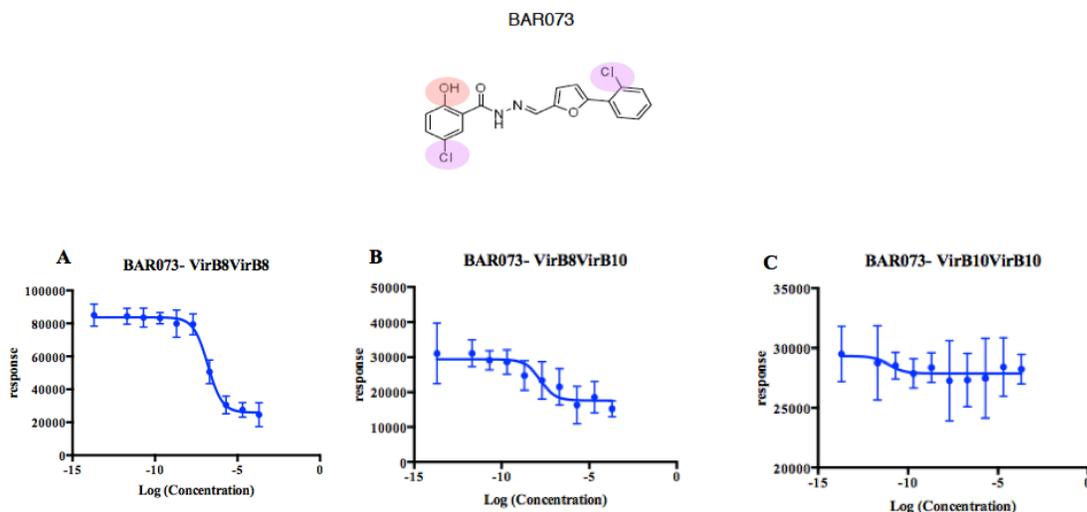
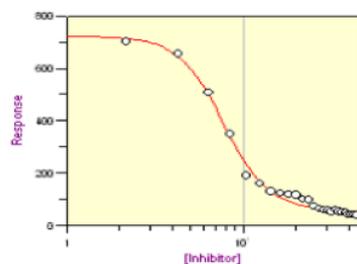


Figure S13. Dose response and determination of the effect of BAR-073 on VirB8 interactions. *E. coli* strain BTH101 expressing fusions of VirB8_{FL} to the T18 and T25 domains of adenylate cyclase was cultivated in 96-well microtiter plates in TGYEP medium, and the β -galactosidase activities reflecting the protein-protein interaction were determined in the presence of inhibitor BAR-073 at concentrations from 2 μ M to 2 mM. The EC₅₀ values are indicated. The average from 24 replicates for each concentration of considered inhibitor is given and the standard deviation is shown. (A) The β -galactosidase activities reflecting the VirB8 homodimerization were determined in the presence of inhibitors BAR-073 at concentrations from 2 μ M to 2 mM. (B) The β -galactosidase activities reflecting the VirB8-VirB10 interaction were determined in the presence of inhibitors BAR-073 at concentrations from 2 μ M to 2 mM. (C) The β -galactosidase activities reflecting the VirB10-VirB10 interaction were determined in the presence of inhibitors BAR-073 at concentrations from 2 μ M to 2 mM.



Parameters	Value	Std. Error
Y range	667.1324	15.5595
IC50	7.8113	0.2036
Slope Factor	3.3597	0.2377
Background	54.3745	5.7636

Figure S14. Direct titrations of BAR-073 against VirB8_{sp} in Tris, NaCl buffer at pH=8. The data were fitted, and dissociation constants determined, as described in Experimental procedures. The data shown are representative of three independent titrations that were used to calculate K_D values.

