



Université de Montréal

**Caractérisation biochimique, structurale et inhibition du système de  
sécrétion de type IV par l'étude des protéines VirB8**

par  
Bastien Casu

Département de Biochimie et médecine moléculaire  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor*  
en Biochimie

Mars 2018

© Bastien Casu, 2018  
Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Caractérisation biochimique, structurale et inhibition du système de sécrétion de type IV par  
l'étude des protéines VirB8

Présentée par :

Bastien Casu

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Michel Bouvier, président-rapporteur

Christian Baron, directeur de recherche

Joelle Pelletier, membre du jury

Eric Cascales, examinateur externe

Javier Di Noia, représentant du doyen de la FESP

## Résumé

Chez tous les organismes vivants, les systèmes de sécrétion permettent le passage des macromolécules au travers des membranes cellulaires. Les bactéries à Gram-négatifs utilisent les systèmes de sécrétion de type IV (T4SS) pour réaliser une variété de processus impliqués dans les transports macromoléculaires incluant l'échange de matériel génétique.

Le plasmide pKM101 code pour un T4SS similaire aux systèmes modèles bien étudiés provenant d'*Agrobacterium tumefaciens* et de *Brucella suis*. Dans le chapitre 2, nous avons étudié la structure et la fonction de TraE, un homologue de VirB8 provenant du pKM101, qui est un composant essentiel de tous les T4SSs et qui forme des dimères fonctionnels dans le noyau des T4SSs. Une analyse par cristallographie aux rayons X a révélé une structure similaire aux autres homologues de VirB8, mais possédant une interface de dimérisation modifiée. Cette interface de dimérisation a été corroborée en réalisant des essais de double hybride chez la bactérie, une caractérisation biochimique de la protéine purifiée et des essais de complémentation *in vivo*, démontrant qu'il existe différents modes de dimérisation parmi les homologues des protéines VirB8. De plus, l'analyse des interactions par BTH et des essais de réticulations ont montré que TraE et ses homologues provenant d'*Agrobacterium*, de *Brucella* et d'*H. pylori* forment des hétérodimères. Ils interagissent également avec des protéines VirB10 hétérologues, indiquant un certain degré de plasticité au niveau des interactions protéine-protéine pour les protéines de type VirB8 (*VirB8-like*). Enfin, pour évaluer d'avantage les caractéristiques communes des protéines de type VirB8, nous avons testé une série de petites molécules dérivées d'inhibiteurs de la dimérisation de VirB8 provenant de *Brucella*. Pour cela, nous avons prouvé que ces molécules se lient à TraE de manière *in vitro*, que par une prédiction *in silico* par arrimage moléculaire, qu'elles se lient à une surface structurellement conservée chez les protéines de type VirB8 et que certaines de ces molécules inhibent *in vivo* le transfert du pKM101. Pour conclure à propos de ce chapitre, nous pouvons dire que les protéines de type VirB8 partagent ainsi des sites fonctionnellement importants et cette caractéristique pourra être exploitée pour la conception d'inhibiteurs spécifiques de la fonction des T4SSs.

L'augmentation de la fréquence de la résistance aux antimicrobiens est un problème d'importance mondiale. Le transfert plasmidique, réalisé par la fonction de conjugaison de

certaines T4SSs, est un contributeur majeur au niveau du transfert des gènes de résistance aux antimicrobiens. Dans le chapitre 3, nous avons présenté une stratégie basée sur l'analyse structurale pour identifier des inhibiteurs de la conjugaison bactérienne réalisée par les T4SSs. Pour cela, nous avons tout d'abord criblé une banque de fragments, par la technique de la fluorimétrie différentielle à balayage, et identifié des molécules qui se lient à la protéine TraE. La co-cristallisation a révélé que des fragments se lient à deux sites alternatifs dont l'un d'entre eux est un nouveau site de liaison qui n'avait jamais été mis en évidence pour les autres protéines de type VirB8. Basé sur les informations structurales obtenues par cristallographie aux rayons X, nous avons conçu de nouvelles molécules qui ont une affinité de liaison améliorée. De plus, il a été montré que ces nouvelles molécules se lient au niveau des deux sites d'inhibition de TraE, inhibent de manière *in vitro* la dimérisation de TraE et aussi de manière *in vivo* le transfert par conjugaison du pKM101. Pour conclure, la stratégie présentée dans ce chapitre est généralement applicable pour la conception d'inhibiteurs de transfert des gènes de résistance aux antimicrobiens et de la virulence bactérienne.

À ce jour, très peu d'informations sont disponibles sur les composants du T4SS liés à la membrane. Dans le chapitre 4, nous avons montré que TraE, dans sa forme entière, forme un complexe de masse moléculaire élevée distinct de la partie périplasmique de la protéine précédemment caractérisée. Ensuite, par la combinaison de la microscopie électronique et de la diffraction des rayons X aux petits angles nous avons démontré que TraE dans sa forme entière s'assemble en un complexe hexamérique avec un pore central. Nous avons également prouvé, que TraE peut se lier à TraD, qui est une protéine homologue à VirB6 provenant du pKM101, par des techniques de réticulation, de chromatographie d'exclusion stérique et de la microscopie électronique. Pour conclure, nos résultats suggèrent que TraE et TraD forment un pore au niveau du cœur central des T4SSs contribuant à la translocation du substrat.

Cette étude, qui combine plusieurs disciplines, incluant de la biochimie, de la biologie structurale ainsi que de la chimie biologique, souligne l'intérêt et l'importance d'une approche multidisciplinaire.

**Mots-clés :** plasmide, conjugaison, système de sécrétion de type IV, interaction protéine-protéine, criblage à base de fragments, conception de médicaments, résistance aux antimicrobiens, protéine de type VirB8, protéine de type VirB6, pore membranaire

## Abstract

In all organisms, secretion systems mediate the passage of macromolecules across cellular membranes. Gram-negative bacteria use type IV secretion systems (T4SS) for a variety of macromolecular transport processes that include the exchange of genetic material.

The pKM101 plasmid encodes a T4SS similar to the well-studied model systems from *Agrobacterium tumefaciens* and *Brucella suis*. In chapter 2, we studied the structure and function of TraE, a homolog of VirB8 from pKM101, that is an essential core component of all T4SS. Analysis by X-ray crystallography revealed a structure that is similar to other VirB8 homologs, but displayed an altered dimerization interface. The dimerization interface observed in the X-ray structure was corroborated using the bacterial two-hybrid assay, biochemical characterization of the purified protein and *in vivo* complementation, demonstrating that there are different modes of dimerization among VirB8 homologs. Analysis of interactions using the BTH and crosslinking assays showed that TraE and its homologs from *Agrobacterium*, *Brucella* and *H. pylori* form heterodimers. They also interact with heterologous VirB10 proteins, indicating a significant degree of plasticity of the protein-protein interactions of VirB8-like proteins. To further assess common features of VirB8-like proteins, we tested a series of small molecules derived from inhibitors of *Brucella* VirB8 dimerization. These molecules bound to TraE *in vitro*, *in silico* docking predicted that they bind to a structurally conserved surface groove of the protein and some of them inhibited pKM101 plasmid transfer. VirB8-like proteins thus share functionally important sites and these can be exploited for the design of specific inhibitors of T4SS function.

The increasing prevalence of antimicrobial resistance is a problem of global importance. Novel strategies are urgently needed to understand and inhibit antimicrobial resistance gene transmission that is mechanistically related to bacterial virulence functions. The conjugative transfer of plasmids by T4SSs is a major contributor to antimicrobial resistance gene transfer. In chapter 3, we present a structure-based strategy to identify inhibitors of T4SS-mediated bacterial conjugation. Using differential scanning fluorimetry we screened a fragment library and identified molecules that bind the essential TraE protein of the plasmid pKM101 conjugation machinery. Co-crystallization revealed that fragments bind two alternative sites of

the protein and one of them is a novel inhibitor binding site. Based on the structural information on fragment binding we designed novel small molecules that have improved binding affinity. These molecules inhibit the dimerization of TraE, bind to both inhibitor binding sites on TraE and inhibit the conjugative transfer of plasmid pKM101. The strategy presented here is generally applicable for the structure-based design of inhibitors of antimicrobial resistance gene transfer and of bacterial virulence.

X-ray crystallographic and electron microscopic analyses have increasingly provided structural information on individual T4SS components and on the entire complex. But as of now, relatively little information has been available on the membrane-bound T4SS components. The overproduction and purification of membrane proteins is intrinsically difficult making their analysis challenging. In chapter 4, we show that the membrane-bound full-length version of the VirB8 homolog TraE from the plasmid pKM101 secretion system forms a high molecular mass complex that is distinct from the previously characterized periplasmic portion of the protein. Full-length TraE was extracted from the membranes with detergents and analysis by size-exclusion chromatography, crosslinking and the combination of SEC with multi-angle light scattering show that it forms a high molecular mass complex. Electron microscopy and small-angle X-ray scattering analysis demonstrate that full-length TraE assembles into a hexameric complex with a central pore. We also show by crosslinking, SEC and electron microscopy that TraE binds to the TraD protein. Our results suggest that TraE and TraD form a pore at the core of the secretion system contributing to substrate translocation.

This study, which combined several disciplines, including biochemistry, structural biology and chemical biology, underscores the interest and significance of a multidisciplinary approach.

**Keywords** : plasmid, conjugation, type IV secretion system, protein-protein interaction, fragment-based screening, drug design, antimicrobial resistance, VirB8-like, VirB6-like, membrane pore

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières .....	v
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	x
Remerciements .....	xiii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Les trois domaines du vivant.....	1
1.1.1 Le domaine des <i>Archaea</i> (ou <i>Archaeobacteria</i> ) : les Archées .....	2
1.1.2 Le domaine des <i>Eukaryota</i> (ou <i>Eucarya</i> ) : les Eucaryotes.....	3
1.1.3 Le domaine des <i>Bacteria</i> (ou <i>Eubacteria</i> ) : les Bactéries .....	5
1.2 Les systèmes de sécrétion chez les bactéries.....	7
1.3 Les différents types de systèmes de sécrétions.....	8
1.3.1 Le système de sécrétion de type I .....	12
1.3.2 Le système de sécrétion de type II.....	15
1.3.3 Le système de sécrétion de type III.....	17
1.3.4 Le système de sécrétion de type IV.....	19
1.3.5 Le système de sécrétion de type V.....	19
1.3.6 Le système de sécrétion de type VI.....	22
1.3.7 Le système de sécrétion de type VII .....	24
1.3.8 Le système de sécrétion de type VIII.....	26
1.3.9 Le système de sécrétion de type IX.....	28
1.4 Vue d'ensemble des systèmes de sécrétions de type IV .....	30
1.4.1 Classifications des systèmes de sécrétions de type IV.....	31
1.4.2 Vue d'ensemble au niveau structural des systèmes de sécrétions de type IV .....	34
1.4.3 Description individuelle des protéines participant à l'architecture des systèmes de sécrétions de type IV.....	36
1.4.4 Aperçu au niveau structural de l'architecture des systèmes de sécrétions de type IV .....	39



1.4.5 Mécanisme d'assemblage des systèmes de sécrétions de type IV .....	46
1.4.6 Mécanisme de translocation du substrat des systèmes de sécrétions de type IV .....	48
1.5 Les protéines VirB8 étant des composantes essentielles du cœur central des systèmes de sécrétions de type IV .....	50
1.5.1 Aperçu au niveau structural des protéines VirB8 .....	50
1.5.2 Les interactions avec les protéines VirB8 dans le complexe des systèmes de sécrétions de type IV .....	52
1.5.3 Les protéines VirB8 forment des homodimères .....	53
1.5.4 Inhibition des protéines VirB8 par des petites molécules organiques.....	54
1.6 Objectifs des projets de recherche et justification de la méthodologie.....	56
1.6.1 Objectifs généraux.....	56
1.6.2 Méthodologie générale .....	57
1.6.3 Expériences de biologies structurales.....	58
1.6.4 Expériences de chimies biologiques.....	62
1.6.5 Expériences de biochimies.....	63
1.6.6 Synopsis.....	64
Chapitre 2 : Article 1 .....	65
Chapitre 3 : Article 2 .....	98
Chapitre 4 : Article 3 .....	114
Chapitre 5 : Discussion et conclusion.....	135
5.1 Caractérisation structurale de la forme périplasmique de TraE.....	135
5.2 Les protéines de type VirB8 participent à l'assemblage des T4SSs.....	138
5.3 Développement et optimisation d'inhibiteurs ciblant les protéines VirB8 .....	139
5.4 Caractérisation structurale de la forme entière de TraE.....	144
Conclusion.....	149
Bibliographie.....	150
Annexe 1 : Matériel supplémentaire du chapitre 3.....	i
Annexe 2 : Matériel supplémentaire du chapitre 4.....	vii

## Liste des figures

Figure 1.	Arbre phylogénétique universel.....	1
Figure 2.	Formes de bases des Archées.....	2
Figure 3.	Formules chimiques des phospholipides retrouvés chez les Archées ou chez les Eucaryotes/Bactéries.....	3
Figure 4.	Organisation et structure de la cellule animale.....	4
Figure 5.	Organisation et structure de la cellule végétale.....	4
Figure 6.	Organisation d'une cellule bactérienne.....	5
Figure 7.	Morphologies et arrangements cellulaires des bactéries .....	6
Figure 8.	Représentation schématique de la paroi bactérienne chez les bactéries à Gram-positifs et les bactéries à Gram-négatifs .....	7
Figure 9.	Aperçu schématique des principaux systèmes de sécrétions de protéines dans les bactéries à Gram-négatifs.....	10
Figure 10.	Diagramme général du mécanisme des systèmes de sécrétions appelés <i>chaperone-usher</i> .....	11
Figure 11.	Modèle pseudo atomique obtenu par cryo-EM de la pompe à efflux du médicament ( <i>drug efflux pump</i> ) .....	13
Figure 12.	Structures, obtenues par cryo-EM, de la pompe à efflux AcrAB-TolC stabilisée par un pont disulfure pour obtenir un canal fermé à une résolution de 6.5 Å.....	14
Figure 13.	Architecture structurale du T2SS .....	16
Figure 14.	Structure du T2SS chez <i>V. cholerae</i> , obtenue par cryo-EM à environ 3 Å de résolution, et changements conformationnels dans un état partiellement ouvert du T2SS .....	17
Figure 15.	Structures <i>in situ</i> du T3SS provenant de <i>Chlamydia</i> avec et sans contact avec la cellule hôte.....	18
Figure 16.	Vue d'ensemble schématique des T5SSs.....	21
Figure 17.	Représentation schématique de la structure et du mécanisme d'action des T6SSs.....	23
Figure 18.	Modèle des T7SSs basé sur des études réalisées chez <i>Mycobacterium</i> .....	25
Figure 19.	Reconstruction tridimensionnelle, obtenue par cryo-EM à 13 Angström de résolution, du complexe membranaire central retrouvé au niveau du ESX-5.....	26

Figure 20.	Mécanisme de formation des fimbriae .....	27
Figure 21.	Mécanisme général de translocation des substrats retrouvés au niveau des T9SS.....	29
Figure 22.	Représentation schématique du complexe central des T9SS, composé de PorKLMNP, provenant de <i>P. gingivalis</i> .....	30
Figure 23.	Les T4SSs participent à diverses fonctions chez les bactéries.....	32
Figure 24.	Représentation schématique des similarités de séquences entre les systèmes de conjugaison, les T4ASSs et les T4BSSs.....	33
Figure 25.	Modèle schématique du T4BSS provenant de <i>L. pneumophila</i> .....	34
Figure 26.	Représentation schématique du T4ASS.....	35
Figure 27.	Structures à hautes résolutions du complexe central des T4SSs retrouvées au niveau de la membrane externe des bactéries .....	42
Figure 28.	Structure du T4SS <sub>3-10</sub> obtenue par microscopie électronique à coloration négative.....	43
Figure 29.	Structure du T4SS <sub>3-10+D4</sub> obtenue par microscopie électronique à coloration négative.....	44
Figure 30.	Structures <i>in situ</i> du T4ASS provenant d' <i>H. pylori</i> et du T4BSS provenant de <i>L. pneumophila</i> .....	45
Figure 31.	Modèle de travail pour la biogenèse des T4ASSs.....	47
Figure 32.	Voie de translocation de l'ADN-T dans le T4SS VirB/D4 d' <i>A. tumefaciens</i> ...	49
Figure 33.	Représentation en ruban des structures obtenues par cristallographie aux rayons X, des domaines périplasmiques des protéines VirB8 provenant de <i>B. suis</i> et de TraM provenant de <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	51
Figure 34.	Structure cristallographique de VirB8 provenant de <i>B. suis</i> en complexe avec la molécule inhibitrice B8I-1 .....	55
Figure 35.	Croissance de la biologie structurale au cours des 40 dernières années.....	61
Figure 36.	Représentation en ruban de la structure obtenue par cristallographie aux rayons X, du domaine périplasmique de la protéine TraE provenant du pKM101.....	137
Figure 37.	Représentation en ruban de la structure, obtenue par cristallographie aux rayons X, du domaine périplasmique de la protéine VirB8 provenant de <i>B. suis</i> .....	141

Figure 38. Structures chimiques de la petite molécule organique B8I-2, étant la molécule inhibant le plus fortement VirB8 provenant de <i>B. suis</i> , encerclée par des analogues de cette molécule dénommés BAR-068 à BAR-074.....	142
Figure 39. Analyse de la réticulation du complexe formé par TraE en pleine longueur avec de l'ADN double brin.....	148

## Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

*A. tumefaciens* : *Agrobacterium tumefaciens*

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

*B. henselae* : *Bartonella henselae*

*B. pertussis* : *Bordetella pertussis*

*Brucella sp.* : *Brucella species*

Cryo-EM : *Cryo-Electron Microscopy*

DSF : *Differential Scanning Fluorimetry* - Fluorimétrie différentielle à balayage

DSS : DiSuccinimidyl Suberate

ENP : *Extracellular Nucleation-Precipitation*

*E. coli* : *Escherichia coli*

*ECM* : *ExtraCellular Matrix*

EMDB : *Electron Microscopy Data Bank*

ESX : *early secretory Ag target 6 (ESAT-6) system*

*H. pylori* : *Helicobacter pylori*

Inc : *Incompatibility group*

IRIC : Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie

*L. pneumophila* : *Legionella pneumophila*

MALS : *Multi-Angle Light Scattering* - diffusion de la lumière sous multiples angles

MFP : *Membrane Fusion Protein*

*N. gonorrhoeae* : *Neisseria gonorrhoeae*

NHS : N-hydroxysuccimide

OMF : *Outer Membrane Factor*

OMS : Organisation mondiale de la Santé

ONPG : 2-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside

PDB : *Protein Data Bank*

*P. gingivalis* : *Porphyromonas gingivalis*

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RND : *Resistance-Nodulation-Division*

SAXS : *Small-Angle X-ray Scattering* - diffusion des rayons X aux petits angles

Sec : *Secretion*

SEC : *Size-Exclusion Chromatography* - chromatographie d'exclusion stérique

T1SS : système de sécrétion de type I

T2SS : système de sécrétion de type II

T3SS : système de sécrétion de type III

T4ASS : système de sécrétion de type IVA

T4BSS : système de sécrétion de type IVB

T4CP : *Type IV Coupling Protein* - protéine de couplage des systèmes de sécrétions de type IV

T4SS : système de sécrétion de type IV

T5SS : système de sécrétion de type V

T6SS : système de sécrétion de type VI

T7SS : système de sécrétion de type VII

T8SS : système de sécrétion de type VIII

T9SS : système de sécrétion de type IX

Tat : *Twin-arginine translocation*

Transporteur ABC : Transporteur *ATP-Binding Cassette*

TrIP : Immunoprécipitation de l'ADN-T

*V. cholerae* : *Vibrio cholerae*

*Tout obstacle renforce la détermination. Celui qui s'est fixé un but n'en change pas.*  
**Léonard de Vinci**

*Rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme.*  
**Antoine Laurent de Lavoisier**

*Souvenez-vous que dans les champs de l'observation, le hasard ne favorise que les esprits préparés.*

**Louis Pasteur**

*À ma famille, mes amis et ma chère conjointe, Julie.*

# Remerciements

Pour commencer l'écriture de la partie remerciement qui est très importante à mes yeux car sans la contribution de ces nombreuses personnes qui m'ont entouré à la fois dans ma formation scientifique mais aussi au niveau de ma vie en général cette thèse n'aurait jamais été la même, je désire tout d'abord remercier mon directeur de recherche le Dr. Christian Baron qui a su être un encadrant exceptionnel ! Malgré ses tâches administratives qu'il a dû réaliser tout au long de mon doctorat, tout d'abord directeur du Département de biochimie et médecine moléculaire puis vice-doyen à la recherche et au développement au sein de la Faculté de médecine de l'Université de Montréal, il est très important de noter sa grande disponibilité à mon égard en semaine, tous les vendredis dans notre laboratoire, les fins de semaines, en vacances enfin pour résumer 24 heures sur 24 ! J'ai appris énormément de choses à ses côtés notamment j'ai amélioré mes compétences sur le point de vue technique, ma curiosité scientifique générale ainsi que l'habilité à mener mes recherches de manière indépendante. Ce que je veux aussi noter c'est son mentorat, ses encouragements, ses conseils très avisés qui ne seront jamais oubliés. Je veux aussi le remercier pour les nombreuses opportunités qu'il m'a offertes pour aller assister à des conférences scientifiques locales, nationales et internationales, et toutes les personnes qu'il m'y a présentées. Je veux finir par une dernière remarque au sujet de Christian, il a été un mentor inoubliable et qu'il restera un modèle que je veux suivre pour la suite de ma carrière.

Dans la seconde partie des remerciements, je tiens à remercier toute ma famille, mes frères et leurs compagnes, mes neveux et nièces, et bien sur mes parents. Mes parents m'ont appris tellement de choses dans la vie notamment le sens du sacrifice, ne jamais rechigner au travail et lorsque les choses deviennent compliquées c'est à ce moment-là que la vie devient intéressante ! Ils ont su me pousser à toujours m'ouvrir au monde, aiguïser mon esprit critique et aussi développer mon esprit compétitif par l'intermédiaire du sport, de la musique et bien sûr de l'éducation où ils ont toujours voulu me pousser à mon maximum car ce n'est que comme ça qu'on décroche ce que l'on veut dans la vie ! Pour toutes ces choses, je leur en suis infiniment reconnaissant ! Dans cette même partie je veux remercier mes meilleurs amis qui sont comme une seconde famille pour moi : Claire et Julien, Didier et Cindy, Hanna et Frédérique, Mickael



et Jennifer, Rémy et Marine, Sébastien et Caroline (et princesse Paola). Venant d'environnement social hétéroclite, nous apprenons toujours les uns des autres et il y a forcément une petite pierre qui vient d'eux dans ce bel édifice que représente une thèse.

Dans un troisième temps, je tiens à remercier tous les collaborateurs scientifiques ou autres qui m'ont aidé à mener à bien ce doctorat. Je tiens donc à remercier tous les collaborateurs impliqués dans mes articles scientifiques : Jonathan Smart, Mark A. Hancock, Mark Smith, Jurgen Sygusch, Tarun Arya, Benoit Bessette, Charline Mary, Aurélien Fouillen, Aleksandr Sverzhinsky et Antonio Nanci. Je tiens plus particulièrement à remercier Dr. Jurgen Sygusch qui m'a énormément apporté scientifiquement et humainement notamment pour conforter mes connaissances de cristallographie aux rayons X. Il m'a enseigné le SAXS et il m'a permis de partager d'excellents moments que ce soit autour d'un bon repas ou en plein milieu de la nuit lors de nos nombreux voyages aux synchrotrons de Brookhaven ou de Cornell. Je tiens également à remercier chaleureusement Dr. Antonio Nanci et Dr. Elitza Tocheva, ils m'ont ouvert l'esprit sur le magnifique monde de la microscopie électronique. Je tiens aussi à remercier d'autres collaborateurs scientifiques notamment Dr. James Omichinski, Dr. Mike Osborne et Dr. Laurent Volpron qui m'ont permis de travailler sur des projets impliquant de la RMN. J'adresse également des remerciements tout particuliers aux membres du laboratoire d'enseignement de Biochimie Sébastien Truche, Shona Teijeiro et Philippe Lampron et à la responsable des laboratoires informatiques Marie Pageau, qui m'ont donné l'opportunité d'enseigner pendant mes cinq années de doctorat. Je veux bien sûr ne pas oublier d'être très reconnaissant envers les membres de mon comité de thèse Dr. Joëlle Pelletier et Dr. Jacques Drouin qui m'ont suivi pendant tout mon cursus doctoral et qui m'ont apporté de nombreux commentaires et conseils non négligeables. Mes remerciements vont également aux membres de mon jury pour avoir accepté de corriger ma thèse.

Au cours des années passées à l'Université de Montréal, j'y ai rencontré une multitude de personnes qui m'ont rendu mes journées plus agréables : tous les membres des laboratoires Baron, Sygusch, Nanci, Tocheva, Omichinski, Ferbeyre, Chartrand, Pascal, Legault, Brisson, Pelletier, Zenklusen et bien d'autres. Je tiens plus spécialement à remercier mes « gars sûrs » avec qui j'ai partagé de nombreux cafés où le monde scientifique et le monde en général a été pas mal passé en revue Jonathan Smart, Tarun Arya, Jaafar Amro, Heddy Soufari, Dursun

Nizam Korkut et Zakaria Jemouai. Sans oublier les amis sans qui ma vie au Québec n'aurait pas été aussi enrichissante Paul et Marissa, Normand et Alexandra, Thomas et Virginie (sans oublier Nicolas), Mathieu, Camila et bien d'autres encore.

Pour finir cette partie, je tiens à remercier la personne qui partage ma vie Julie Briot. Elle est aussi une étudiante en doctorat et donc nous avons pu partager les mêmes étapes de notre processus toujours ensemble. Pour ne citer qu'une étape, je repense à notre premier oral devant la communauté scientifique en anglais lors de la journée du Géprom 2014. Je te remercie d'avoir toujours été présente, à l'écoute et d'être qui tu es tout simplement. Ton support dans de nombreuses circonstances est toujours un atout. Un fameux dicton dit que « derrière un grand homme se cache une grande femme » je trouve que ça correspond parfaitement à notre situation. Durant toutes ces années de vie commune, tu as su être une épaule sur qui me reposer mais surtout un vrai rayon de soleil avec qui j'ai partagé fous rires, moments de vie et aventures. À tes côtés et j'en suis persuadé, nos projets de vie future n'en seront que plus merveilleux !

# Chapitre 1 : Introduction

## 1.1 Les trois domaines du vivant

Le vivant est classé depuis l'Antiquité. Les critères de classification ont été dirigés par les besoins des hommes, guidés par leurs croyances et liés aux progrès des techniques scientifiques d'observation et d'identification aboutissant la plupart du temps à un système dichotomique (animal/végétal, multicellulaire/unicellulaire ou cellule à noyau/cellule sans noyau). À partir de 1977 et suite à l'introduction du concept des Archées (Woese & Fox, 1977), Carl Woese distingue trois domaines du vivant : le domaine des Archées, des Eucaryotes et des Bactéries (Fig. 1) (Woese, Kandler, & Wheelis, 1990).

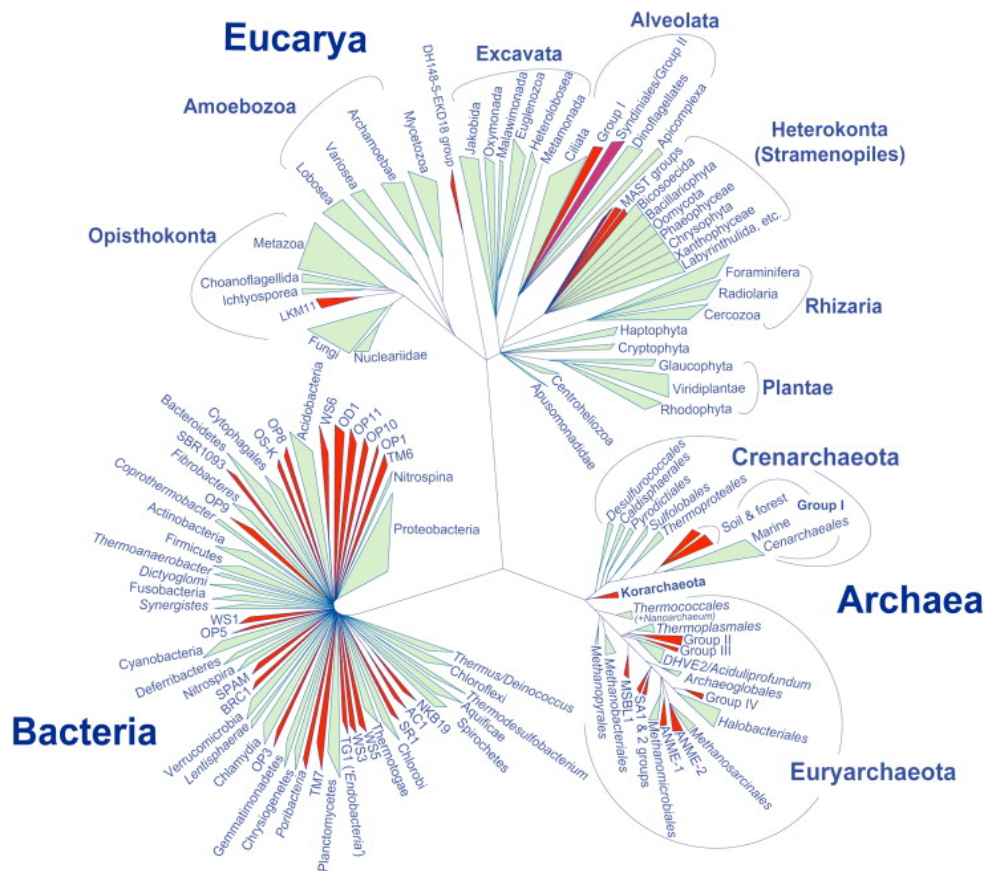


Figure 1. Arbre phylogénétique universel. Image adaptée de (Lopez-Garcia & Moreira, 2008).

### 1.1.1 Le domaine des *Archaea* (ou *Archaeobacteria*) : les Archées

En apparence, les archées se distinguent difficilement d'une bactérie, taille similaire et présence de flagelles protéiques permettant leur déplacement (Fig. 2). De plus, elles possèdent un chromosome circulaire et plusieurs éléments extrachromosomiques tels que les plasmides. Néanmoins, dès leur découverte, les Archées présentaient des caractéristiques totalement inédites et surprenantes au niveau moléculaire et biochimique. Elles sont notamment très proches des Eucaryotes au niveau moléculaire, où elles partagent de nombreuses protéines homologues particulièrement au niveau des protéines impliquées dans le traitement de l'information génétique (réplication, réparation et transcription de l'acide désoxyribonucléique (ADN)). Pour finir, les Archées possèdent des caractéristiques uniques telles que leur paroi par exemple qui est souvent constituée d'une couche protéique inédite appelée la S-Layer, ainsi que leur membrane composée de phospholipides qui sont des éthers d'acide gras et non des esters comme retrouvés chez les Eucaryotes et les Bactéries (Fig. 3). Il existe même des lipides particuliers à deux têtes qui forment une monocouche lipidique, contrairement à la bicouche lipidique classique.

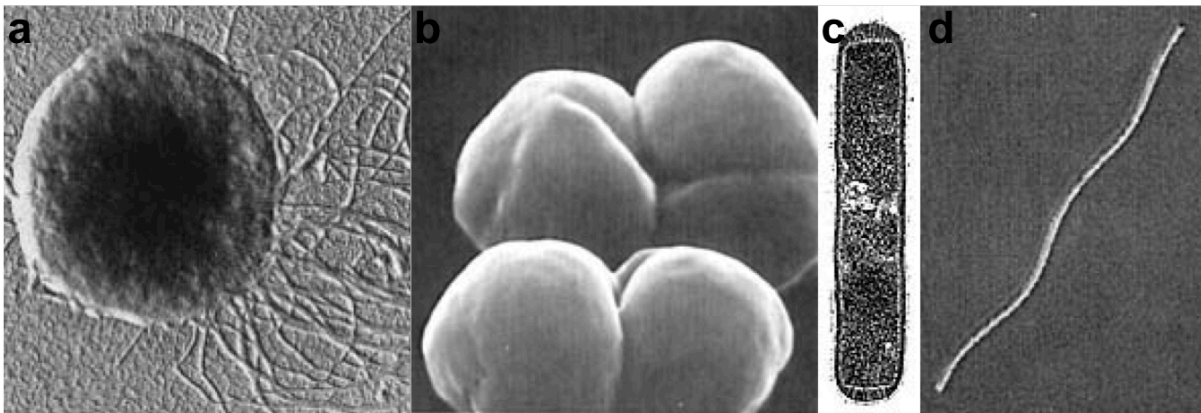


Figure 2. Formes de bases des Archées. a) *Methanococcus janaschii* b) *Methanosarcina barkeri* c) *Methanothermus fervidus* d) *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Images adaptées du site internet suivant <http://www.ucmp.berkeley.edu/archaea/archaeamm.html>.

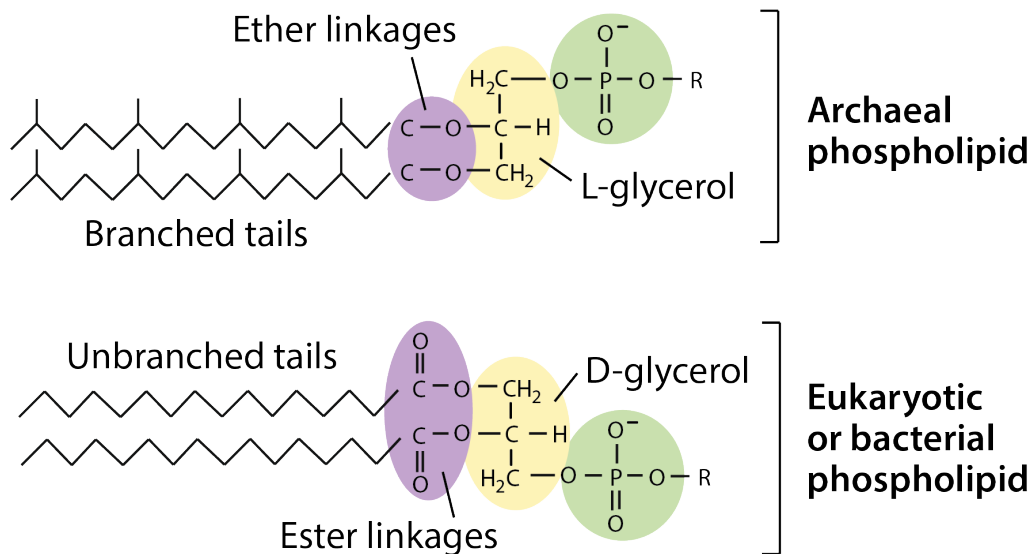


Figure 3. Formules chimiques des phospholipides retrouvés chez les Archées ou chez les Eucaryotes/Bactéries. Image adaptée du site internet suivant <https://www.khanacademy.org/science/biology/bacteria-archaea/prokaryote-structure/a/prokaryote-structure>.

### 1.1.2 Le domaine des *Eukaryota* (ou *Eucarya*) : les Eucaryotes

Les eucaryotes sont un domaine regroupant tous les organismes (animaux, plantes, champignons), unicellulaires ou pluricellulaires, qui se caractérise par la présence d'un noyau. Les cellules eucaryotes sont délimitées par une membrane pour les animaux (Fig. 4) ou par une membrane et une paroi pour les végétaux (Fig. 5). Par opposition aux archées et aux bactéries, les cellules eucaryotes possèdent des organites divisant l'espace cellulaire en compartiments spécialisés tels que le noyau, les mitochondries, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et bien d'autres compartiments. De plus, les cellules eucaryotes disposent d'un cytosquelette complexe, un ADN divisé en plusieurs chromosomes, une division cellulaire appelée mitose et une véritable reproduction sexuée pour la majorité des eucaryotes.

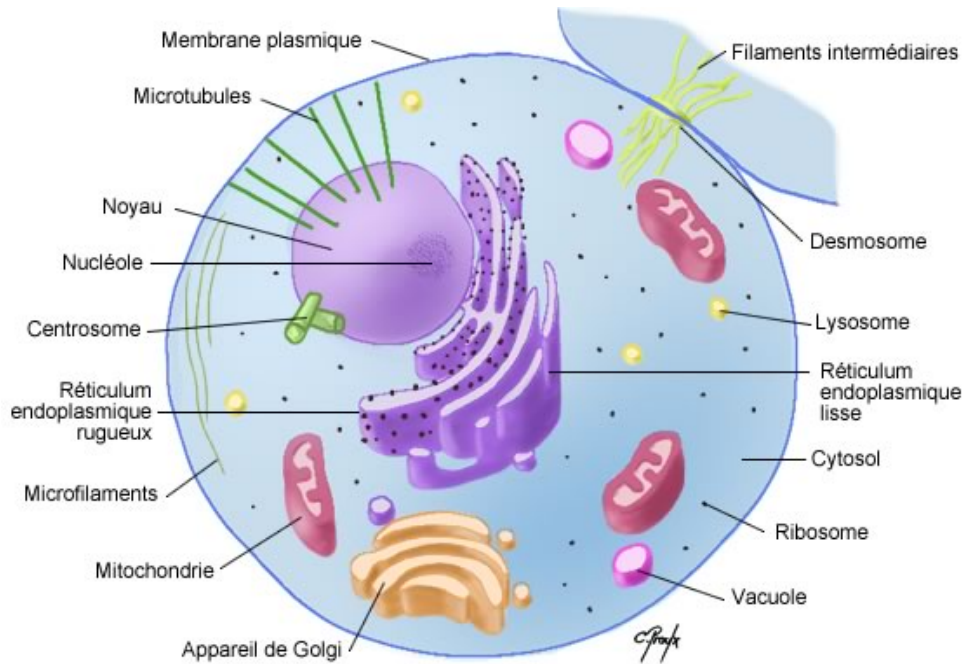


Figure 4. Organisation et structure de la cellule animale. Image adaptée du site internet suivant <http://www.cours-pharmacie.com/biologie-cellulaire/cellules-procaryotes-et-cellules-eucaryotes.html> et créée par Chantal Proulx.

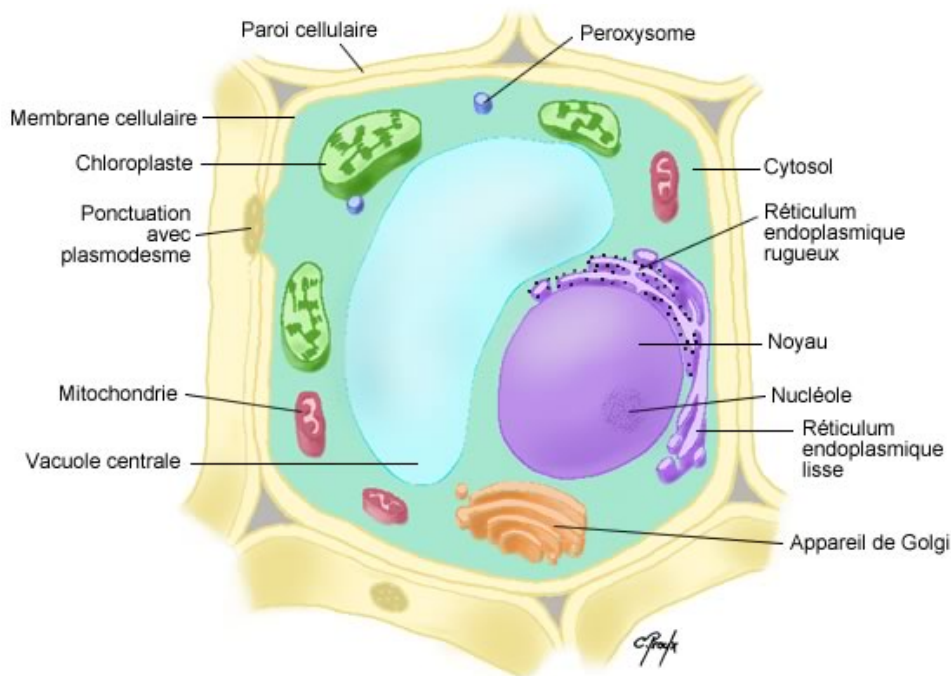


Figure 5. Organisation et structure de la cellule végétale. Image adaptée du site internet suivant <http://www.cours-pharmacie.com/biologie-cellulaire/cellules-procaryotes-et-cellules-eucaryotes.html> et créée par Chantal Proulx.

### 1.1.3 Le domaine des *Bacteria* (ou *Eubacteria*) : les bactéries

Les bactéries sont le plus souvent des micro-organismes unicellulaires (parfois pluricellulaires pour les bactéries filamenteuses), dépourvues d'organites, capables de croître et de se diviser rapidement. Elles sont caractérisées par l'organisation de leur ADN en un ou plusieurs chromosomes, non inclus dans une structure membranaire, et en éléments circulaires appelés plasmides. Elles possèdent aussi des ribosomes qui sont uniformément distribués dans le cytoplasme (Fig. 6).

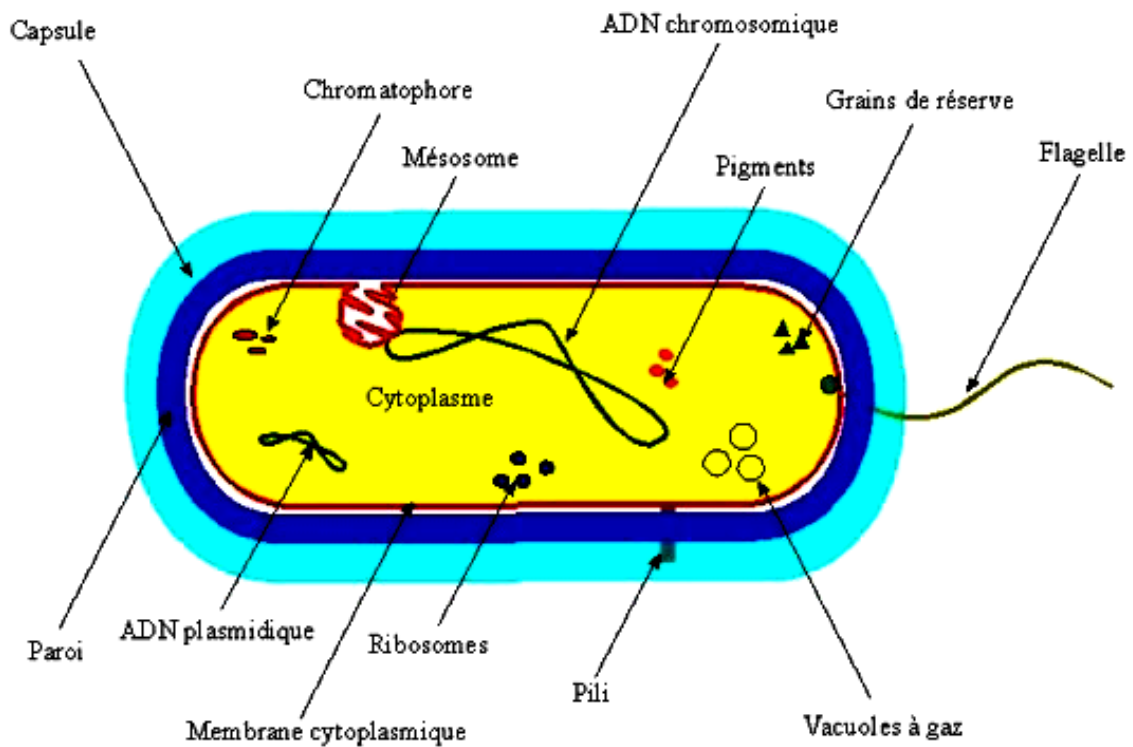


Figure 6. Organisation d'une cellule bactérienne. Image adaptée du site internet suivant <https://lelaboratoireaquestionstpe.wordpress.com/comment-ca-marche/les-bacteries/>.

Les bactéries les plus grosses mesurent plus de 5  $\mu\text{m}$ . Elles présentent de nombreuses formes telles que des formes sphériques (coques), allongées ou en bâtonnets (bacilles), des formes plus ou moins spiralées (Fig. 7).

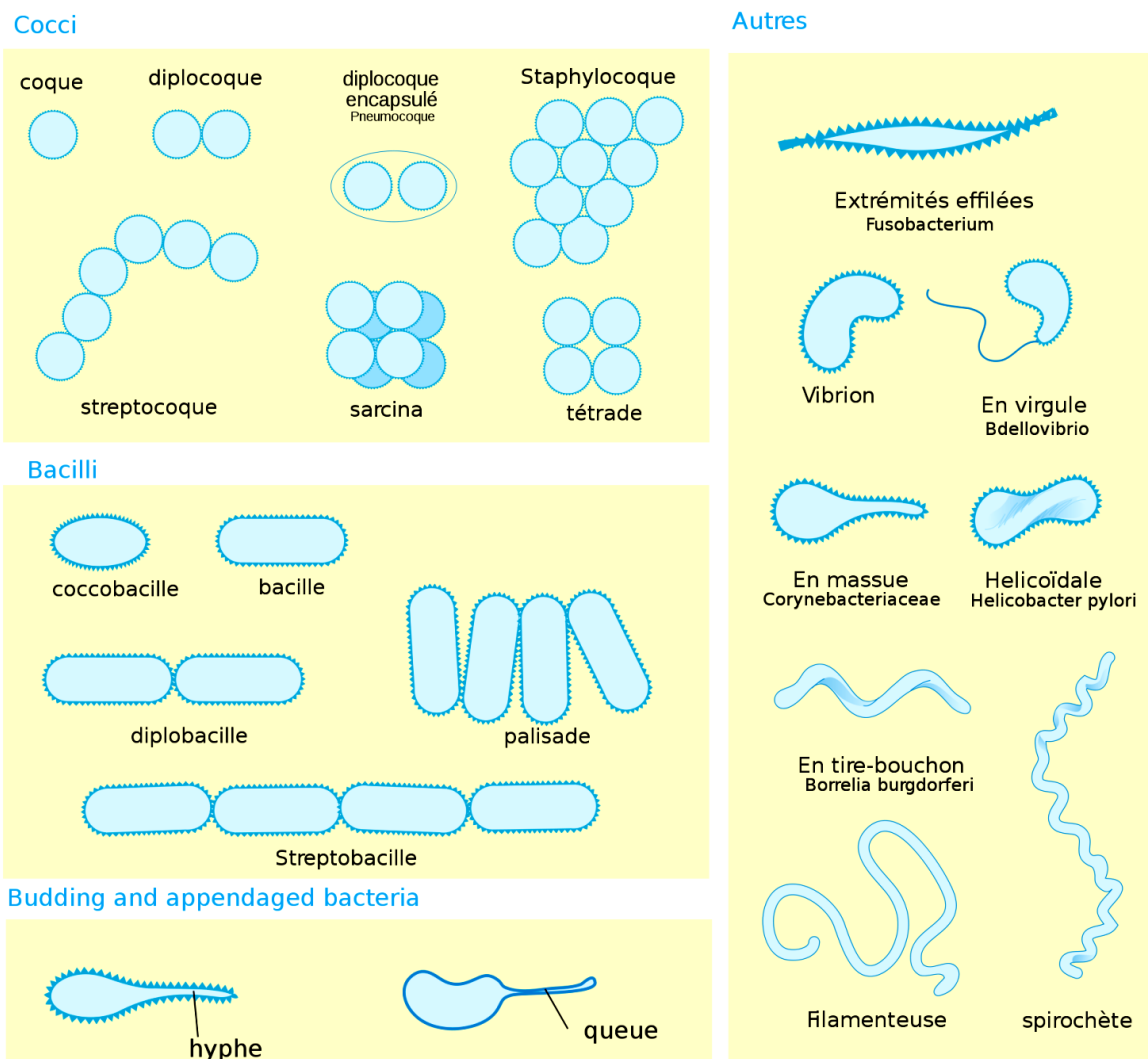


Figure 7. Morphologies et arrangements cellulaires des bactéries. Image adaptée du site internet [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bacterial\\_morphology\\_diagram\\_fr.svg?uselang=fr](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bacterial_morphology_diagram_fr.svg?uselang=fr) et créée par Mariana Ruiz Villareal.