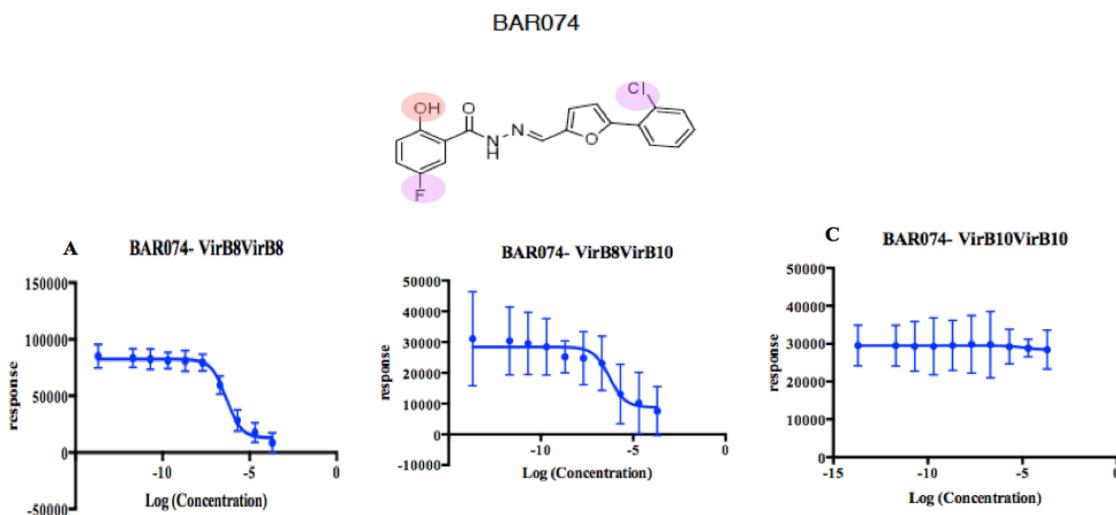
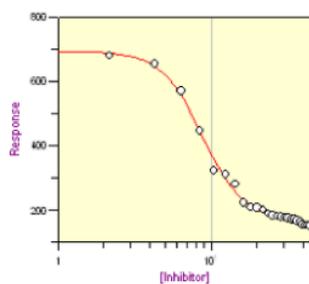


Figure S15. Dose response and determination of the effect of BAR-074 on VirB8 interactions. *E. coli* strain BTH101 expressing fusions of VirB8_{FL} to the T18 and T25 domains of adenylate cyclase was cultivated in 96-well microtiter plates in TGYEP medium, and the β -galactosidase activities reflecting the protein-protein interaction were determined in the presence of inhibitor BAR-074 at concentrations from 2 μ M to 2 mM. The EC₅₀ values are indicated. The average from 24 replicates for each concentration of considered inhibitor is given and the standard deviation is shown. (A) The β -galactosidase activities reflecting the VirB8 homodimerization were determined in the presence of inhibitors BAR-074 at concentrations from 2 μ M to 2 mM. (B) The β -galactosidase activities reflecting the VirB8-VirB10 interaction were determined in the presence of inhibitors BAR-074 at concentrations from 2 μ M to 2 mM. (C) The β -galactosidase activities reflecting the VirB10-VirB10 interaction were determined in the presence of inhibitors BAR-074 at concentrations from 2 μ M to 2 mM.



Parameters	Value	Std. Error
Y range	533.8965	10.8083
IC50	8.9221	0.1953
Slope Factor	3.1222	0.1830
Background	159.3044	4.5472

Figure S16. Direct titrations of BAR-074 against VirB8_{sp} in Tris, NaCl buffer at pH=8. The data were fitted, and dissociation constants determined, as described in Experimental procedures. The data shown are representative of three independent titrations that were used to calculate K_D values.