Une caractéristique importante des bactéries est la paroi cellulaire qui d'une part donne à la bactérie sa forme et d'autre part la protège contre l'éclatement sous l'effet de la très forte pression osmotique du cytosol. La structure de la paroi cellulaire a été mise en évidence par un caractère empirique, la coloration de Gram. Les bactéries peuvent être structurellement divisées



en deux groupes, les bactéries à paroi unimembranée aussi connues sous le nom de bactéries à Gram-positifs et les bactéries à paroi bimembranée aussi dénombrées bactéries à Gram-négatifs (Fig. 8). Au sein de ces deux groupes, la paroi bactérienne est composée de peptidoglycane cependant chez les bactéries à Gram-positifs cette paroi apparaît être plus épaisse et l'acide lipotéichoïque ancre la paroi cellulaire à la membrane cellulaire. De plus chez les bactéries à Gram-négatifs, la paroi cellulaire est entourée d'une membrane externe contenant des lipopolysaccharides, des lipoprotéines et des porines permettant le passage de substances au travers cette membrane.

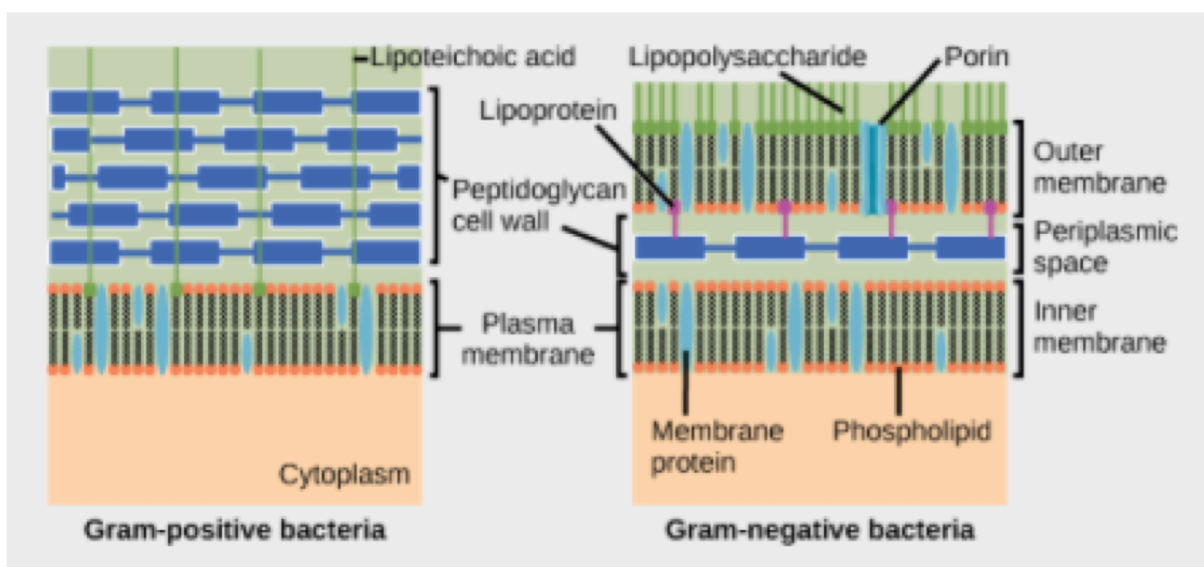


Figure 8. Représentation schématique de la paroi bactérienne chez les bactéries à Gram-positifs et les bactéries à Gram-négatifs. Image adaptée du site internet suivant [http://cnx.org/contents/GFy\\_h8cu@9.87:nnx1QFeU@11/Structure-of-Prokaryotes#fig-ch22\\_02\\_07](http://cnx.org/contents/GFy_h8cu@9.87:nnx1QFeU@11/Structure-of-Prokaryotes#fig-ch22_02_07).

## 1.2 Les systèmes de sécrétion chez les bactéries

L'exportation des protéines et les systèmes de sécrétion sont essentiels pour les bactéries que ce soit pour l'utilisation de leurs facteurs de virulence ou pour les nutriments donc pour leur survie (Alvarez-Martinez & Christie, 2009; Marlovits & Stebbins, 2010; Mudrak & Kuehn, 2010; Rambow-Larsen, Petersen, Gourley, & Splitter, 2009). La translocation des protéines est

un transport actif, nécessitant un apport énergétique, à travers la bicouche lipidique au périplasma, vers la surface ou dans l'environnement extérieur de la bactérie (Holland, 2004). L'exportation des protéines est un transport actif qui a pour but de faire passer les protéines du cytoplasme vers le périplasma (Randall & Hardy, 1984). De nos jours, on décrit deux voies principales pour transloquer des protéines à travers la membrane cytoplasmique, la voie de Sec (*Secretion*) et la voie de Tat (*twin-arginine translocation*) (Natale, Bruser, & Driessen, 2008). Et enfin la sécrétion des protéines est réalisée en utilisant des complexes multiprotéiques appelés systèmes de sécrétion. Les bactéries utilisent aussi ces systèmes de sécrétion pour sécréter différents types de substrats tels que des petites molécules, des complexes nucléoprotéiques et de l'ADN. Ces substrats jouent des rôles clés au niveau de l'adaptation à l'environnement, l'adhésion aux cellules, la survie et la pathogénicité des bactéries. Actuellement, il existe huit systèmes de sécrétion retrouvés à la fois chez les bactéries à Gram-positifs et à Gram-négatifs appelés systèmes de sécrétion de type I à IX (Costa et al., 2015; Desvaux, Hebraud, Talon, & Henderson, 2009; Fronzes, Christie, & Waksman, 2009; Green & Meccas, 2016).

### **1.3 Les différents types de systèmes de sécrétion**

Généralement, les systèmes de sécrétions sont classés en fonction de leur organisation génomique et de leur similarité de séquence. De plus, du fait de l'existence des bactéries à Gram-négatifs et à Gram-positifs, cette différence au niveau de leurs membranes respectives résulte en une architecture différente au niveau des systèmes de sécrétions (Gerlach & Hensel, 2007; Lycklama & Driessen, 2012; Palmer & Berks, 2012). Usuellement, chez les bactéries à Gram-négatifs, deux catégories de complexe de systèmes de sécrétions sont décrites (Fronzes, Christie, et al., 2009). Au niveau du premier groupe, le complexe de sécrétion s'étend sur les membranes interne et externe et il est observé pour les systèmes de sécrétions de type I (T1SS), II (T2SS), III (T3SS), IV (T4SS) et VI (T6SS). Pour le second groupe, le complexe du système de sécrétion se situe au niveau de la membrane externe et il est retrouvé dans les systèmes de sécrétions de type V (T5SS) (Fig. 9) (Desvaux et al., 2009). Outre le T5SS, le système de sécrétion bactérien appelé *chaperone-usher* est localisé aussi au niveau de la membrane externe. Ce système de sécrétion sert à l'élaboration d'appendices de surface cellulaire non flagellaires appelés type 1

pili et P pili (Fig. 10) (Busch & Waksman, 2012; Rego, Chandran, & Waksman, 2010). Ces appendices multiprotéiques sont impliqués dans la virulence et dans la formation des biofilms des bactéries à Gram-négatifs grâce à la reconnaissance et à l'adhésion des cellules hôtes (Hospenthal, Costa, & Waksman, 2017; Lillington, Geibel, & Waksman, 2014, 2015; Pratt & Kolter, 1998; Wright, Seed, & Hultgren, 2007). Le système de sécrétion de type VII (T7SS) est retrouvé uniquement chez les bactéries à Gram-positifs. Ce système de sécrétion a été identifié tout d'abord chez *Mycobacterium* et il est retrouvé aussi chez *Staphylococcus* (Zoltner, Fyfe, Palmer, & Hunter, 2013). Hormis le fait que *Mycobacterium* est une bactérie à Gram-positif, l'architecture de son enveloppe est similaire à celle des bactéries à Gram-négatifs et le T7SS s'étend sur l'enveloppe entière (Houben, Korotkov, & Bitter, 2014; Jackson, 2014; Marrakchi, Laneelle, & Daffe, 2014). Le système de sécrétion de type VIII (T8SS) aussi appelé la voie de la *extracellular nucleation-precipitation* (ENP) chez les bactéries à Gram-négatifs est impliqué dans la biogenèse des fimbriae. Ces fimbriae sont des appendices cellulaires intervenant dans le mécanisme d'adhérence bactérienne (Gibson, White, Rajotte, & Kay, 2007; Hospenthal et al., 2017). Pour finir, le système de sécrétion de type IX (T9SS), récemment découvert, est un complexe de translocon retrouvé seulement chez certaines espèces provenant du super-embranchement (*superphylum*) *Fibrobacteres-Chlorobi-Bacteroidetes* (Lasica, Ksiazek, Madej, & Potempa, 2017; Veith, Glew, Gorasia, & Reynolds, 2017).

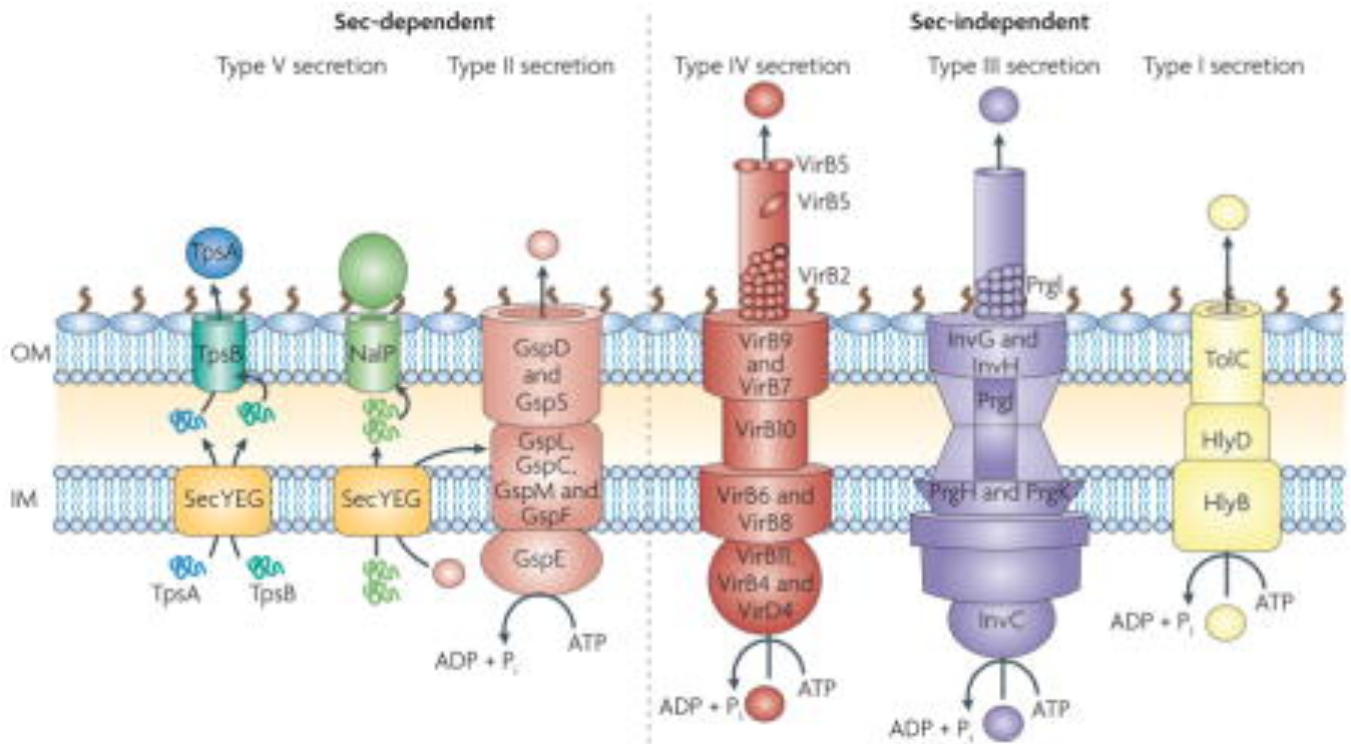


Figure 9. Aperçu schématique des principaux systèmes de sécrétions de protéines dans les bactéries à Gram-négatifs. Image adaptée de (Fronzes, Christie, et al., 2009).

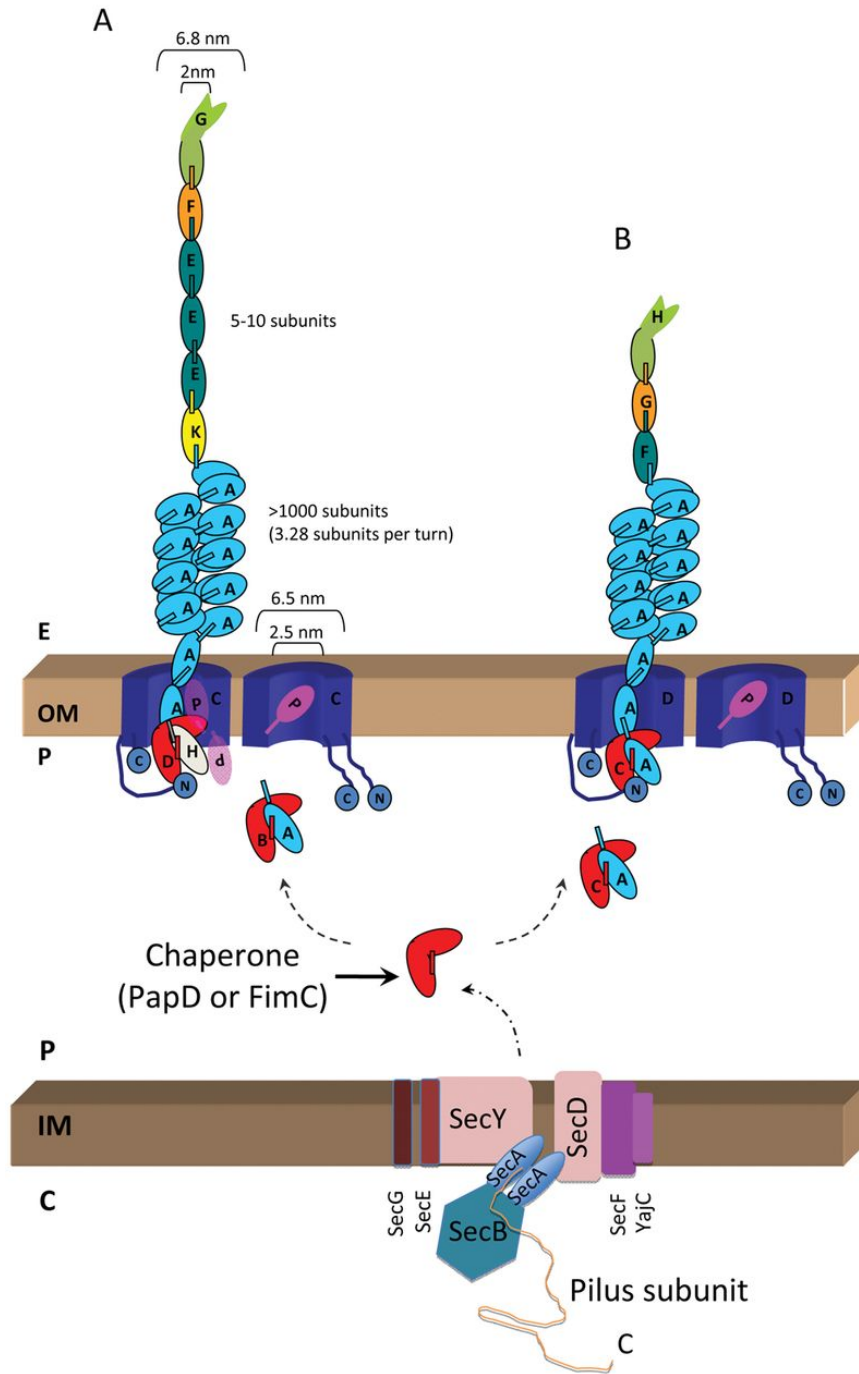


Figure 10. Diagramme général du mécanisme des systèmes de sécrétions appelés *chaperone-usher*. A) Diagramme du P pilus et B) diagramme du type I pilus représentant toutes les sous-unités impliquées au niveau de la membrane externe. Image adaptée de (Rego et al., 2010).

### 1.3.1 Le système de sécrétion de type I

Les T1SSs ont été retrouvés dans un grand nombre de bactéries à Gram-négatifs, y compris les agents pathogènes des plantes et des animaux, où ils transportent leurs substrats à l'aide d'un processus en une seule étape à travers les membranes bactériennes internes et externes (Thomas, Holland, & Schmitt, 2014). Les T1SSs peuvent être illustrés par exemple par la sécrétion des hémolysines retrouvées chez *Escherichia coli* (*E. coli*) qui est composé d'un système simple et tripartite (Fig. 9). Ils consistent en un transporteur *ATP-binding cassette* (transporteur ABC) au niveau de la membrane interne, une protéine de fusion membranaire (MFP : *membrane fusion protein*) formant un pont entre les membranes internes et externes, et un facteur de membrane externe (OMF : *outer membrane factor*) retrouvé au niveau de la membrane externe. Le transporteur ABC a plusieurs fonctions, dont l'hydrolyse de l'ATP pour fournir l'énergie pour effectuer la translocation des substrats à travers la membrane, il interagit avec la MFP et enfin il participe à la reconnaissance du substrat (Balakrishnan, Hughes, & Koronakis, 2001; Kanonenberg, Schwarz, & Schmitt, 2013). Les T1SSs sont étroitement liés à la famille de pompe à efflux des multiples médicaments appelée *resistance-nodulation-division* (RND). Les RNDs participent à l'efflux des molécules hors de la cellule et sont importants pour la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram-négatifs (Murakami, Nakashima, Yamashita, & Yamaguchi, 2002; Nakashima, Sakurai, Yamasaki, Nishino, & Yamaguchi, 2011; Piddock, 2006). Il y a quelques années une première structure des T1SSs, obtenue par cryomicroscopie électronique (Cryo-EM : *cryo-electron microscopy*) à une résolution de 16 Å, a permis de révéler un canal continu et de confirmer que les T1SSs s'étendent bien au niveau des membranes internes et externes des bactéries à Gram-négatifs (Fig. 11) (Du et al., 2014). Très récemment, des nouvelles structures des T1SSs, obtenues par cryo-EM à plus haute résolution, de 3.6 Å à 6.5 Å, ont permis de capturer différents états conformationnels de la pompe à efflux (Fig. 12) (Z. Wang et al., 2017).

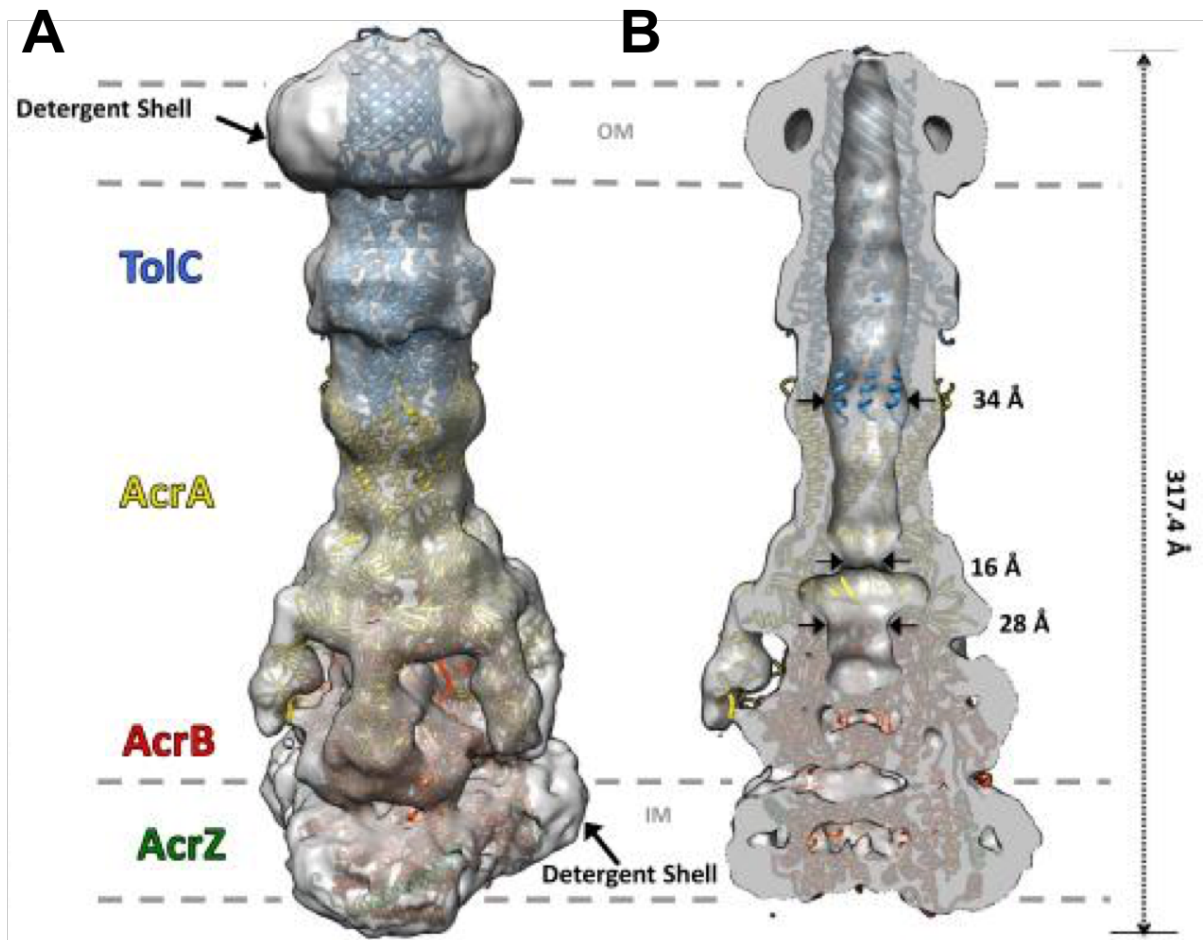


Figure 11. Modèle pseudo atomique obtenu par cryo-EM de la pompe à efflux du médicament (*drug efflux pump*). A) Superposition de la carte de densité électronique de la pompe à efflux AcrA-AcrB-AcrZ-TolC et des structures à hautes résolutions obtenues par cristallographie aux rayons X d'AcrA (*Protein data bank* (PDB) code : 2F1M), AcrB (PDB code : 4CDI), AcrZ (PDB code : 4C48) et TolC (PDB code : 2XMN). B) Vue à travers la reconstruction et le modèle montrant le canal continu à travers la paroi cellulaire. Image adaptée de (Du et al., 2014).

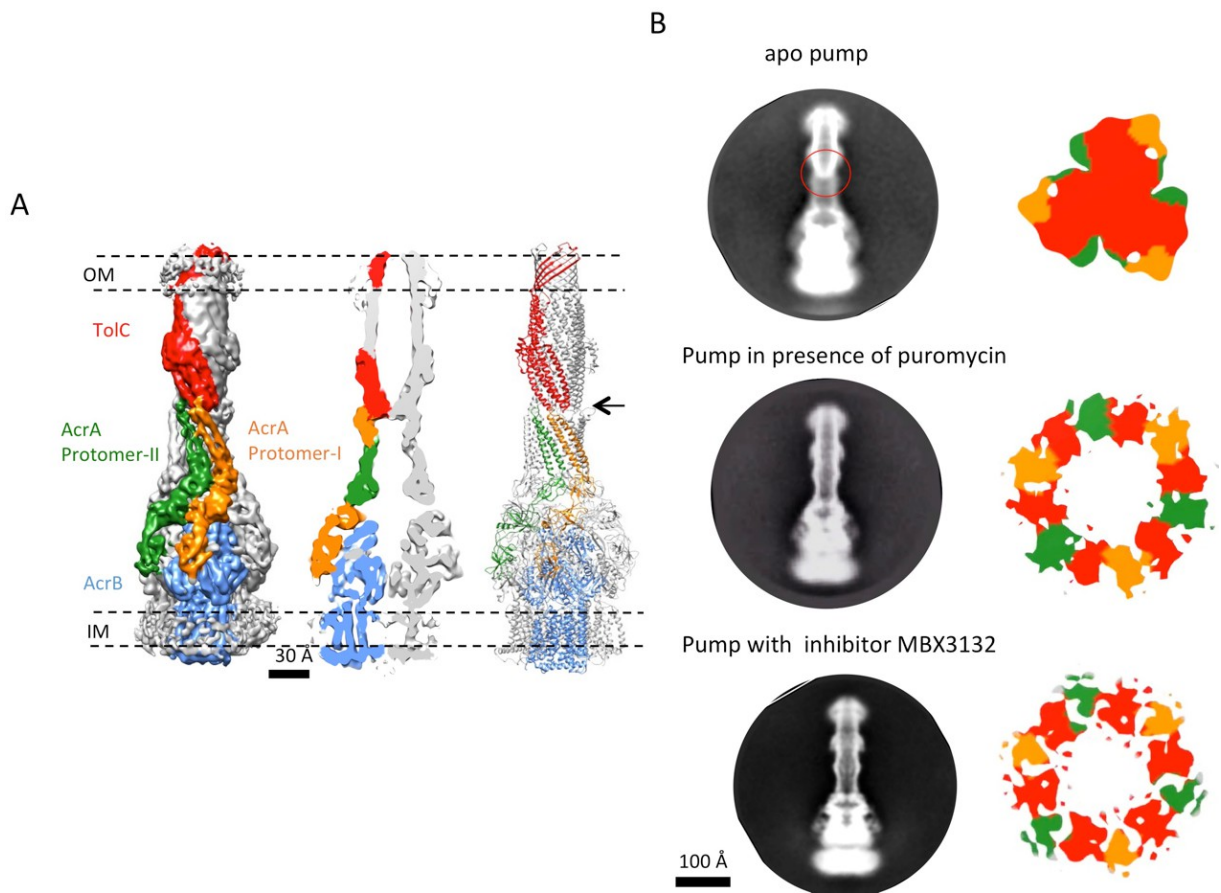


Figure 12. Structures, obtenues par cryo-EM, de la pompe à efflux AcrAB-TolC stabilisée par un pont disulfure pour obtenir un canal fermé à une résolution de 6.5 Å. A) À gauche de l'image est représentée la carte de densité électronique de la pompe à efflux avec TolC (représentée en rouge) dans un état fermé, AcrA (représentée en vert et en orange) et AcrB (représentée en bleu). Au centre est montrée une vue en coupe de la pompe à efflux montrant le canal fermé. Sur la droite, une représentation en ruban de la pompe à efflux est représentée. B) Comparaison des classes 2D moyennes obtenues pour la pompe à efflux dans sa forme fermée (en haut), en présence de puromycine (au milieu) et de l'inhibiteur MBX3132 (en bas). Image adaptée de (Z. Wang et al., 2017).



### 1.3.2 Le système de sécrétion de type II

Le T2SS est une nanomachine multiprotéique constituée de 12 à 15 composants qui s'étend au niveau des membranes internes et externes des bactéries (Korotkov, Sandkvist, & Hol, 2012; Reichow, Korotkov, Hol, & Gonen, 2010). Les T2SSs sont retrouvés dans des centaines de bactéries à Gram-négatifs, incluant des espèces pathogéniques, et ils secrètent des substrats de l'espace périplasmique vers l'environnement extérieur (Nivaskumar & Francetic, 2014). Les T2SSs sont responsables de la sécrétion de toxines vitales telle que la toxine cholérique provenant de *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*) par exemple (Sandkvist et al., 1997). Les T2SSs utilisent un mécanisme de translocation en deux étapes. Au cours de la première étape, la protéine effectrice traverse la membrane interne par l'intermédiaire des systèmes de translocations Sec ou Tat (Gold, Duong, & Collinson, 2007; Voulhoux et al., 2001). Une fois dans le péricytoplasme, la protéine effectrice est transloquée par le T2SS à travers la membrane externe. Il y a quelques années, la structure du T2SS au niveau de l'espace membranaire externe chez *V. cholerae* a été résolue, par cryo-EM, à une résolution de 19 Å (Fig. 13) (Reichow et al., 2010). Cette structure a une organisation dodecamérique avec un canal central qui possède une porte au niveau de l'espace périplasmique. Récemment, des nouvelles structures de cryo-EM de ce même complexe des T2SSs, au niveau de sa portion externe, ont été obtenues à plus hautes résolutions allant jusqu'à environ 3 Å de résolution (Fig. 14) (Yan, Yin, Xu, Zhu, & Li, 2017). Ces nouvelles structures ont permis de révéler des détails conformationnels des T2SSs notamment au niveau du mécanisme d'ouverture et de fermeture qui se déroule lors de la translocation des substrats. Malgré le fait que la plupart des composants des T2SSs ont pu être caractérisés individuellement ou au niveau du complexe retrouvé dans l'espace périplasmique et la membrane externe des bactéries, il reste cependant de nombreuses inconnues structurales notamment au niveau de la membrane interne des bactéries et du compartiment cytoplasmique (Korotkov et al., 2012; Nivaskumar & Francetic, 2014; Yan et al., 2017).

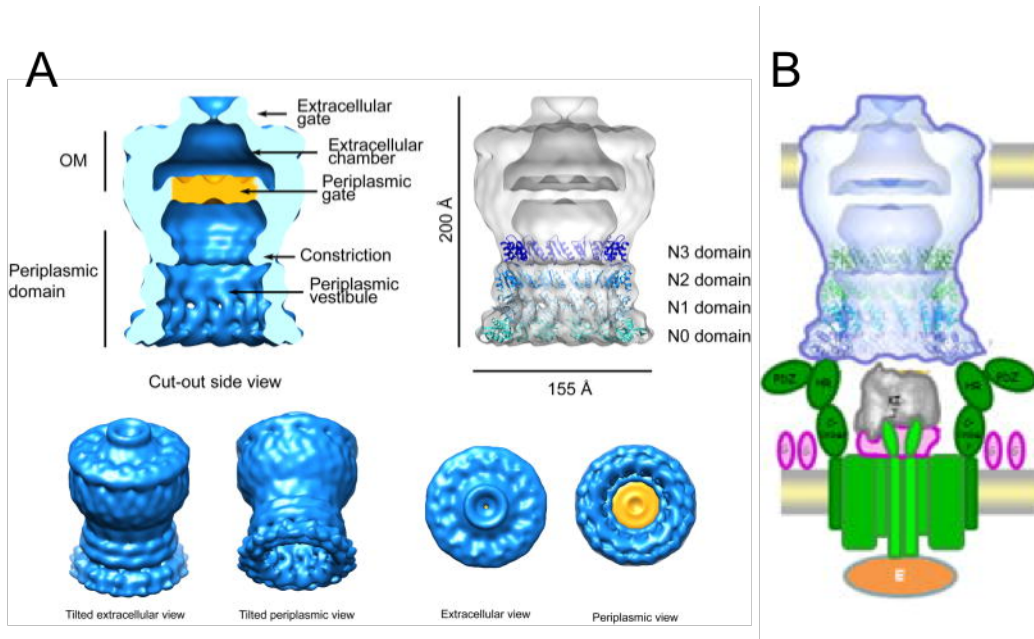


Figure 13. Architecture structurale du T2SS. A) Reconstruction Cryo-EM de la sécrétine GspD retrouvée chez *V. cholerae* obtenue à 19 Å de résolution. La vue en coupe dévoile le vestibule périplasmique, une constriction, la porte périplasmique, une chambre extracellulaire et une porte extracellulaire. Le panneau de droite montre la superposition des modèles en anneaux pour les domaines N-terminaux de GspD et la carte de densité électronique obtenue par cryo-EM. Les vues d'en bas du panneau présentent des vues de surfaces du complexe externe des T2SSs. B) Modèle moléculaire du T2SS. Les composants du système sont présentés en orange pour l'ATPase E, en vert pour la plateforme des protéines retrouvées au niveau de la membrane interne, en argent pour le pseudopilus KI, en rose pour la pseudopiline G et en bleu, cyan et violet pour le canal formé par GspD. Image adaptée de (Reichow et al., 2010).

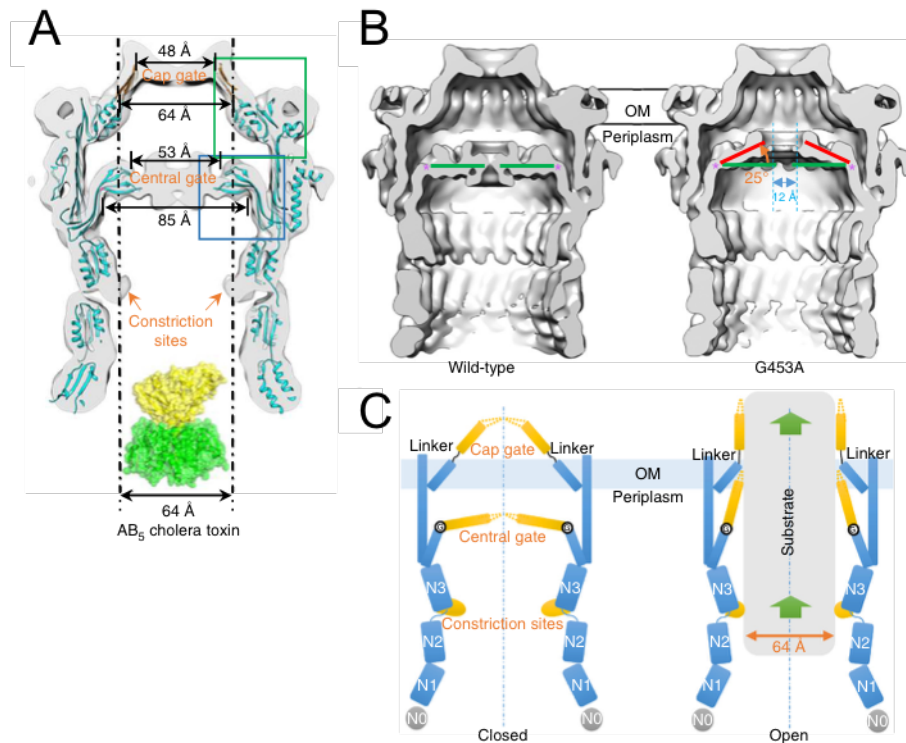


Figure 14. Structure du T2SS chez *V. cholerae*, obtenue par cryo-EM à environ 3 Å de résolution, et changements conformationnels dans un état partiellement ouvert du T2SS. A) Vue de coupe du modèle du T2SS superposé avec la carte de densité électronique calculée par cryo-EM. En jaune et vert est représentée la toxine cholérique. B) Vues de coupes du T2SS dans son état sauvage, sur la gauche, et du T2SS variant G453A, sur la droite, permettant de visualiser un état partiellement ouvert. C) Diagramme schématique montrant le mécanisme d'ouverture de la porte périplasmique dans des états fermés, sur la gauche, et ouverts, sur la droite. Image adaptée de (Yan et al., 2017).

### 1.3.3 Le système de sécrétion de type III

Les T3SSs sont retrouvés dans un grand nombre d'agents pathogènes faisant partie des bactéries à Gram-négatifs (Buttner, 2012; Mota & Cornelis, 2005). Les T3SSs ont été décrits comme « injectisomes » et comme des « instruments en aiguilles et seringues » du fait de leur structure (Blocker et al., 2001; Cornelis, 2006; Deng et al., 2017; Kubori et al., 1998). Ils permettent le transfert de protéines de virulence dans le cytoplasme des cellules eucaryotes de manière indépendante du système Sec (Cornelis & Van Gijsegem, 2000). Les T3SSs sont génétiquement, structurellement et fonctionnellement reliés aux systèmes des flagelles

bactériennes (Cornelis & Van Gijsegem, 2000). Ils sont composés de plus de 20 protéines différentes qui forment une nanomachine traversant l'enveloppe des cellules bactériennes (Abrusci, McDowell, Lea, & Johnson, 2014; Burkinshaw & Strynadka, 2014; Galan & Wolf-Watz, 2006). Des structures, obtenues par cryotomographie électronique, intactes et *in situ* du T3SS provenant de *Chlamydia trachomatis*, ont été reportées dans des états liés ou non avec la cellule hôte (Fig. 15) (Nans, Kudryashev, Saibil, & Hayward, 2015). Cette étude a révélé des changements synergiques dans les compartiments du T3SS comprenant l'aiguille, le corps basal et le complexe cytoplasmique appelé ATPase-sortante. Cette investigation a suggéré que le T3SS fonctionne comme une seringue moléculaire et que le corps basal sera bien resserré lorsque la pointe de l'aiguille entre en contact avec la membrane de la cellule hôte. Ce compactage est couplé à la stabilisation de l'ATPase-sortante et éventuellement initiera le transfert des substrats dans le complexe de sécrétion (Nans et al., 2015).

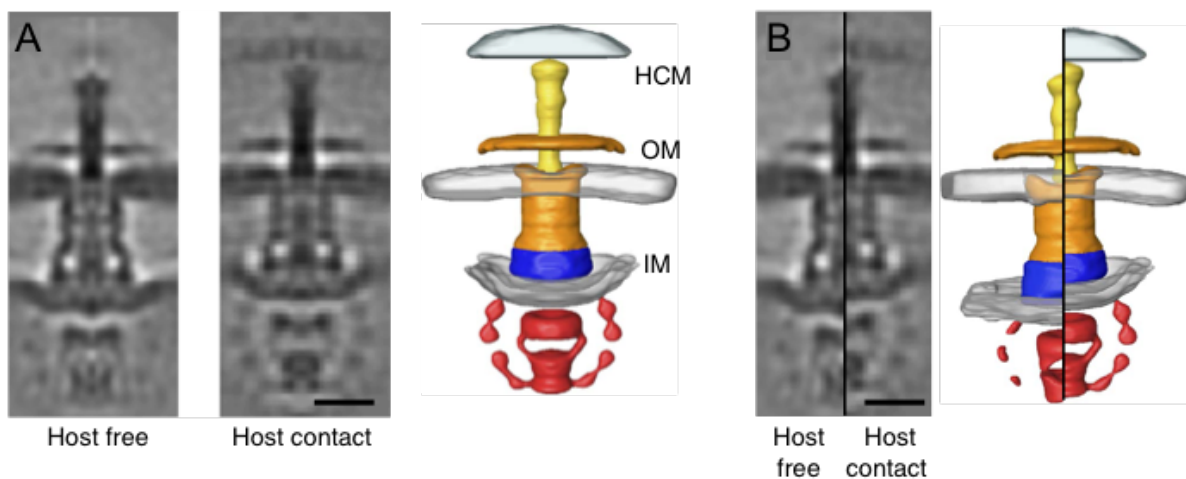


Figure 15. Structures *in situ* du T3SS provenant de *Chlamydia* avec et sans contact avec la cellule hôte. A) Analyse cryoélectronique, *in situ*, montrant des sous-tomogrammes moyens du T3SS provenant de *Chlamydia trachomatis* et le modèle de surface tridimensionnel correspondant à ces sous-tomogrammes. B) Comparaison des sous-tomogrammes et des modèles correspondants obtenus avec et sans attachement à la cellule hôte. Les barres d'échelles représentées en noir correspondent à 15 nm. Image adaptée de (Nans et al., 2015).

### **1.3.4 Le système de sécrétion de type IV**

Les T4SSs sont des systèmes polyvalents s'étendant sur les membranes bactériennes que l'on trouve à la fois dans les bactéries à Gram-positifs et aussi dans les bactéries à Gram-négatifs. Les T4SSs peuvent sécréter un large éventail de substrats tels que de l'ADN seul, des complexes ADN-protéines et des complexes protéines-protéines (Cascales & Christie, 2003). Comme les T4SSs sont capables de transférer à la fois de l'ADN et des protéines, ils peuvent remplir diverses fonctions telles que le transfert de l'ADN par conjugaison, l'absorption et la libération de l'ADN et la translocation des protéines effectrices ou des complexes ADN-protéines directement dans les cellules réceptrices (Green & Mecsas, 2016). Les T4SSs sont également impliqués dans le transfert de plasmides par conjugaison jouant un rôle clé dans la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques (Alvarez-Martinez & Christie, 2009; Kuldau, De Vos, Owen, McCaffrey, & Zambryski, 1990). Les T4SSs seront discutés en détail dans les sections suivantes de ce chapitre.

### **1.3.5 Le système de sécrétion de type V**

Les T5SSs ont été décrits comme étant les systèmes de sécrétions, retrouvés chez les bactéries, les moins complexes (Henderson, Cappello, & Nataro, 2000a, 2000b). Les T5SSs sont des systèmes de sécrétions qui s'étendent uniquement au niveau de la membrane externe des bactéries. Ils sécrètent des facteurs de virulence et participent à l'adhésion cellulaire et la formation de biofilms. Les substrats des T5SSs sont uniques du fait qu'ils traversent la membrane interne des bactéries, dans un état pas complètement replié, avec l'aide d'un appareil de sécrétion dédié, par exemple par l'intermédiaire du système Sec, ou d'un canal membranaire et ainsi ils se sécrètent d'eux-mêmes (Green & Mecsas, 2016; van Ulsen, Rahman, Jong, Daleke-Schermerhorn, & Luirink, 2014). Ces protéines ou groupes de protéines portent leur propre domaine en tonneau bêta qui s'insère dans la membrane externe et forme un canal permettant la sécrétion des molécules effectrices ; voilà pourquoi ils sont nommés autotransporteurs (Leo, Grin, & Linke, 2012; Leyton, Rossiter, & Henderson, 2012; Pohlner, Halter, Beyreuther, & Meyer, 1987). Les T5SSs peuvent être divisés en trois groupes en fonction du nombre de composants protéiques : la voie de type Va, la voie de sécrétion de type Vb ou bipartenaire et la

voie de type Vc ou la famille AT-2 (Fig. 16) (Henderson, Navarro-Garcia, Desvaux, Fernandez, & Ala'Aldeen, 2004; Leyton et al., 2012). Le type Va est encodé par un transcrit et il est constitué de quatre à cinq domaines : une séquence signal ciblant l'export dépendant du système Sec, un domaine C-terminal de translocation qui forme le canal retrouvé au niveau de la membrane externe de la bactérie, un effecteur sécrété aussi appelé le domaine de passage, un domaine connecteur et parfois un domaine protéase qui coupe le domaine de passage une fois qu'il est passé à travers le canal (Jose, Jahnig, & Meyer, 1995; Leyton et al., 2012). Le type Vb est similaire au type Va mais il possède deux transcrits, un encodant pour le domaine de passage et le second pour le domaine de translocation (Henderson et al., 2004). Pour le cas du type Vc, la translocation vers la membrane externe se produit après la trimérisation des sous-unités et les régions C-terminales forment le domaine en feuillets bêtas du pore (Roman-Hernandez, Peterson, & Bernstein, 2014; Surana, Cutter, Barenkamp, & St Geme, 2004).

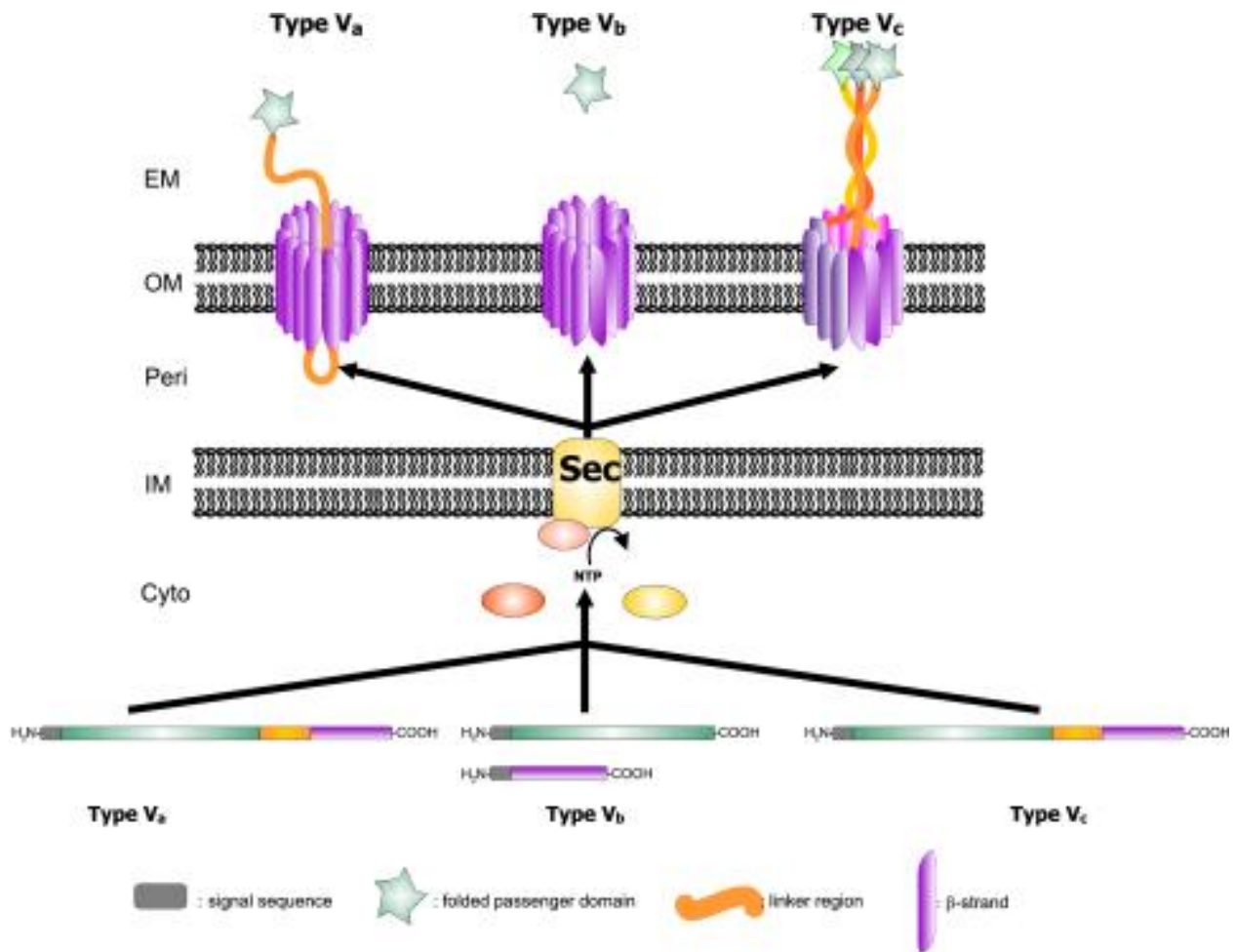


Figure 16. Vue d'ensemble schématique des T5SSs. Les types Va (sur la gauche), Vb (au centre) et Vc (sur la droite) sont décrits sur ce schéma. Les quatre domaines fonctionnels sont montrés : la séquence signal du système Sec, le domaine de passage, la région connectrice et le domaine en feuillets bêta. La translocation des protéines d'autotransports à travers la membrane interne est réalisée par l'intermédiaire du système Sec. Le domaine en tonneaux bêta forme un pore dans la membrane externe. Après la formation des pores, le domaine passager s'insère dans le pore et se voit transloqué vers la surface cellulaire où il peut subir de nouvelles modifications. Image adaptée de (Henderson et al., 2004).

### 1.3.6 Le système de sécrétion de type VI

Les T6SSs sont des systèmes de sécrétion bactériens récemment découverts (Mougous et al., 2006). Ils recouvrent l'enveloppe de la cellule et sont impliqués dans la sécrétion de facteurs de virulence dans les cellules hôtes, incluant les cellules eucaryotes et plus communément les bactéries (Russell, Peterson, & Mougous, 2014). Les T6SSs sont retrouvés principalement dans les protéobactéries à Gram-négatifs (Boyer, Fichant, Berthod, Vandenbrouck, & Attree, 2009; Russell et al., 2011). Les T6SSs sont des très gros complexes, avec pas moins de 21 protéines codées dans un groupe de gènes continus dont 13 de ces protéines, qui semblent être conservées dans tous les T6SSs, jouent un rôle au niveau de la structure du système de sécrétion (Russell et al., 2014). Au niveau structural les T6SSs sont très similaires aux complexes d'assemblage de la queue des bactériophages puisqu'ils sont composés d'un complexe membranaire retrouvé au niveau de la membrane interne des bactéries et d'une queue tubulaire qui s'étend à travers la cellule et dans le cytoplasme (Cianfanelli, Monlezun, & Coulthurst, 2016; Ho, Dong, & Mekalanos, 2014; Ma, Lin, & Lai, 2009; Pukatzki, Ma, Revel, Sturtevant, & Mekalanos, 2007). Des structures de cryo-EM du T6SS provenant de *V. cholerae* (code PDB : 3J9G) et de *Francisella tularensis* (codes PDB : 3J9O) suggèrent que le mécanisme de sécrétion des T6SSs à travers les membranes est similaire au mécanisme de contraction retrouvé au niveau des queues des phages (Clemens, Ge, Lee, Horwitz, & Zhou, 2015; Kube et al., 2014; Kudryashev et al., 2015). Pour cela, le domaine dénommé de la gaine ou du manchon se contracte et propulse la queue tubulaire à travers la paroi cellulaire vers la cellule hôte pour au final induire une perforation membranaire pour que les protéines effectrices soient relâchées (Kube et al., 2014). Suite au largage des protéines effectrices, le domaine de la gaine se désassemblera par l'intermédiaire de l'action d'une ATPase cytoplasmique ClpV (Fig. 17) (Cianfanelli et al., 2016; Kube et al., 2014).