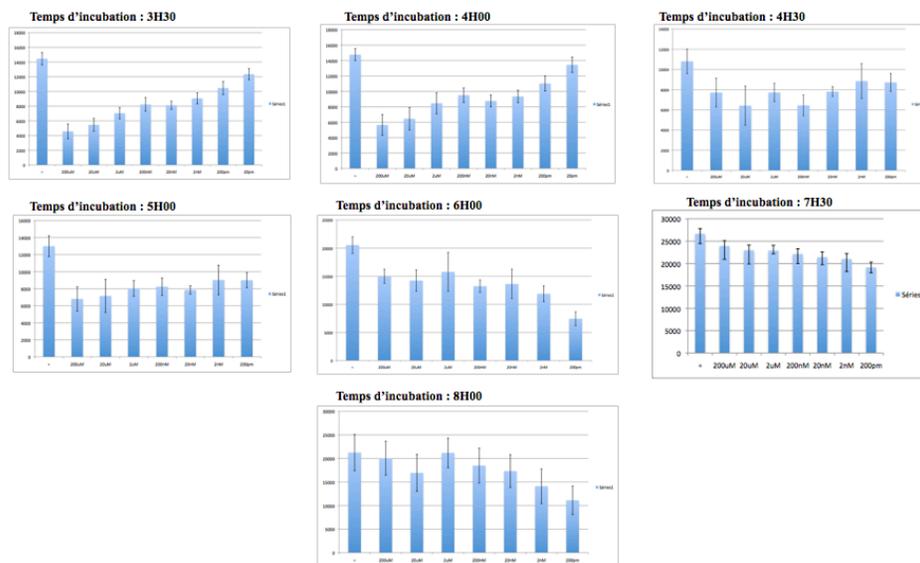


Figure S17. *E. coli* strain BTH101 expressing fusions of TraE_{FL} to the T18 and T25 domains of adenylate cyclase was cultivated in 96-well microtiter plates in TGYEP medium, and the β -galactosidase activities reflecting the protein-protein interaction were determined in the presence of inhibitor B8I-2 at concentrations from 2 μ M to 2 mM and at several incubation time as indicated.

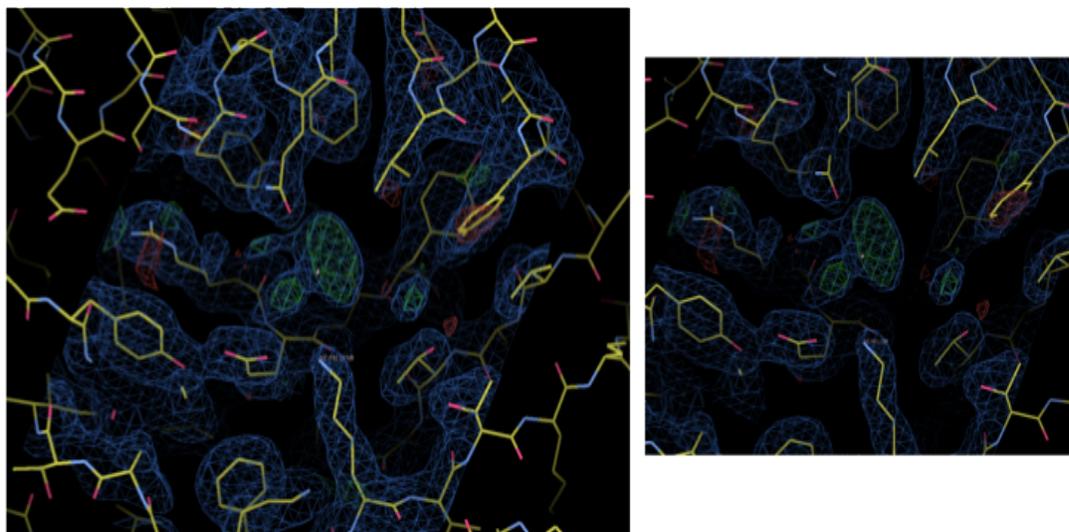
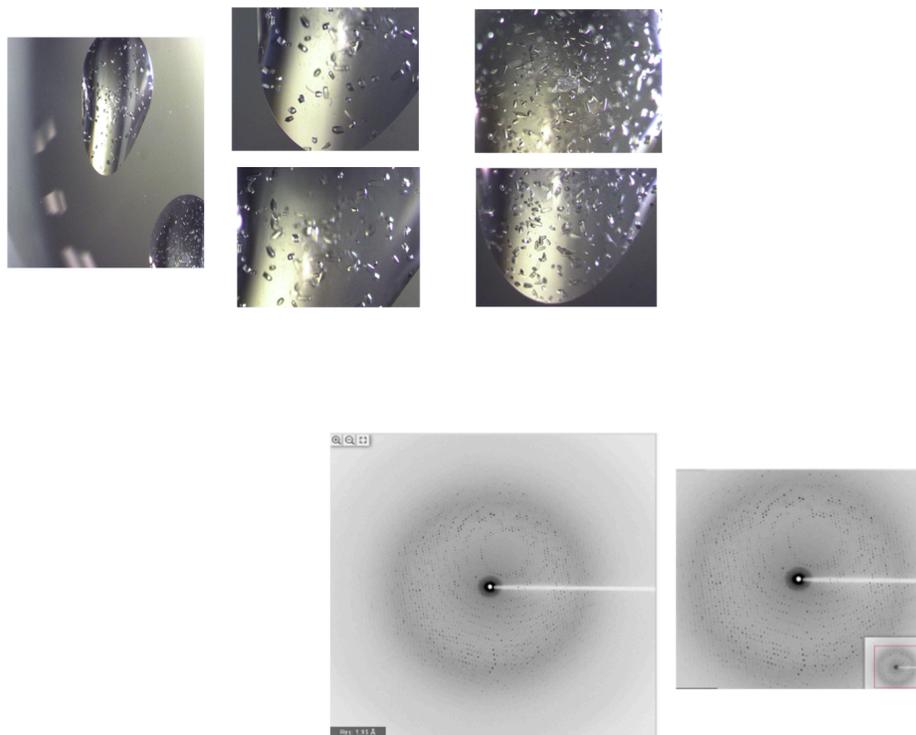


Figure S18. Data collection of VirB8_{sp} after soaking experience in presence of 200 μ M of BAR-068, we observe a positive density in the same position as the identified binding site of B8I-1.