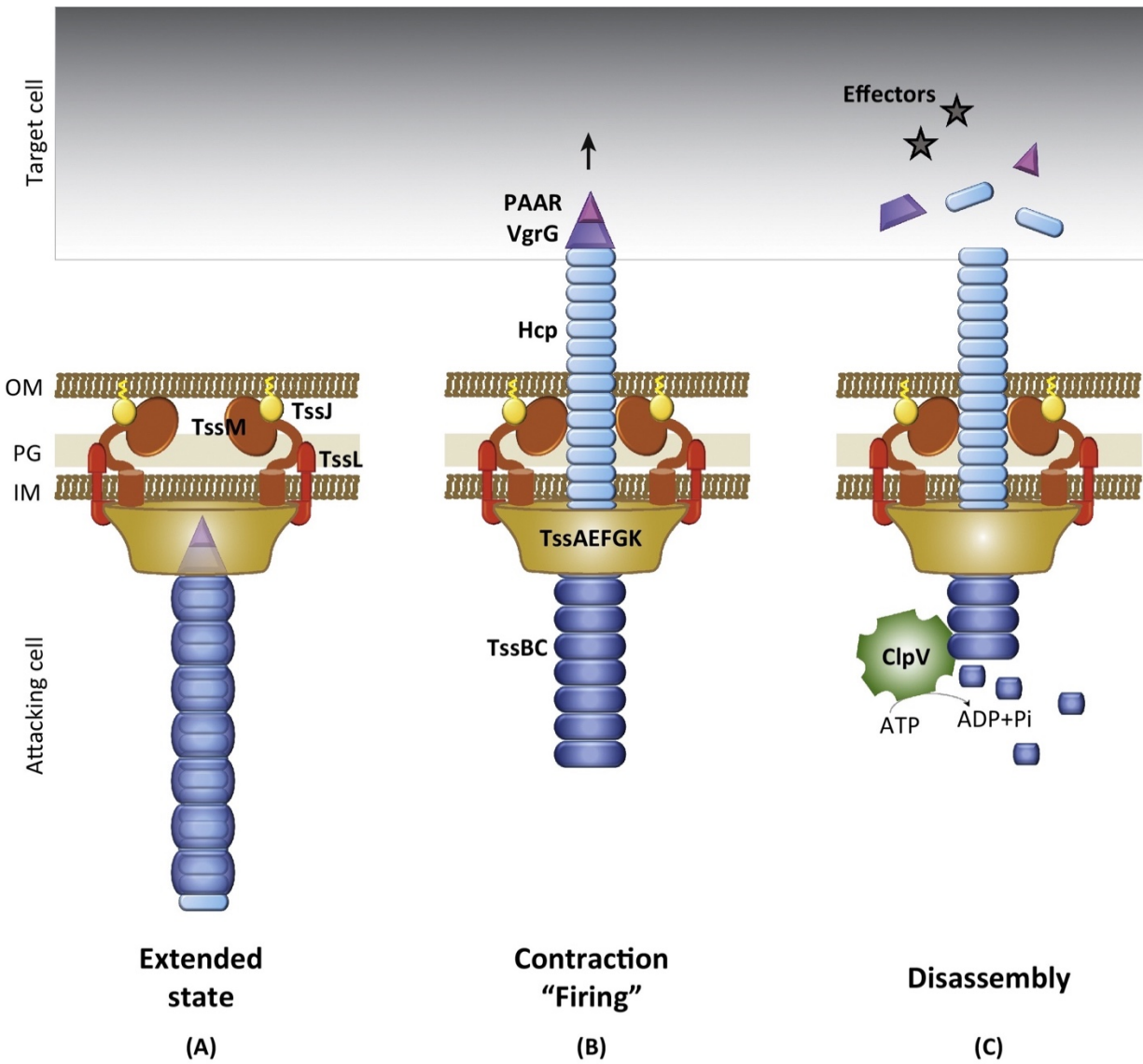


Figure 17. Représentation schématique de la structure et du mécanisme d'action des T6SSs. A) Dans l'état étendu, le domaine de gaine (représenté en bleu foncé) est assemblé à partir des composantes cytoplasmiques et membranaires. B) Dans un second temps, le domaine de gaine se contracte et se déplace du compartiment cytoplasmique vers la cellule hôte (représenté en bleu ciel) en brisant les membranes bactériennes et de la cellule hôte. C) Après largage des protéines effectrices, le domaine de gaine sera désassemblé par l'intermédiaire de l'intervention de l'ATPase ClpV (représentée en vert). Image adaptée de (Cianfanelli et al., 2016).

### 1.3.7 Le système de sécrétion de type VII

Initialement, les T7SSs ont été identifiés chez *Mycobacterium tuberculosis* où ils ont été nommés système ESX (*early secretory Ag target 6 (ESAT-6) system*) (Abdallah et al., 2011; Houben et al., 2014; Simeone, Bottai, & Brosch, 2009; Stanley, Raghavan, Hwang, & Cox, 2003). Par la suite, ils ont été retrouvés chez d'autres bactéries à Gram-positifs contenant une mycomembrane telle que *Corybacterium glutamicum*, ou ne contenant pas de mycomembrane telles que *Staphylococcus aureus* ou *Listeria monocytogenes*. La mycomembrane est une barrière hydrophobe, caractérisée par la présence d'acides mycoliques, fonctionnellement équivalente à la membrane externe des bactéries à Gram-négatif (Laneelle, Tropis, & Daffe, 2013; Marrakchi et al., 2014). Au niveau structural, les T7SSs sont constitués d'une machinerie cytoplasmique qui sert à amener les substrats vers le complexe de sécrétion, un complexe central retrouvé au niveau de la membrane interne des bactéries, une protéase liée à la membrane avec un domaine périplasmique (MycP dans le cas des Mycobactéries) qui est associé au complexe central pour traiter les substrats et un canal retrouvé au niveau de la membrane externe de la bactérie permettant la sécrétion des substrats (Fig. 18 et Fig. 19) (Beckham et al., 2017; Houben et al., 2014).

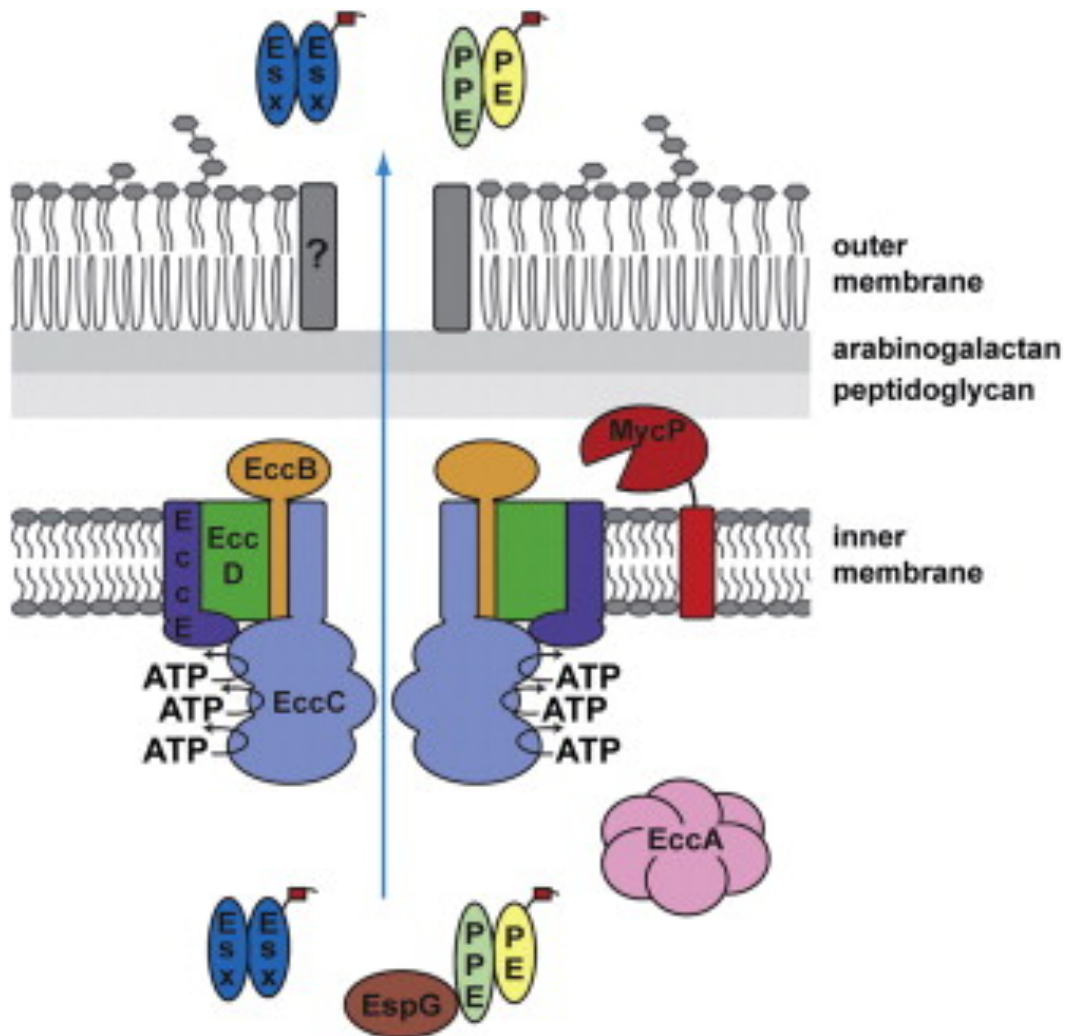


Figure 18. Modèle des T7SSs basé sur des études réalisées chez *Mycobacterium*. Les protéines Esx et PE/PPE sont des substrats et EspG est un composant cytoplasmique impliqué dans la reconnaissance et la translocation des substrats dans le complexe. EccB, EccC, EccD et EccE sont des composants du complexe central retrouvés au niveau de la membrane interne des bactéries. La protéine EccC, possédant trois domaines de liaison nucléotidiques, amène l'énergie nécessaire pour effectuer la translocation des substrats à travers le complexe. Il est important de noter que les composants du canal retrouvés au niveau de la membrane externe des bactéries ne sont toujours pas définis. Image adaptée de (Houben et al., 2014).

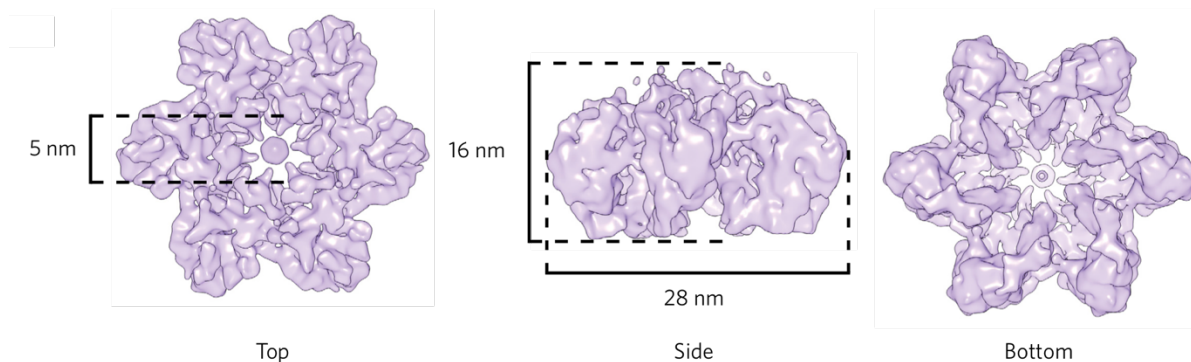


Figure 19. Reconstruction tridimensionnelle, obtenue par cryo-EM à 13 Angström de résolution, du complexe membranaire central retrouvé au niveau du ESX-5. Vues orthogonales de la carte de densité électronique reconstruite en appliquant une symétrie C6, montrant une structure de 28 x 16 nm avec un canal central d'un diamètre d'environ 5 nm. La carte de densité électronique est représentée en vue supérieure, latérale et de dessous. Image adaptée de (Beckham et al., 2017).

### 1.3.8 Le système de sécrétion de type VIII

Le système de sécrétion bactérien suivant est le T8SS, aussi appelé ENP chez les bactéries à Gram-négatifs, qui comprend des protéines d'assemblages de surfaces, les fimbriae, permettant l'adhésion aux surfaces et aussi la formation de biofilms (Austin, Sanders, Kay, & Collinson, 1998). Dans la formation de biofilms, la population bactérienne s'insère dans une matrice extracellulaire (*ECM : extracellular matrix*), produite de manière endogène, permettant une adhérence que ce soit aux surfaces abiotiques, tel que le verre, ou biotiques, telles que les cellules épithéliales (Adcox et al., 2016). L'*ECM* est généralement constituée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques et des fimbriae qui sont la principale composante protéique (Choong et al., 2016). D'un point de vue structural, les fimbriae forment un canal au niveau de la membrane externe des bactéries et les sous-unités majoritaires, CsgA, et minoritaires, CsgB, des fimbriae forment un échafaudage orienté vers l'environnement extracellulaire (Fig. 20) (Hammer et al., 2012; Hospenthal et al., 2017).

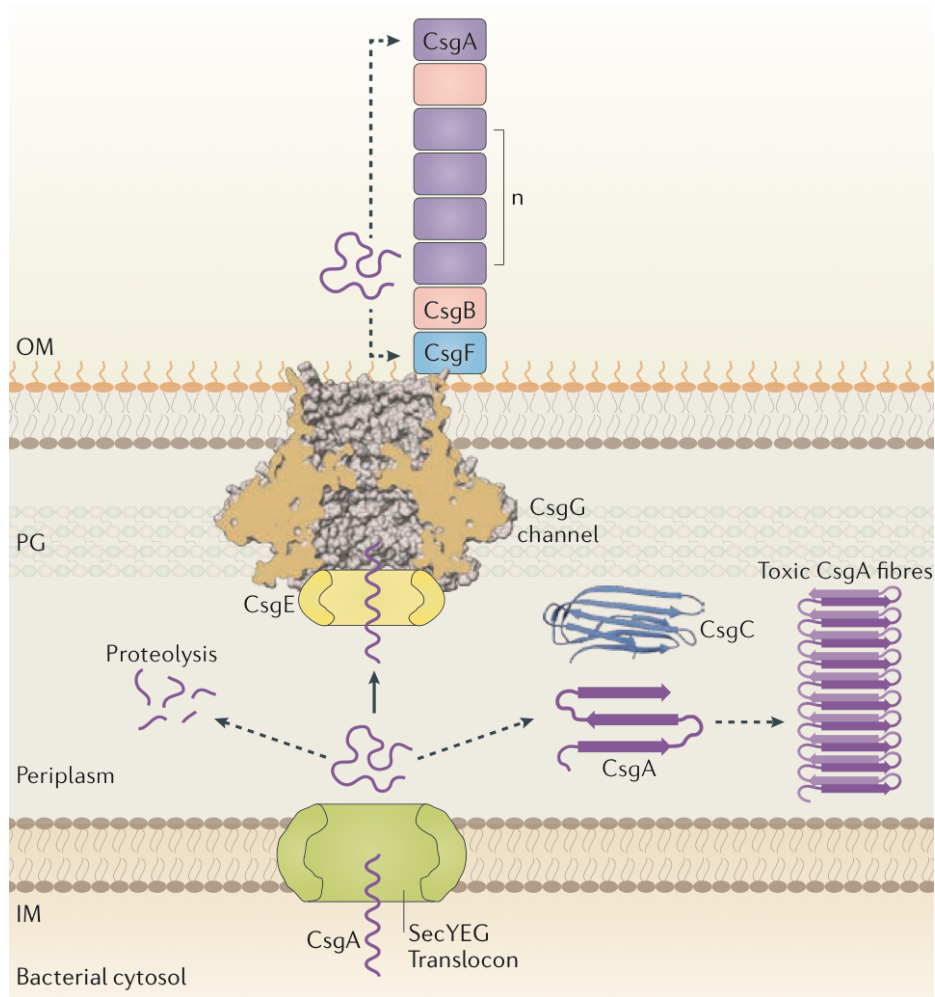


Figure 20. Mécanisme de formation des fimbriae. Les fimbriae sont assemblées par une voie de sécrétion dédiée qui commence par le transport de la sous-unité majoritaire CsgA, dans un état pas correctement replié, vers le périplasme par l'intermédiaire du système Sec. Le transporteur des fimbriae, CsgG, oligomérisse pour former un canal de translocation au niveau de la membrane externe des bactéries permettant de faire passer CsgA à la surface de la cellule. CsgB est la sous-unité minoritaire retrouvée chez les fimbriae et elle est associée à la membrane externe de la bactérie. Les protéines CsgE et CsgF sont impliquées dans le transport de CsgA et CsgB. Actuellement, la fonction de CsgC n'est toujours pas définie. Image adaptée de (Hospenthal et al., 2017).

### 1.3.9 Le système de sécrétion de type IX

Le dernier système de sécrétion bactérien, très récemment découvert, est le T9SS, aussi appelé le système de sécrétion Por (PorSS) ou *PerioGate* (Lasica et al., 2017; McBride & Zhu, 2013; Sato et al., 2010; Sato et al., 2013; Veith et al., 2017). Il peut être catégorisé comme étant un moyen de mouvement pour les bactéries environnementales ou une arme pour les agents pathogènes (Lasica et al., 2017; Shrivastava, Johnston, van Baaren, & McBride, 2013). Les protéines sécrétées par le T9SS portent d'une part un peptide signal N-terminal permettant leur translocation à travers la membrane interne par l'intermédiaire du système Sec et d'autre part un signal de sécrétion C-terminal permettant leur passage au travers de la membrane externe via le T9SS (Abby et al., 2016; Veith et al., 2013; M. S. Vincent et al., 2017). Après la translocation, le signal de sécrétion est clivé et les substrats subissent une série de glycosylations permettant leur attachement au niveau de la cellule hôte (Fig. 21) (Gorasia et al., 2015; Veith et al., 2013). Actuellement, 18 gènes sur un total de 29 candidats se sont avérés essentiels pour la fonction du T9SS chez *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) (Heath et al., 2016). D'un point de vue structural, l'organisation générale et l'architecture de ce système de sécrétion ne sont pas connues. Cependant, il a été rapporté, que chez *P. gingivalis*, au moins PorK, PorL, PorM et PorN s'assemblent pour former un complexe d'environ 1,4 MDa (Sato et al., 2010). De plus, il a été montré, par microscopie électronique à coloration négative, que PorK et PorN sont associés à la membrane externe pour former un complexe en forme d'anneau (Gorasia et al., 2016). Et très récemment, il a été relaté que les protéines PorKLMNP s'assemblent pour former un complexe couvrant l'enveloppe cellulaire, avec une protéine centrale, PorM, reliant les complexes de la membrane interne, PorLM, et de la membrane externe, PorKN (Fig. 22) (M. S. Vincent et al., 2017).

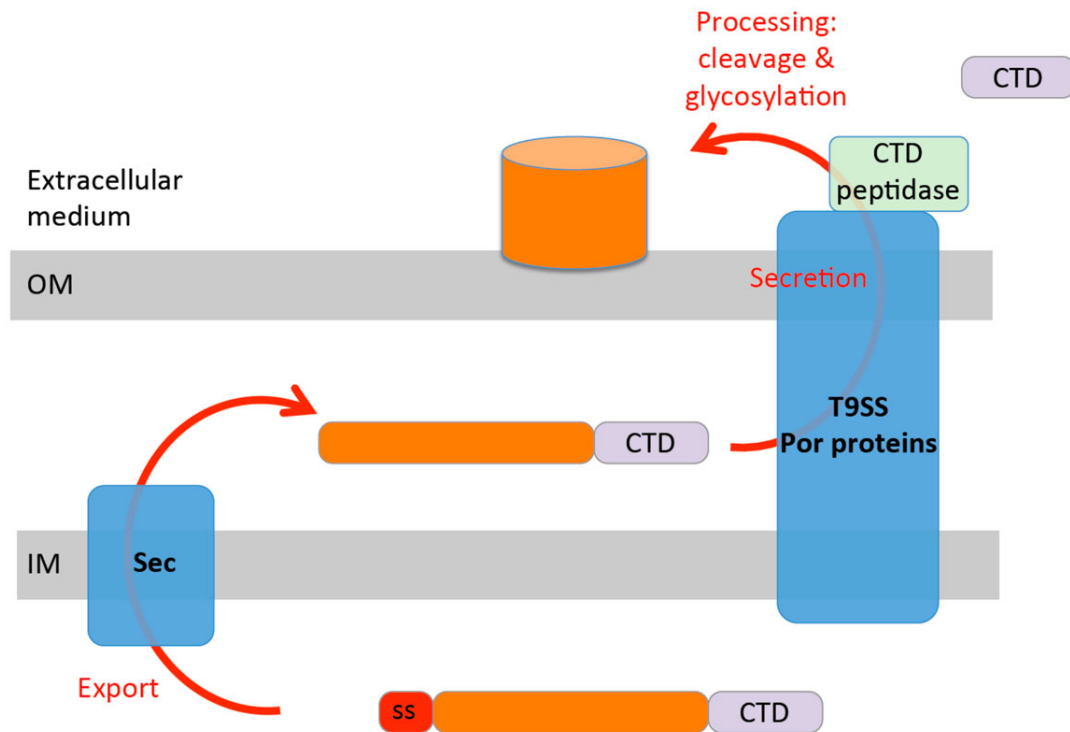


Figure 21. Mécanisme général de translocation des substrats retrouvés au niveau des T9SS. Les substrats sont synthétisés avec un peptide signal N-terminal permettant leur exportation vers le périplasma via la voie Sec. Une fois dans le périplasma, ils sont adressés à la surface cellulaire par le T9SS. Pour finir, les substrats subissent un clivage du signal de sécrétion et une série de glycosylations permettant leur attachement au niveau de la cellule hôte. Image adaptée du site internet suivant <http://www.cascaleslab.fr/les-themes/t9ss/>.

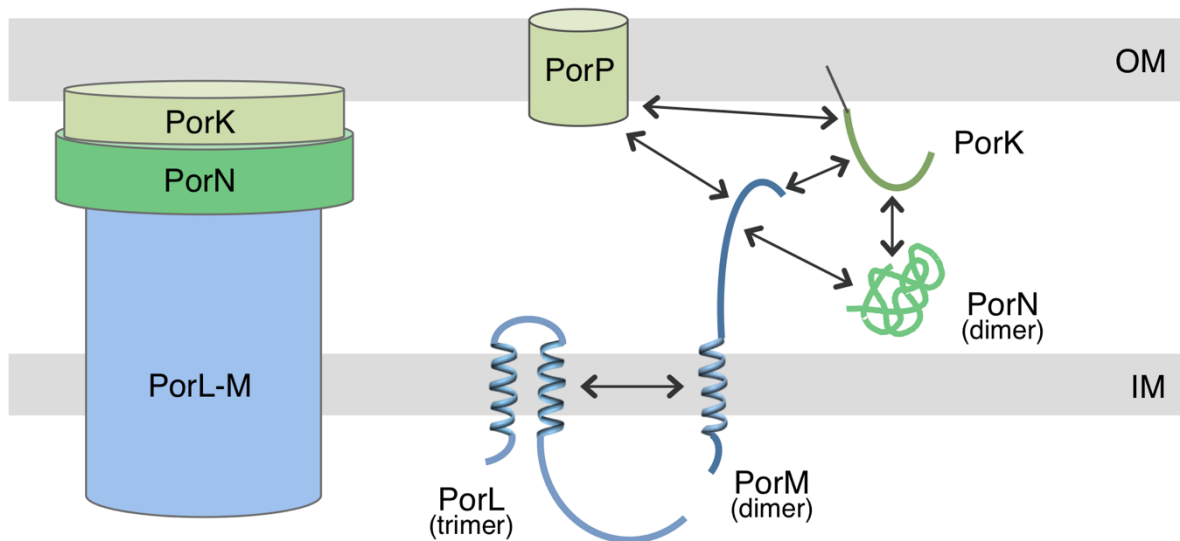


Figure 22. Représentation schématique du complexe central des T9SS, composé de PorKLMNP, provenant de *P. gingivalis*. Modèle mettant en évidence les localisations et les topologies des protéines, ainsi que le modèle PorP. Image adaptée de (M. S. Vincent et al., 2017).

## 1.4 Vue d'ensemble des systèmes de sécrétions de type IV

Cette thèse est axée sur l'analyse des T4SSs et par conséquent, le reste de l'introduction fournira un aperçu plus complet des composants et des fonctions des T4SSs.

Les T4SSs traversent les membranes internes et externes des bactéries. Ils sont caractérisés par leur capacité à transporter de l'ADN en complexe avec des protéines ou des protéines seules dans des cellules hôtes et à importer de l'ADN provenant d'autres bactéries ou du milieu extracellulaire. Les T4SSs sont classifiés sur la base de leurs relations ancestrales avec les machineries de conjugaison retrouvées chez les bactéries à Gram-négatifs et ils participent à la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques (Christie, 2004). Les plasmides pKM101 (*Incompatibility group* (Inc) N), R64 (IncI), R388 (IncW) et RP4 (IncP) sont des exemples de plasmides de conjugaison qui sont transférés par les T4SSs qui les encodent (Christie, 2001; Seubert, Hiestand, de la Cruz, & Dehio, 2003). Un grand nombre de bactéries à Gram-négatifs, qui sont pathogènes, possèdent des T4SSs utilisés pour participer à leur



virulence par exemple *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*), qui est une bactérie pathogène des plantes, ou bien les bactéries pathogènes des animaux tels que *Brucella species* (*Brucella sp.*), *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*), *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) et *Bartonella henselae* (*B. henselae*) (Cascales & Christie, 2003).

### 1.4.1 Classifications des systèmes de sécrétions de type IV

Les T4SSs sont utilisés pour effectuer diverses fonctions telles que l'échange d'ADN avec d'autres bactéries et le transport d'ADN oncogénique et des protéines vers les cellules de l'hôte (Fig. 23) (Alvarez-Martinez & Christie, 2009; Baron, 2005). Les T4SSs sont classés en trois catégories selon la fonction qu'ils exercent. Le premier groupe comprend les T4SSs qui permettent les phénomènes de conjugaison et de transfert d'ADN entre les cellules par contact direct (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). Ce type de T4SS est retrouvé chez les bactéries à Gram-positifs et aussi chez les bactéries à Gram-négatifs telles que chez *A. tumefaciens* où le T4SS transporte des complexes d'ADN oncogénique et des protéines à l'intérieur des cellules des plantes (Zupan, Muth, Draper, & Zambryski, 2000). Le second groupe de T4SS transporte des protéines pour s'accrocher aux cellules de l'hôte et transférer leurs facteurs de virulence. Cette fonction est retrouvée par exemple chez *Brucella suis* (*B. suis*) qui utilise le T4SS pour transporter des protéines effectrices dans les cellules de l'hôte ou bien chez de nombreuses bactéries pathogènes pour l'homme telles que *B. pertussis*, *H. pylori* ou *L. pneumophila* (Cascales & Christie, 2003; O'Callaghan et al., 1999). Le troisième et dernier groupe de T4SSs est impliqué dans les phénomènes d'absorption et de libération d'ADN dans l'environnement extracellulaire. Cette troisième fonction des T4SSs est retrouvée par exemple chez *H. pylori*, par l'intermédiaire du système ComB, ou chez *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) (Alvarez-Martinez & Christie, 2009).

De plus, les T4SSs sont aussi classés selon la similarité de séquence par rapport aux systèmes de conjugaison (Fig. 24). Les T4SSs sont classés en système de sécrétion de type IVA (T4ASS) si leurs composants structuraux ressemblent au complexe VirB/D4 provenant d'*A. tumefaciens* (Christie & Vogel, 2000). Du fait de la similarité des composants structuraux de

certaines T4SSs avec le système de conjugaison du plasmide IncI, une autre classe de T4SSs appelée système de sécrétion de type IVB (T4BSS) a été créée (Christie & Vogel, 2000). Ces T4BSSs ont tout d'abord été identifiés chez la bactérie pathogène pour l'homme *L. pneumophila* (Christie & Vogel, 2000). Il a été trouvé que la pathogénicité de *L. pneumophila* dépend du complexe du T4BSS appelé Dot/Icm composé d'environ 27 composants (Fig. 25) (Kubori et al., 2014; Nagai & Kubori, 2011; Segal, Purcell, & Shuman, 1998; Sutherland, Binder, Cuaing, & Vogel, 2013; C. D. Vincent et al., 2006; Vogel, Andrews, Wong, & Isberg, 1998). Par la suite, les T4BSSs ont aussi été retrouvés chez des agents pathogènes pour les animaux tels que chez les bactéries *Coxiella burnetti* et *Rickettsiella grylli* (Leclerque & Kleespies, 2008; Nagai & Kubori, 2011; Zamboni, McGrath, Rabinovitch, & Roy, 2003; Zusman, Yerushalmi, & Segal, 2003).

Le T4ASS, et donc le complexe VirB/D4, sera explicité en détail dans les sections suivantes.

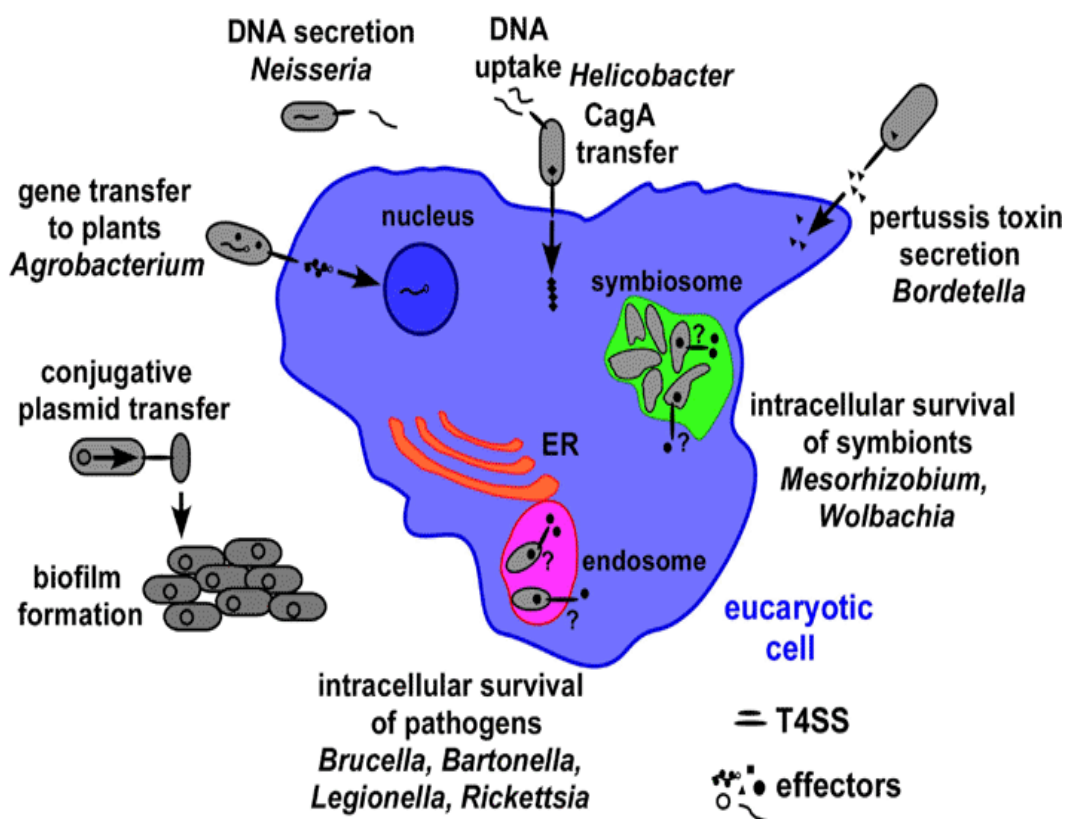
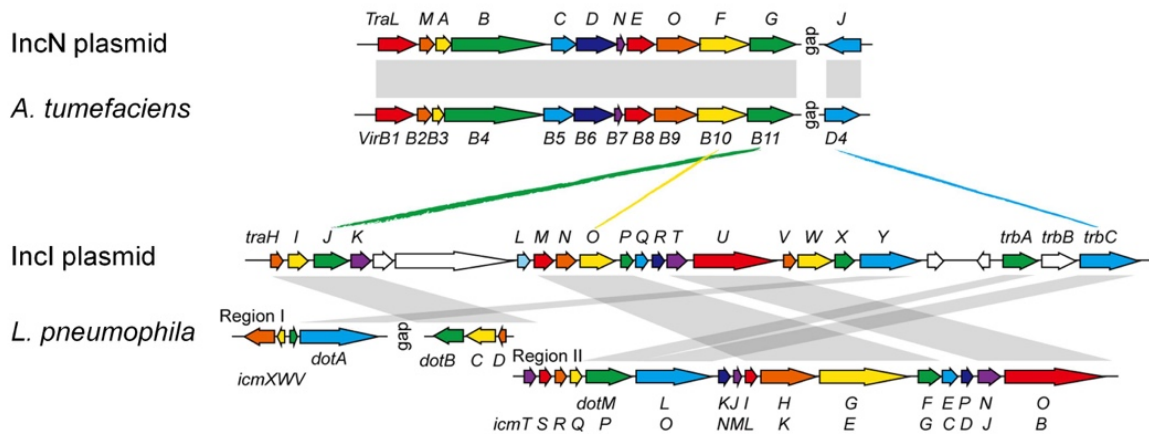


Figure 23. Les T4SSs participent à diverses fonctions chez les bactéries. Image adaptée de (Baron, 2005).

# Type IVA

pKM101 plasmid  
*Agrobacterium tumefaciens*  
*Helicobacter pylori*  
 etc.



# Type IVB

R64 plasmid  
*Legionella pneumophila*  
*Coxiella burnetii*  
 etc.

Figure 24. Représentation schématique des similarités de séquences entre les systèmes de conjugaison, les T4ASSs et les T4BSSs. Image adaptée du site internet suivant <http://nagailab.biken.osaka-u.ac.jp/research-en> et créée par le laboratoire Nagai.

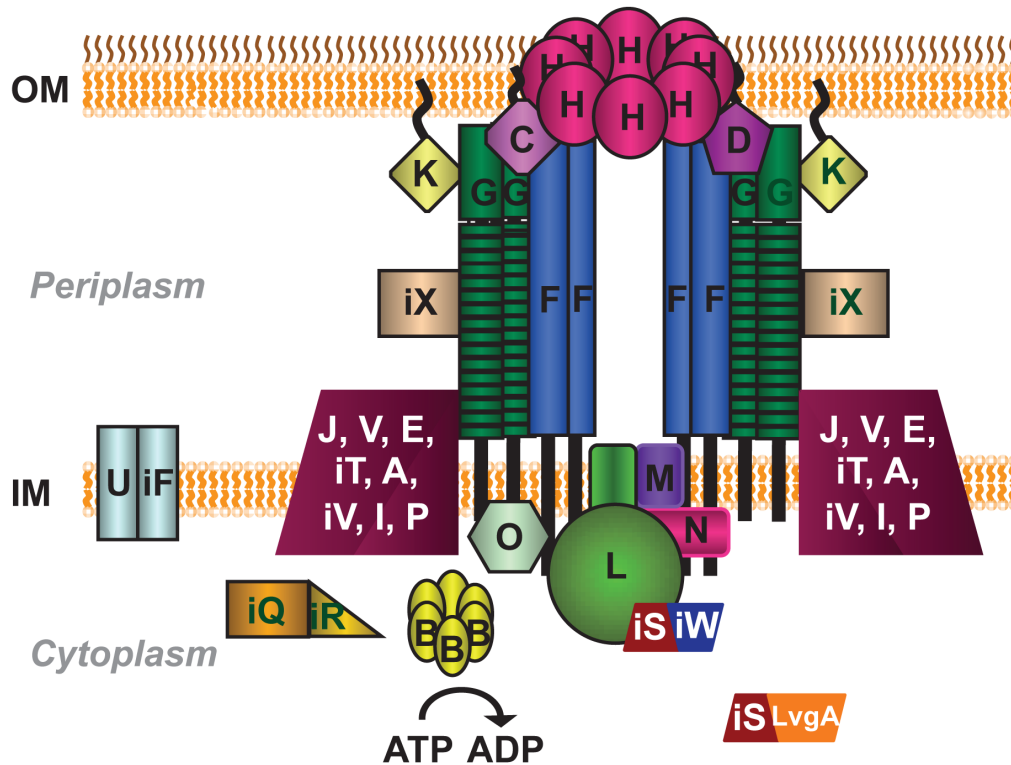


Figure 25. Modèle schématique du T4BSS provenant de *L. pneumophila*. Les 27 protéines faisant partie du T4BSS sont positionnées selon leurs emplacements subcellulaires prédits ou expérimentalement déterminés. Les protéines Dot sont nommées avec la dernière lettre de leur nom. Les protéines Icm sont désignées de la même manière, mais sont précédées d'un « i ». Image adaptée de (Sutherland et al., 2013).

## 1.4.2 Vue d'ensemble au niveau structural des systèmes de sécrétions de type IV

Malgré la diversité fonctionnelle mentionnée précédemment, de nombreux T4SSs ressemblent au T4ASS VirB/D4 provenant d'*A. tumefaciens*. Ce complexe VirB/D4 est constitué de 12 composants (Fig. 26) (Baron, 2005; Christie, Whitaker, & Gonzalez-Rivera, 2014; Redzej, Waksman, & Orlova, 2015). Les protéines VirB1 à VirB11 sont traduites par l'intermédiaire de l'opéron *virB* alors que la protéine VirD4 est traduite via l'opéron *virD*. Au sein de ce complexe VirB/D4, les protéines VirB4, VirB11 et VirD4 sont des ATPases, situées au niveau du compartiment cytoplasmique du complexe, qui amènent l'énergie nécessaire pour effectuer les fonctions du T4SS. Les protéines VirB3, VirB6, VirB7, VirB8, VirB9 et VirB10

sont retrouvées au niveau de la partie membranaire et périplasmique et elles forment le complexe central de la machinerie de translocation. Et pour finir, les protéines VirB2 et VirB5, qui sont retrouvées essentiellement au niveau de la partie extracellulaire de ce complexe, forment les sous-unités du pilus permettant le contact avec les cellules de l'hôte.

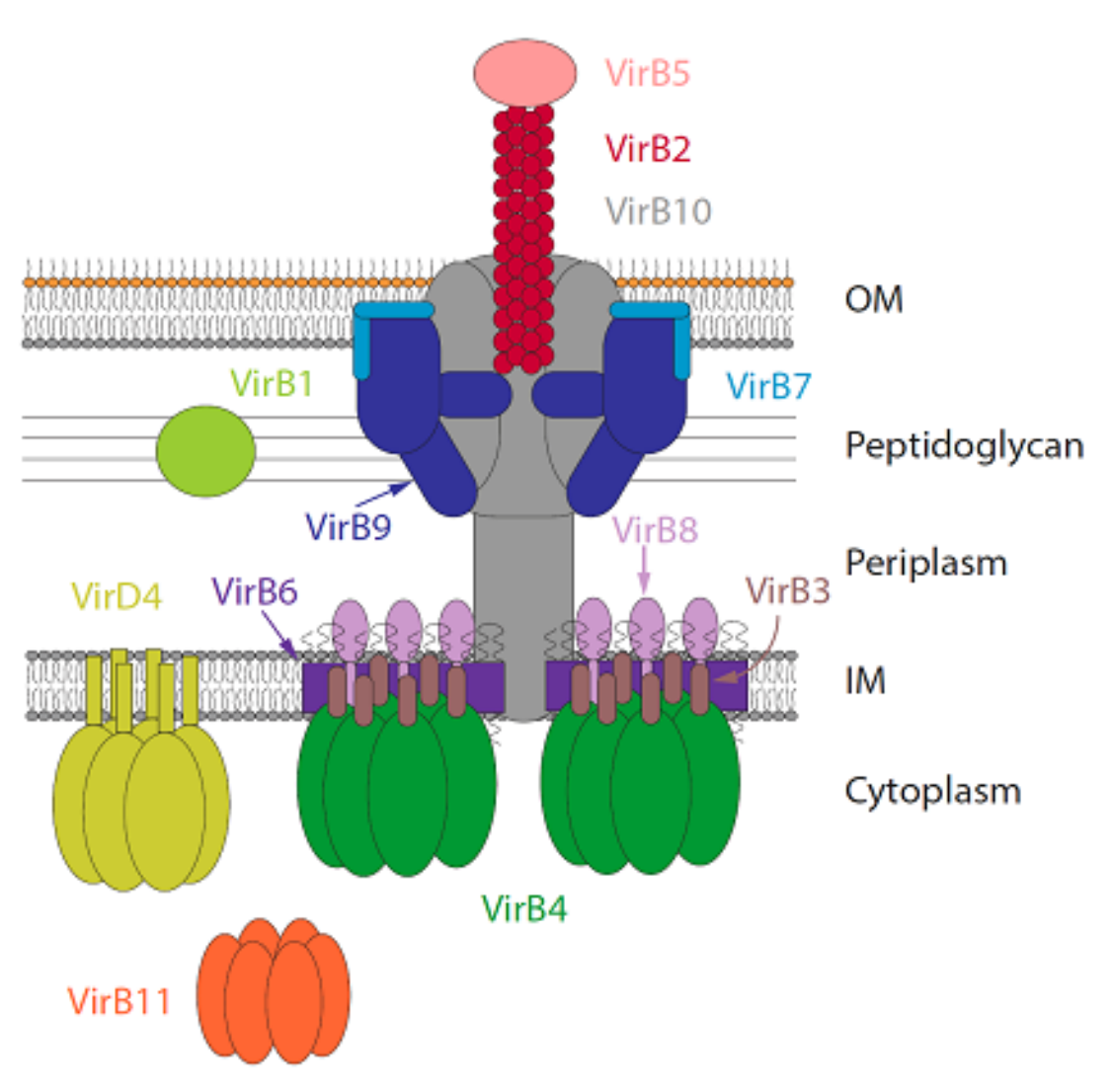


Figure 26. Représentation schématique du T4ASS. Les 12 composants de ce système de sécrétion sont localisés dans les membranes internes et externes de la bactérie, au niveau des compartiments cytoplasmique et périplasmique ainsi qu'au niveau de l'espace extracellulaire pour participer à l'attachement avec les cellules de l'hôte. Image adaptée de (Redzej et al., 2015).

### 1.4.3 Description individuelle des protéines participant à l'architecture des systèmes de sécrétions de type IV

**VirB1** est une protéine périplasmique connue pour partager le même repliement au niveau structural que celui retrouvé chez le lysozyme (Bayer et al., 1995; Koraimann, 2003). De plus, VirB1 est décrite comme étant une transglycosylase lytique qui dégrade les peptidoglycanes périplasmiques et facilite l'assemblage du T4SS à travers la paroi cellulaire (Hoppner, Liu, Domke, Binns, & Baron, 2004). Le domaine C-terminal de cette protéine est sécrété dans le milieu extracellulaire et participe à la biogenèse du T-pilus (Baron, Llosa, Zhou, & Zambryski, 1997; Zupan, Hackworth, Aguilar, Ward, & Zambryski, 2007). De surcroît, cette transglycosylase est associée avec le canal de sécrétion et interagit plus particulièrement avec les protéines VirB8, VirB9 et VirB11 (Hoppner, Carle, Sivanesan, Hoepfner, & Baron, 2005). Pour finir, il a été montré que des changements au niveau du site actif de VirB1 mènent à une réduction de la virulence (Hoppner et al., 2004).

**VirB2 et VirB5** sont les pilines majoritaires et minoritaires, respectivement, et sont les sous-unités d'assemblages des pili à la surface de la cellule (Aly & Baron, 2007; Eisenbrandt et al., 1999; Fullner, Lara, & Nester, 1996; Lai, Chesnokova, Banta, & Kado, 2000; Lai, Eisenbrandt, Kalkum, Lanka, & Kado, 2002). Les pili sont des appendices cellulaires qui sont cruciaux à la fois pour l'adhésion des bactéries à des surfaces ou aux cellules hôtes, mais aussi pour l'interaction avec d'autres bactéries (Thanassi, Bliska, & Christie, 2012). Pour la biogenèse des pili, VirB2 est clivée au niveau de sa partie N-terminale puis transformée afin d'aboutir à une forme cyclique (Eisenbrandt et al., 1999; Lai et al., 2002). De plus, VirB5 permet les processus d'adhésion à la pointe des pili et se trouve être essentiel pour l'incorporation de VirB2 dans les pili (Lai et al., 2000; Schmidt-Eisenlohr, Domke, Angerer, et al., 1999; Schmidt-Eisenlohr, Domke, & Baron, 1999).

**VirB3** est une petite protéine membranaire, prédite pour contenir un ou deux domaines transmembranaires proches de sa partie N-terminale, qui fait partie du complexe retrouvé au niveau de la membrane interne de la bactérie (Fronzes, Christie, et al., 2009). Des études ont montré sa colocalisation avec VirB6 et aussi que son niveau d'accumulation est affecté par la présence de VirB4 (Jones, Shirasu, & Kado, 1994; P. K. Judd, R. B. Kumar, & A. Das, 2005;

Yuan, Carle, Gao, Sivanesan, Aly, Hoppner, et al., 2005). Des fusions entre les homologues de VirB4 et VirB3 ont été trouvées dans certains T4SS (par exemple chez *Campylobacter jejuni*) soulignant l'interaction entre ces protéines (Wallden, Rivera-Calzada, & Waksman, 2010). VirB3 est aussi impliquée au niveau de l'assemblage du complexe et plus particulièrement au niveau des pilines VirB2 et VirB5 (Yuan, Carle, Gao, Sivanesan, Aly, Hoppner, et al., 2005).

**VirB4** est une ATPase essentielle à la fois pour la biogenèse du pilus et aussi pour la sécrétion des substrats des T4SSs par l'intermédiaire de ses motifs Walker A et Walker B (Berger & Christie, 1993; Fullner, Stephens, & Nester, 1994; Rabel, Grahn, Lurz, & Lanka, 2003). VirB4 est localisée sur le côté cytoplasmique de la membrane interne des bactéries et comprend un domaine C-terminal qui possède l'activité ATPase et un domaine N-terminal qui interagit avec la membrane (Middleton, Sjolander, Krishnamurthy, Foley, & Zambryski, 2005). Récemment, des structures de microscopie électronique et de cristallographie à rayons-X de VirB4 en complexe, dans un état lié ou non, avec VirB7-VirB9-VirB10 provenant du plasmide pKM101 ont été déterminées (Wallden et al., 2012). L'état oligomérique de VirB4 peut varier en fonction de l'association membranaire, de la liaison avec l'ATP ou de l'hydrolyse et aussi des interactions avec d'autres sous-unités des T4SSs (Christie et al., 2014; Fronzes, Christie, et al., 2009).

**VirB6** est une protéine polytopique de la membrane interne des bactéries comprenant 5 ou 6 domaines transmembranaires et une grande boucle périplasmique (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). VirB6 est impliquée dans la sécrétion du substrat et, chez *A. tumefaciens*, cette protéine entre directement en contact avec l'ADN lors de sa translocation à travers la membrane interne (Cascales & Christie, 2003; Christie et al., 2014). De plus, les niveaux d'expression de VirB3 et VirB5 dans la cellule sont affectés en absence de VirB6 (Hapfelmeier, Domke, Zambryski, & Baron, 2000). Pour finir, chez *A. tumefaciens*, VirB6 interagit avec VirB8, probablement par l'intermédiaire de sa boucle périplasmique, pour transférer le substrat d'ADN provenant de VirB11 dans le canal de sécrétion (E. Cascales & P. J. Christie, 2004b; S. J. Jakubowski, V. Krishnamoorthy, E. Cascales, & P. J. Christie, 2004; Villamil Giraldo, Mary, Sivanesan, & Baron, 2015).