To define the structural basis for the inhibition and to identify the BAR-068-binding site(s) of VirB8_{sp} dimerization, we attempted to crystallize VirB8 in presence of BAR-068 which resulted in the optimization of crystallization conditions in presence of 10% DMSO. We elucidated the structure of VirB8_{sp} with a higher percentage of DMSO at 1.9 \AA resolution by using the structure of the periplasmic domain VirB8_{sp} as a model for molecular replacement [180]. VirB8_{sp} was soaked in the presence of BAR-068, the structures were solved by molecular replacement using Phenix software [181], and the model was built using COOT [182](see annexe). Based on previously obtained results, the inhibitor-binding site of molecule B8I-1 was identified in a deep groove opposite to the dimerization interface of VirB8_{sp}, which was unfortunately not coherent with our findings. In this structure, the binding site comprises conserved surface-exposed residues which forms hydrogen bonds with residue K182 and close contacts with Q144, the backbone carbonyl of R114, and hydrophobic interactions between the butyl chain of B8I-1 and W198. In the structure obtained after soaking of VirB8_{sp} in presence of 200 μ M of BAR-068, we observe a positive density in the same position as the identified binding site of B8I-1 (Figure S18). However, after several round of analysis, we were able to identify this density as glycerol.

In addition, the obtained structure did not induce detectable conformational changes with respect to the structure of free VirB8_{sp}. We did not observe binding after cocrystallization or soaking with any of the variants of B8I-2, indicating that BAR-068 or the others, may not be able to compete for the dimer interface or that its length is too big to reside in a stable manner in the hypothetical binding site or even that the crystallization conditions precluded binding.



Data Collection

Summary

Score ^[1]	0.73
Wavelength (Å)	0.97949
Space Group ^[2]	I4(1)22
Unit Cell (Å)	202.21 202.21 103.52 90 90 90
Resolution (Å) ^[3]	1.98
All Reflections	511808
Unique Reflections	74116
Multiplicity	6.9
Completeness	99.80 %
Mosaicity	0.24
I/ σ ^[4]	9.65
R-meas ^[4]	12.4
CC(1/2) ^[5]	99.8
Spot deviation	1.88
Spindle deviation	0.13

Summary

Score ^[1]	0.76
Wavelength (Å)	0.97949
Space Group ^[2]	I4(1)22
Unit Cell (Å)	202.29 202.29 103.08 90 90 90
Resolution (Å) ^[3]	1.97
All Reflections	630915
Unique Reflections	71861
Multiplicity	8.8
Completeness	95.70 %
Mosaicity	0.225
I/ σ ^[4]	9.53
R-meas ^[4]	18.4
CC(1/2) ^[5]	99.8
Spot deviation	1.69
Spindle deviation	0.12

Figure S19. Data collection and diffraction pattern of VirB8_{sp}, collected at the Canadian Light Source in Saskatoon.

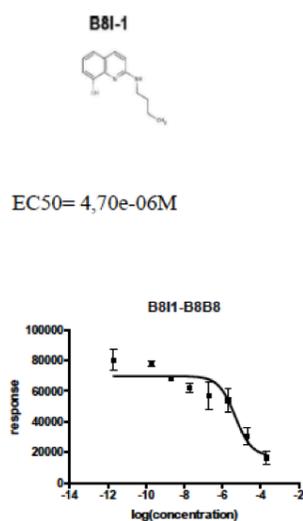


Figure S20. *E. coli* strain BTH101 expressing fusions of VirB8_{FL} to the T18 and T25 domains of adenylate cyclase was cultivated in 96-well microtiter plates in TGYEP medium, and the β -galactosidase activities reflecting the protein-protein interaction were determined in the presence of inhibitor B8I-1 at concentrations from 2 μ M to 2 mM.