**VirB7** est une petite lipoprotéine qui est insérée dans la membrane externe des bactéries et qui interagit avec VirB9, dans certains cas par l'intermédiaire notamment de ponts disulfures,

et ainsi la stabilise (Baron, Thorstenson, & Zambryski, 1997; Fernandez, Dang, et al., 1996). De plus, la formation de l'hétérodimère VirB7-VirB9, dont la structure a été déterminée par résonance magnétique nucléaire (RMN), stabilise les autres composants du T4SS (Bayliss et al., 2007; Fernandez, Spudich, Zhou, & Christie, 1996).

**VirB8** est une protéine bitopique, de la membrane interne des bactéries, qui est composée d'un domaine transmembranaire au niveau de sa partie N-terminale et d'un large domaine périplasmique au niveau de sa partie C-terminale (Buhrdorf, Forster, Haas, & Fischer, 2003; Das & Xie, 1998; Lai et al., 2002; Terradot et al., 2005b). Dans les sections suivantes, la protéine VirB8 et ses interactions avec les autres composants des T4SSs feront l'objet d'une description plus approfondie.

**VirB9** est une protéine associée à la membrane externe des bactéries et composée de deux domaines liés entre eux par une région flexible d'environ 50 acides aminés (Bayliss et al., 2007; Jakubowski, Cascales, Krishnamoorthy, & Christie, 2005). Cette protéine interagit avec VirB7, mais aussi avec VirB10 pour former le complexe central des T4SSs retrouvés au niveau de la membrane externe des bactéries composé par 14 copies de chacune de ces trois protéines (Chandran et al., 2009; Fronzes, Schafer, et al., 2009). VirB9 forme la gaine extérieure de ce complexe qui est stabilisé par VirB7 (Guglielmini et al., 2014; Low et al., 2014b). De plus, VirB9 interagit avec VirB8 et la perturbation de cette interaction supprime le transport d'ADN chez *A. tumefaciens* (A. Das & Y. H. Xie, 2000). Pour finir, toujours chez *A. tumefaciens*, VirB9 est impliquée à la fois dans la translocation du substrat, mais aussi au niveau de la biogenèse du pilus (Jakubowski et al., 2005).

**VirB10** est une protéine membranaire bitopique, insérée au niveau de la membrane interne des bactéries, qui s'étend sur toute la longueur du domaine périplasmique du T4SS et qui se situe à la surface interne du complexe membranaire retrouvé au niveau de la membrane externe des bactéries (Das & Xie, 1998; Jakubowski et al., 2009). Elle se compose d'une courte région cytoplasmique au niveau de sa partie N-terminale, d'un seul domaine transmembranaire, d'une région riche en proline et d'un grand domaine périplasmique au niveau de sa partie C-terminale (Fronzes, Christie, et al., 2009). En plus de ce rôle central au niveau de l'architecture des T4SSs, VirB10 est essentielle pour le transfert des substrats de la membrane interne vers la membrane externe des bactéries. VirB10 n'est pas en contact direct avec les substrats, mais



fonctionne probablement comme une porte de détection d'énergie qui transmet les changements conformationnels induits par l'ATP provenant des ATPases cytoplasmiques (E. Cascales & P. J. Christie, 2004a).

**VirB11** est une ATPase cytoplasmique, se situant en périphérie de la membrane interne des bactéries, qui amène l'énergie nécessaire pour effectuer les fonctions des T4SSs (Rashkova, Spudich, & Christie, 1997). Cette ATPase est essentielle à la fois pour l'assemblage du T4SS, mais aussi pour le transfert du substrat et enfin l'assemblage du pilus (Christie et al., 2014; Sagulenko, Sagulenko, Chen, & Christie, 2001). L'hydrolyse de l'ATP effectuée par VirB11 induit également des changements conformationnels de VirB10 (E. Cascales & P. J. Christie, 2004a). Pour finir, VirB11 assiste VirB4 pendant la biogenèse du pilus en transférant les pilines de la membrane interne vers l'espace périplasmique des bactéries (Kerr & Christie, 2010).

**VirD4** est une ATPase, elle aussi cytoplasmique, qui joue un rôle de protéine de couplage des T4SSs (T4CP) en recrutant tout d'abord les substrats et en les transloquant vers le complexe VirB1-VirB11 (Christie, Atmakuri, Krishnamoorthy, Jakubowski, & Cascales, 2005; Tato, Zunzunegui, de la Cruz, & Cabezon, 2005). Cependant certains T4SSs tels que ceux de *B. pertussis* ou de *Brucella sp.*, utilisent un mécanisme indépendant du T4CP pour le recrutement et la sécrétion du substrat (Burns, 2003; O'Callaghan et al., 1999). Collectivement, le transfert des substrats vers le canal de sécrétion est réalisé par l'intermédiaire des ATPases qui composent les T4SSs (Atmakuri, Cascales, & Christie, 2004).

#### **1.4.4 Aperçu au niveau structural de l'architecture des systèmes de sécrétions de type IV**

La structure du T4ASS VirB/D4 a été étudiée de manière détaillée en utilisant des modèles provenant de différents homologues qui partagent l'architecture générale du système provenant d'*A. tumefaciens*. Les premières structures à hautes résolutions du complexe central des T4SSs retrouvées au niveau de la membrane externe des bactéries, composées de VirB7, VirB9 et VirB10 (TraN, TraO et TraF chez le T4SS du plasmide pKM101), ont été obtenues par cryo-EM (*Electron microscopy data bank* (EMDB) code : 5031 et EMDB code : 2232) et

cristallographie aux rayons X (PDB code : 3JQO) (Chandran et al., 2009; Fronzes, Schafer, et al., 2009; Rivera-Calzada et al., 2013). Les structures de cryo-EM ont montré un complexe de 1,05 MDa, traversant l'enveloppe cellulaire et composé de deux couches, les couches O et I, qui sont formées par 14 copies des homologues de VirB7, VirB9 et VirB10 (Fig. 27) (Rivera-Calzada et al., 2013; Trokter, Felisberto-Rodrigues, Christie, & Waksman, 2014a). La couche I est constituée des domaines N-terminaux de VirB9 et VirB10 ancrés dans la membrane interne via le domaine transmembranaire retrouvé au niveau de la portion N-terminale de VirB10. La couche O comprend VirB7 et des domaines de VirB9 et de VirB10 formant un corps principal et un capuchon retrouvés au niveau de la membrane externe. De plus, il a été prouvé que la co-expression de ce complexe avec la protéine TraE, homologue de VirB8 provenant du pKM101, n'était pas nécessaire à sa formation *in vitro* (Fronzes, Schafer, et al., 2009). Pour finir, l'analyse de la structure obtenue par cristallographie aux rayons X, d'un sous-complexe composé uniquement des composants retrouvés au niveau de la membrane externe de la bactérie, a révélé que 14 copies des domaines C-terminaux de VirB10 et VirB9 ainsi que la protéine entière VirB7 forment le complexe dans lequel VirB10 forme un cylindre hélicoïdal entouré de VirB9 et de VirB7 (Chandran et al., 2009).

Récemment, une vue globale, *in vitro*, de la structure du T4SS entier (EMDB code : 2567), composé du complexe contenant VirB3-VirB10 (T4SS<sub>3-10</sub>) provenant du plasmide de conjugaison R388 d'*E. coli*, a été obtenue par microscopie électronique (Fig. 28) (Low et al., 2014b). L'analyse par microscopie électronique a montré un complexe protéique de 3 MDa recouvrant toute l'enveloppe cellulaire. Cette structure comprend les complexes retrouvés au niveau des membranes internes et externes des bactéries, une tige reliant ces deux complexes et deux structures en forme de tonneaux hexamériques dans la membrane interne formant des saillies vers le cytoplasme. Les résultats pour le complexe retrouvé au niveau de la membrane externe confirment que l'agencement en 14 copies des protéines VirB7, VirB9 et VirB10 est présent comme dans les études antérieures (Chandran et al., 2009; Fronzes, Schafer, et al., 2009; Rivera-Calzada et al., 2013). La composition exacte de la tige qui relie les complexes membranaires internes et externes n'a pas encore été identifiée. De plus, les protéines VirB3, VirB4, VirB6, VirB8 et le domaine N-terminal de VirB10 formant le complexe membranaire interne sont bien présentes dans cette structure, mais leurs localisations exactes au niveau de la

membrane interne restent inconnues. Dans cette étude, les auteurs ont tout de même pu quantifier le nombre de copies de chacune des protéines formant le complexe membranaire interne, 12 copies de VirB8, 24 copies de VirB6 et 14 copies pour l'extrémité N-terminale de VirB10. La partie cytoplasmique de ce complexe a elle aussi été décrite comme formant deux barils contenant chacun 6 sous-unités de l'ATPase VirB4. Dernièrement, une nouvelle structure obtenue par microscopie électronique de cette machine de sécrétion en complexe avec la protéine de couplage VirD4 a été résolue (T4SS<sub>3-10+D4</sub>) (Fig. 29) (EMDB code : 3585) (Redzej et al., 2017). Cette nouvelle structure amène comme informations essentielles que l'ATPase VirD4, responsable du recrutement du substrat, forme deux copies de dimères se situant des deux côtés de la machinerie entre les ATPases VirB4, ceci lui conférant un rôle central dans les T4SSs.

L'architecture globale des T4SSs semble être similaire chez toutes les bactéries à Gram-négatifs. Deux récentes études ont révélé les structures *in situ* du T4ASS provenant d'*H. pylori* et du T4BSS provenant de *L. pneumophila* (Fig. 30) (Chang, Shaffer, Rettberg, Ghosal, & Jensen, 2017; Ghosal, Chang, Jeong, Vogel, & Jensen, 2017). La seule similarité de séquence retrouvée des T4ASS et T4BSS est entre la séquence retrouvée au niveau de l'extrémité C-terminale de CagY provenant d'*H. pylori* ou VirB10 chez *A. tumefaciens* et la séquence retrouvée au niveau du domaine C-terminal de DotG provenant de *L. pneumophila* (Chang et al., 2017; Nagai & Kubori, 2011). En dépit de la similarité de séquence limitée des composants, ces analyses de cryotomographies électroniques suggèrent des similarités structurales entre les T4ASSs, *in situ* provenant d'*H. pylori* ou *in vitro* provenant du plasmide de conjugaison R388, et les T4BSSs au niveau du complexe de membrane externe et aussi au niveau des structures en forme de tonneaux dans le cytoplasme (Frick-Cheng et al., 2016; Ghosal et al., 2017; Rivera-Calzada et al., 2013; Trokter et al., 2014a). Les structures, *in situ* et *in vitro*, des T4ASSs de leurs côtés sont très proches notamment avec la présence de la tige reliant les complexes retrouvés au niveau des membranes internes et externes des bactéries (Chang et al., 2017). En plus de ces similitudes structurales, il y a des différences drastiques observées dans la taille (longueur et largeur) entre le T4ASS du plasmide R388 et le système T4BSS de *L. pneumophila* (Ghosal et al., 2017).

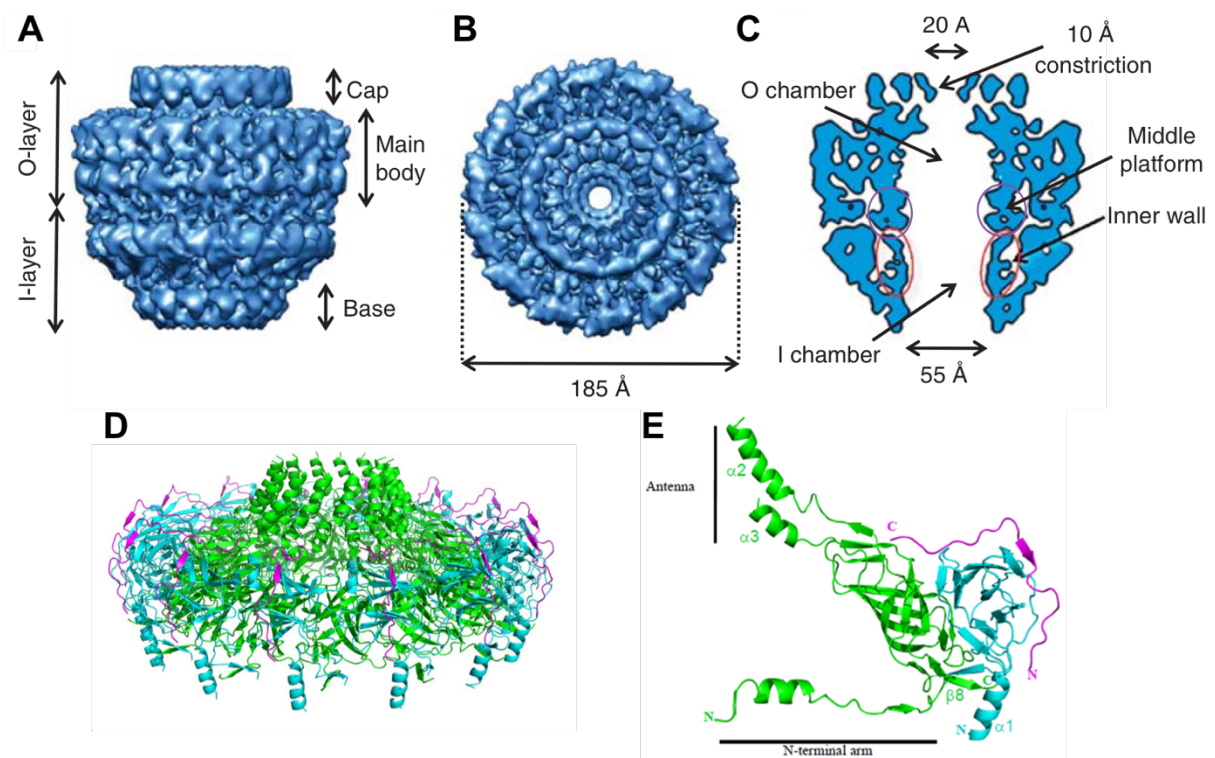


Figure 27. Structures à hautes résolutions du complexe central des T4SSs retrouvées au niveau de la membrane externe des bactéries. Cryo-EM structure (EMDB code : 2232) du complexe formé par TraN/VirB7, TraO/VirB9 et TraF/VirB10 provenant du pKM101, avec le nom des compartiments et les dimensions indiqués, en vues de côté (A), de dessous (B) et en coupe (C) respectivement. Image adaptée de (Rivera-Calzada et al., 2013). Représentation des unités hétérotrimériques obtenues par cristallographie aux rayons X (PDB code : 3JQO) à l'intérieur du complexe (D) et extraites en forme unitaire (E). Les sous-unités de ce complexe sont représentées en magenta pour la portion C-terminale de TraF, en jaune pour le domaine C-terminal de TraO et en bleu pour TraN sous sa forme entière. Image adaptée de (Chandran et al., 2009).

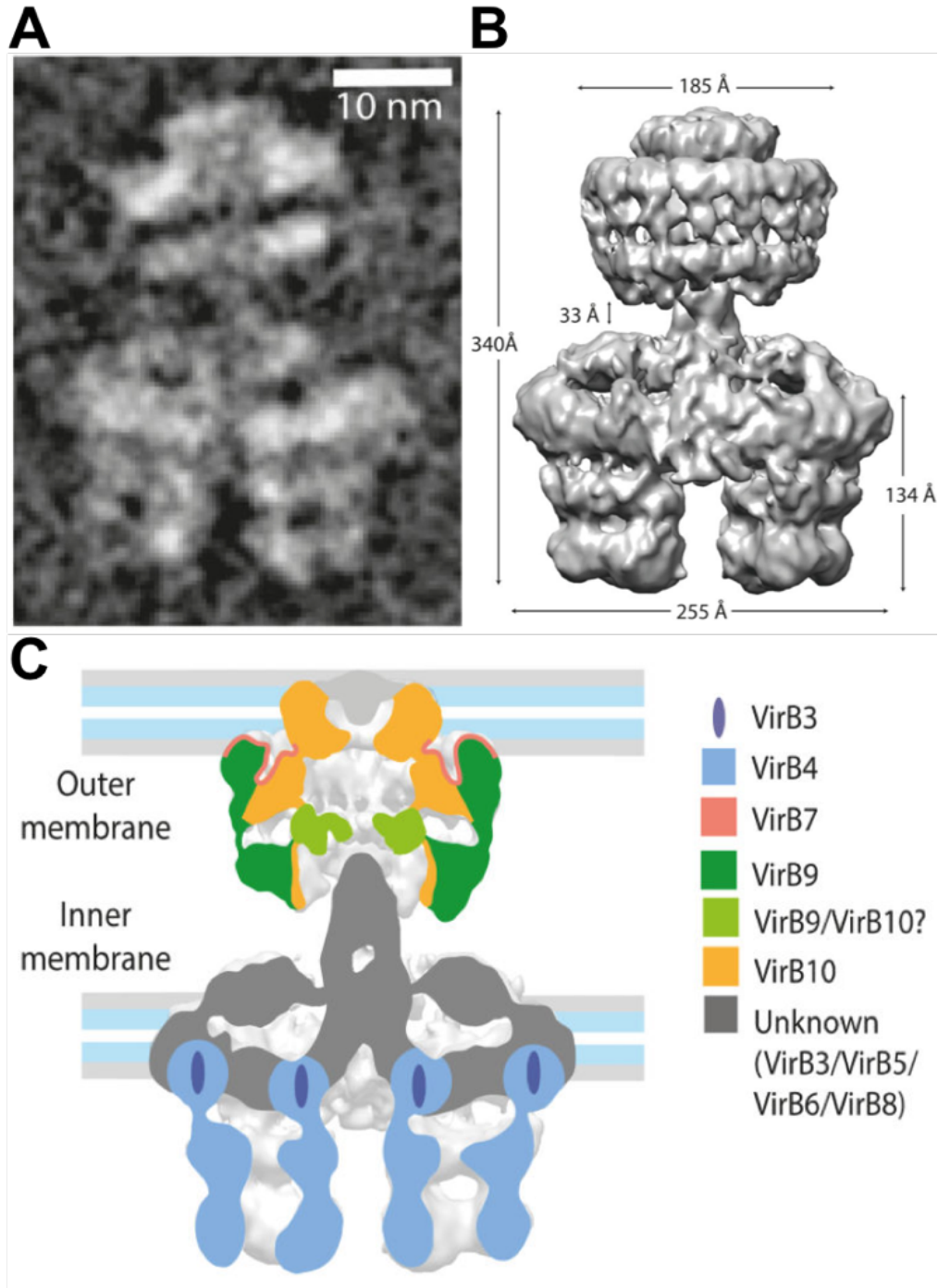


Figure 28. Structure du T4SS<sub>3-10</sub> obtenue par microscopie électronique à coloration négative (EMDB code : 2567). A) Classe 2D représentant le T4SS<sub>3-10</sub> obtenue après alignements et classifications initiaux. B) Vue de côté du T4SS<sub>3-10</sub>. C) Représentation schématique du T4SS<sub>3-10</sub>. Image adaptée de (Low et al., 2014b).

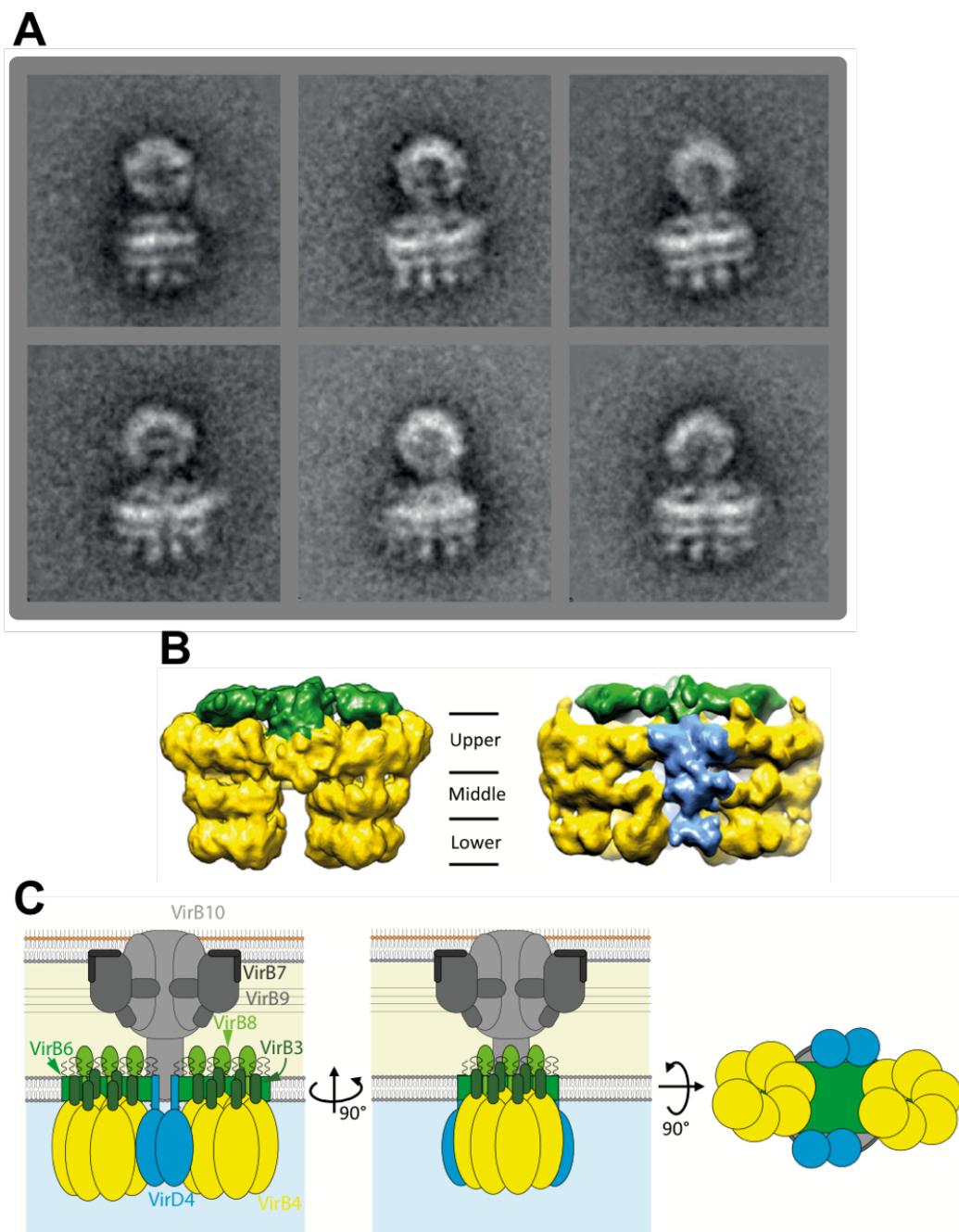


Figure 29. Structure du T4SS<sub>3-10+D4</sub> obtenue par microscopie électronique à coloration négative (EMDB code : 3585). A) Moyennes des classes 2D représentant le T4SS<sub>3-10+D4</sub> obtenues après alignements et classifications initiaux. B) Vues de côté du T4SS<sub>3-10</sub> (à gauche) et du T4SS<sub>3-10+D4</sub> (à droite). En vert est représenté le complexe de la membrane interne composé de VirB3, VirB4, VirB6, VirB8 et le domaine N-terminal de VirB10, en jaune VirB4 et en bleu VirD4. C) Représentation schématique du T4SS<sub>3-10+D4</sub>. Image adaptée de (Redzej et al., 2017).

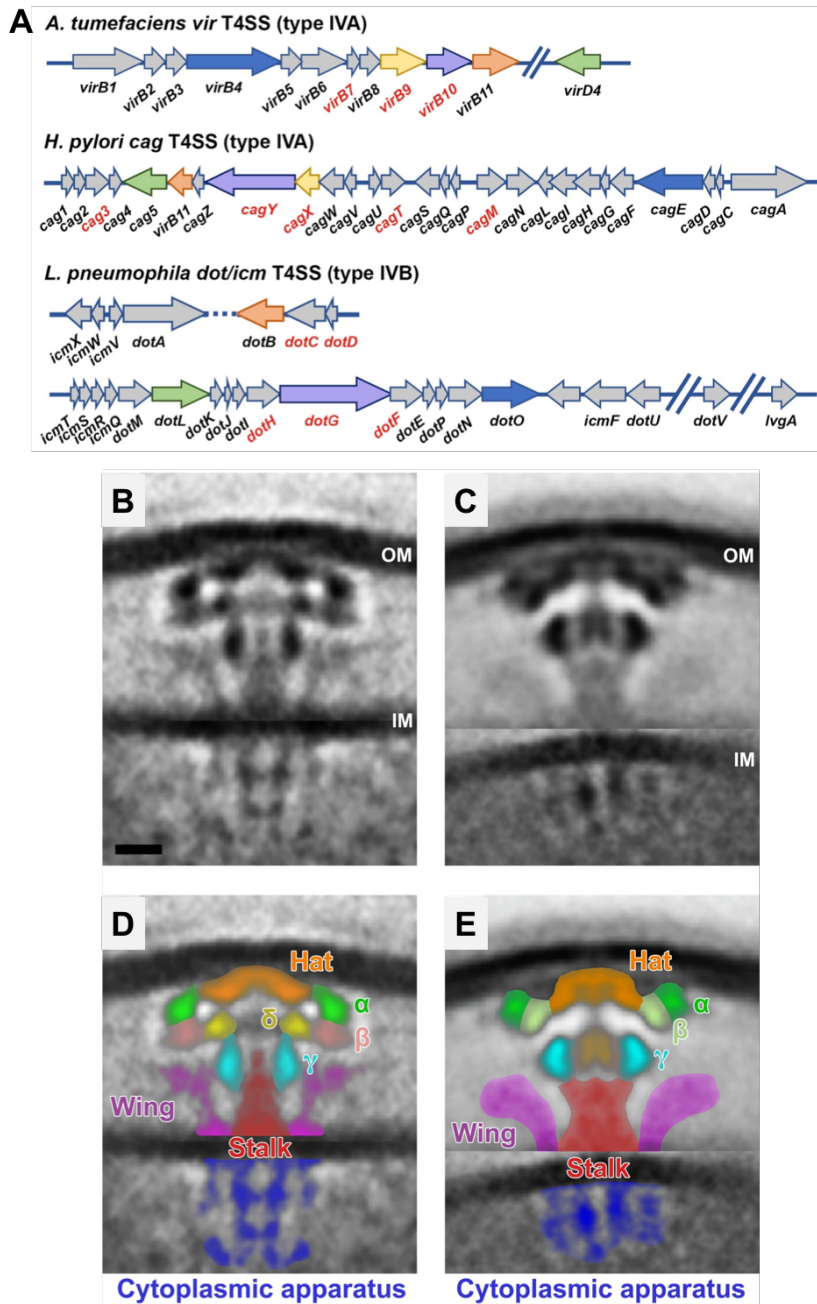


Figure 30. Structures *in situ* du T4ASS provenant d'*H. pylori* et du T4BSS provenant de *L. pneumophila*. A) Organisation des gènes *vir* provenant d'*A. tumefaciens*, de l'îlot de pathogénicité *cag* provenant d'*H. pylori* et des régions du gène *dot/icm* provenant de *L. pneumophila*. Moyennes des sous-tomogrammes du T4ASS provenant d'*H. pylori* (B) et du T4SS provenant de *L. pneumophila* (C). Densités colorées observées dans les moyennes des sous-tomogrammes montrées en (D) et (E), respectivement. La barre d'échelle montrée en (B) correspond à 10 nm. Image adaptée de (Chang et al., 2017).

### **1.4.5 Mécanisme d'assemblage des systèmes de sécrétions de type IV**

Dans le passé, le modèle d'assemblage du T4SS invoquait une bifurcation tardive dans la voie d'assemblage du T4SS pour la production du pilus ou du canal de translocation (Christie et al., 2005; Costa et al., 2015; Fronzes, Christie, et al., 2009; Trokter et al., 2014a). De nos jours, un nouveau modèle est proposé et souligne l'importance des protéines retrouvées à la pointe du pilus, notamment de VirB5, et de l'extrémité distale du complexe de la membrane externe pour le mode d'extension du pilus (Fig. 31) (Gordon et al., 2017). Dans ce modèle, les pili fonctionnent dans un mode de « recherche de partenaire », soit par des cycles dynamiques d'extensions ou de rétractions, comme le montre le F pilus, soit par un ou plusieurs mécanismes dans lesquels les pili s'accumulent abondamment dans le milieu afin de promouvoir la formation d'agrégats d'accouplements (Clarke, Maddera, Harris, & Silverman, 2008; Samuels, Lanka, & Davies, 2000). Après l'établissement des contacts entre le donneur et le receveur, le T4SS cesse la production du pilus et passe au mode « accouplement ». Divers signaux régulent le commutateur morphogénétique pilus-canal, y compris ceux propagés par la cellule réceptrice et ceux de la cellule donneuse associée à l'amarrage au récepteur du substrat VirD4, l'engagement de ce récepteur avec le complexe de la membrane interne et l'hydrolyse de l'ATP par les ATPases du T4SS, VirB4 et VirB11 (Arutyunov & Frost, 2013; Cascales, Atmakuri, Sarkar, & Christie, 2013; E. Cascales & P. J. Christie, 2004a; de la Cruz, Frost, Meyer, & Zechner, 2010; Frost & Koraimann, 2010; Lang et al., 2011; Lang & Zechner, 2012).



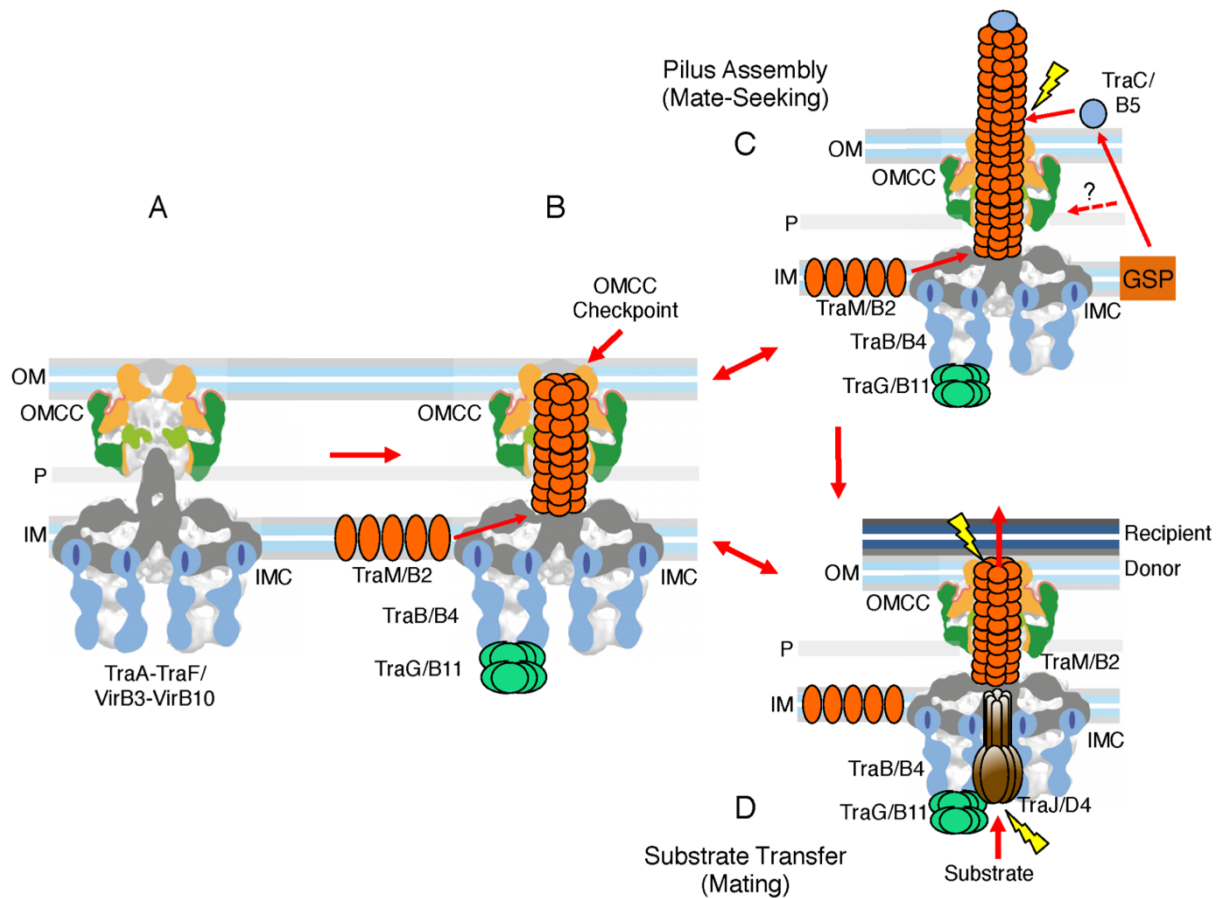


Figure 31. Modèle de travail pour la biogenèse des T4ASSs. Les étapes de la chaîne d'assemblage du T4SS comprennent (A) la formation de la sous-structure T4SS<sub>3-10</sub> (TraA-TraF/VirB3-VirB10) (Low et al., 2014b) et (B) l'élaboration d'un pilus court qui s'étend de la membrane interne à la surface cellulaire par un mécanisme nécessitant de l'énergie apportée par les ATPases TraB/VirB4 et TraG/VirB11. Ensuite, (C) à partir du complexe retrouvé à la membrane externe (intitulé OMCC sur l'image), agissant comme point de contrôle, le pilus s'étend à partir de la surface de la cellule jusqu'au recrutement de TraC/VirB5 qui pourrait se dérouler au niveau de l'espace périplasmique ou bien dans l'espace extracellulaire. Enfin, (D) lors d'un contact direct ou d'un contact réalisé à l'aide d'un médiateur avec une cellule réceptrice, un signal de contact est transmis à travers l'enveloppe cellulaire du donneur, entraînant le recrutement du récepteur du substrat TraJ/VirD4, l'ancrage du substrat et l'hydrolyse de l'ATP. Les protéines Tra provenant du pKM101 et leurs homologues Vir provenant du T4SS VirB/D4 requises pour chaque étape de la voie d'assemblage sont indiquées. Image adaptée de (Gordon et al., 2017).

### 1.4.6 Mécanisme de translocation du substrat des systèmes de sécrétions de type IV

Le mécanisme de translocation a été décrit exhaustivement par l'intermédiaire de l'étude de la translocation de l'ADN-T, substrat retrouvé chez *A. tumefaciens*, à travers le T4SS VirB/D4 (E. Cascales & P. J. Christie, 2004b). Il a été montré que l'ADN-T réalise des contacts séquentiels avec VirD4, VirB11, VirB6, VirB8, VirB9 puis VirB2 (Fig. 32) (Baron, 2006b; Christie et al., 2014; Costa et al., 2015; Fronzes, Christie, et al., 2009). Les autres composants du T4SS n'interagissent pas avec l'ADN-T, mais sont essentiels pour le transfert du substrat au cours des différentes étapes. Le mécanisme de translocation commence par le contact entre VirD4, qui est décrit comme étant le récepteur du substrat à la porte de l'appareil de sécrétion, et l'ADN-T (Atmakuri et al., 2004; Atmakuri, Ding, & Christie, 2003). Par la suite, VirD4 transfère le substrat à VirB11, sans nécessité d'un apport énergétique pour effectuer ce transfert (Atmakuri et al., 2004). Néanmoins, ce transfert n'a pas pu être détecté lorsque le gène de VirB7 a été délété, mettant en évidence le rôle essentiel de cette lipoprotéine dans la médiation de la formation du complexe central du T4SS au début de l'assemblage. Ensuite, VirB11 délivre l'ADN-T aux sous-unités de la membrane interne des bactéries VirB6 et VirB8. Ces protéines semblent fonctionner ensemble puisque la délétion de chacune bloque la translocation (Atmakuri et al., 2004; E. Cascales & P. J. Christie, 2004b). De plus, pour que le transfert fonctionne, il y a la nécessité d'un apport énergétique provenant des ATPases cytoplasmiques de ce système VirB4, VirB11 et VirD4. Finalement, le substrat est transféré à travers le périplasme vers les protéines associées au complexe membranaire externe VirB2 et VirB9. Les protéines VirB3, VirB5 et VirB10 sont essentielles pour réaliser ce dernier processus. En complément, il est évoqué que le substrat pourrait traverser le périplasme à travers un filament composé de la piline VirB2 ou bien que le substrat circulerait directement au travers de complexe central du T4SS et interagirait avec VirB2 uniquement au niveau de la face externe de la membrane externe de la bactérie.

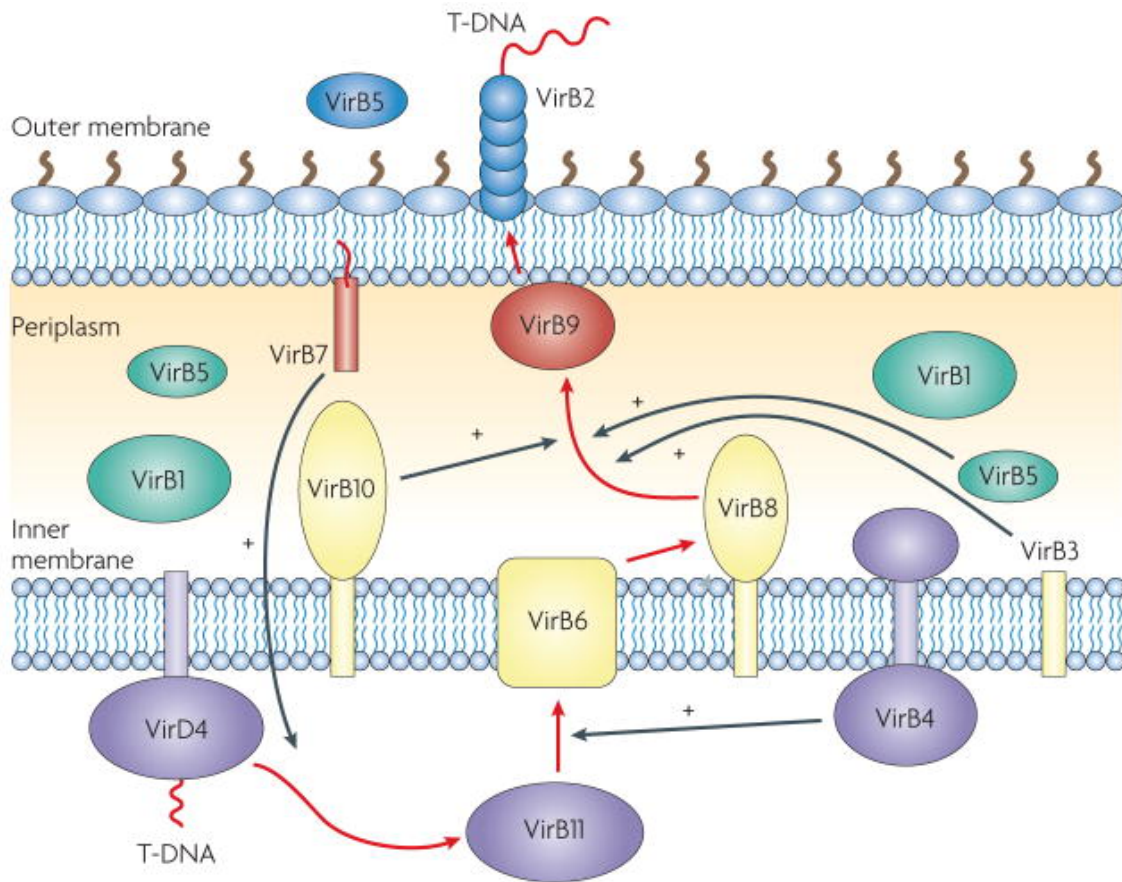


Figure 32. Voie de translocation de l'ADN-T dans le T4SS VirB/D4 d'*A. tumefaciens*, basée sur une étude antérieure d'immunoprécipitation de l'ADN-T avec les composants de ce système (E. Cascales & P. J. Christie, 2004b). La voie du substrat est représentée par des flèches rouges. L'ADN-T interagit directement avec VirD4, VirB11, VirB6, VirB8, VirB9 et VirB2. Les autres composants qui influencent le transfert du substrat indirectement sont représentés par des flèches noires. Image adaptée de (Fronzes, Christie, et al., 2009).

## 1.5 Les protéines VirB8 étant des composantes essentielles du cœur central des systèmes de sécrétions de type IV

### 1.5.1 Aperçu au niveau structural des protéines VirB8

Les protéines VirB8 sont des composantes de base conservées dans tous les T4SSs et leur longueur varie d'environ 200 à 260 acides aminés (Cao & Saier, 2001; Christie & Cascales, 2005). VirB8 est une protéine bitopique avec un court domaine N-terminal cytoplasmique, un domaine transmembranaire et un grand domaine périplasmique C-terminal (Baron, 2006b). Dans un premier temps, l'analyse des structures, obtenue par cristallographie aux rayons X, du domaine périplasmique des protéines VirB8, provenant d'*A. tumefaciens* (PDB code : 2CC3) et de *B. suis* (PDB codes : 2BHM et 4AKZ), a montré que les éléments de structures secondaires composant ce type de protéine consistait en 4 brins bêtas organisés en un feuillet bêta étendu et de 5 hélices alphas (Fig. 33) (S. Bailey, D. Ward, R. Middleton, J. G. Grossmann, & P. C. Zambryski, 2006b; Smith et al., 2012; Terradot et al., 2005b). Ces structures sont similaires au facteur de transfert nucléaire des mammifères NTF2 qui est une protéine qui dimérise et subit de multiples interactions protéine-protéine (Chaillan-Huntington et al., 2001). De plus, des études ont identifié des protéines VirB8 comme étant des composantes des systèmes de sécrétion retrouvés chez les protéines à Gram-positifs, notamment TcpC provenant de *Clostridium perfringens* et TraM provenant de *Streptococcus agalactiae*. Les structures des domaines périplasmiques de TcpC et de TraM (PDB codes : 3UB1 et 4EC6), obtenues par cristallographie aux rayons X, ont été explicitées comme partageant le même repliement que celui obtenu pour les protéines VirB8 provenant des bactéries à Gram-négatifs, malgré de grandes différences au niveau de leurs séquences primaires en acides aminés (Goessweiner-Mohr et al., 2013; Porter et al., 2012). Au sein des unités asymétriques des structures cristallographiques obtenues pour les protéines VirB8, les sous-unités sont empaquetées sous forme de dimères, comme retrouvé pour les VirB8 provenant de *B. suis*, ou bien sous forme de trimères, comme retrouvé pour TraM provenant de *Streptococcus agalactiae* (PDB code : 4EC6) (Fig. 34) (Bailey et al., 2006b;

*Goessweiner-Mohr et al., 2013; Terradot et al., 2005b*). En outre, des résultats d'analyses mutationnelles suggèrent que l'oligomérisation de ces protéines VirB8 est physiologiquement pertinente (Paschos, Patey, Sivanesan, Gao, Bayliss, Waksman, O'Callaghan, et al., 2006; Sivanesan & Baron, 2011b). Finalement, très récemment, six nouvelles structures, là aussi obtenues par cristallographie aux rayons X, des protéines VirB8 provenant de différentes espèces de *Bartonella* et de *Rickettsia typhi* ont été déterminées (Gillespie, Phan, Scheib, Subramanian, Edwards, Lehman, Piitulainen, Rahman, et al., 2015).

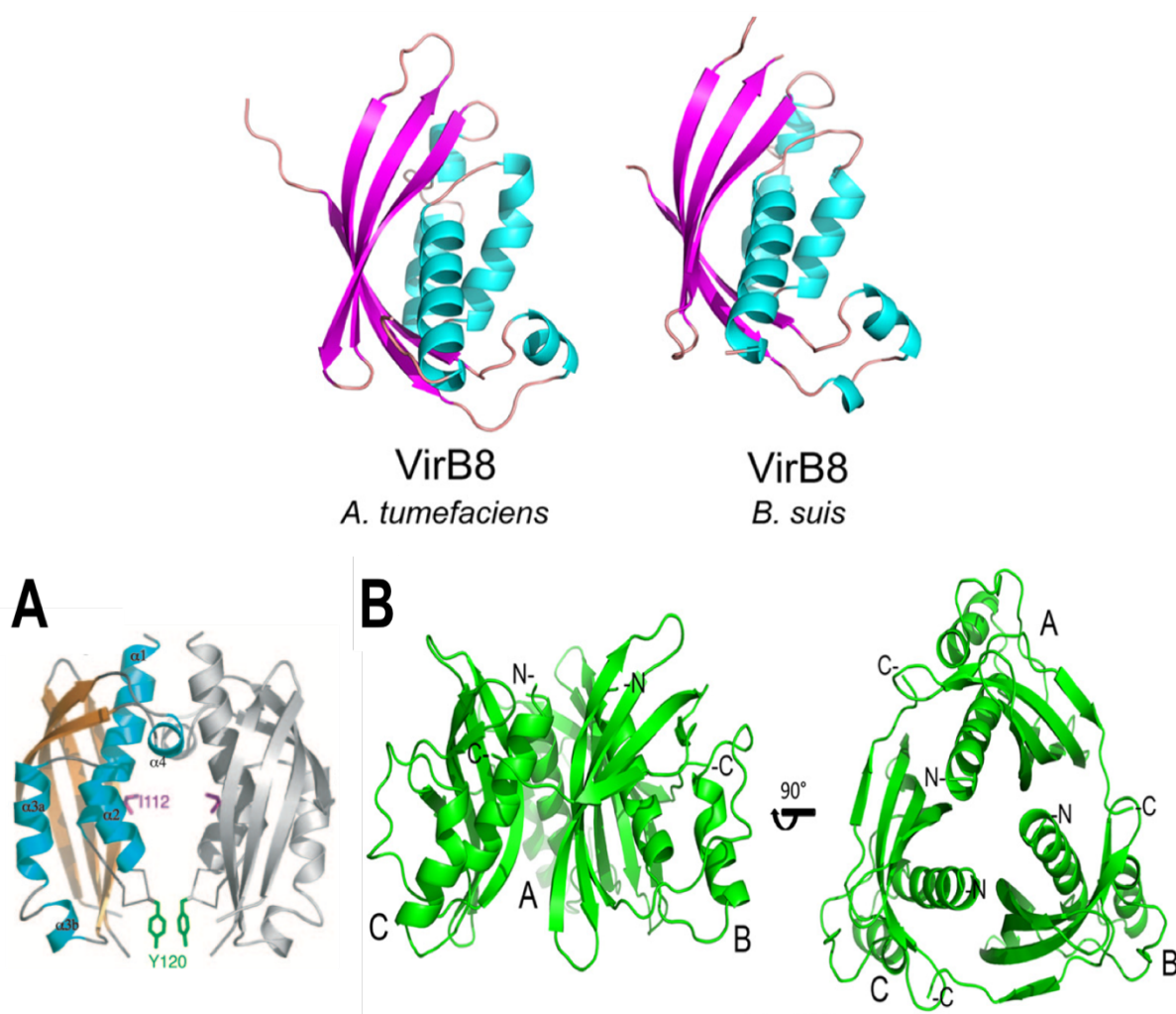


Figure 33. Représentation en ruban des structures obtenues par cristallographie aux rayons X, des domaines périplasmiques des protéines VirB8 provenant de *B. suis*, (A) représentée sous forme de dimère (PDB code : 2BHM), et (B) de TraM, en vue de côté et

de dessus, provenant de *Streptococcus agalactiae* formant un trimère (PDB code : 4EC6). Images adaptées de (Goessweiner-Mohr et al., 2013; Terradot et al., 2005b).

### **1.5.2 Les interactions avec les protéines VirB8 dans le complexe des systèmes de sécrétions de type IV**

VirB8 est un composant crucial à la fois pour la structure et aussi pour la fonction du T4SS. Chez *A. tumefaciens*, VirB8 a été décrite comme étant essentielle pour le passage des substrats du cytoplasme vers le périplasma et aussi pour la localisation spatiale du T4SS (P. K. Judd et al., 2005; Sivanesan & Baron, 2011b). Le rôle central de VirB8 en tant que facteur d'assemblage pour les composants du T4SS est apparu pour la première fois dans une étude de microscopie immunoélectronique traitant des interactions entre VirB8, VirB9 et VirB10 (R. B. Kumar, Y. H. Xie, & A. Das, 2000b). Ces mêmes interactions ont également été analysées à l'aide d'un test basé sur la cytologie bactérienne ciblant des protéines de fusion marquées par la GFP (Ding et al., 2002). Par la suite, des essais de doubles hybrides chez la levure ont été menés pour confirmer ces interactions et aussi pour effectuer un criblage avec des fragments peptidiques dérivés de tous les composants du T4SS (A. Das & Y. H. Xie, 2000; Ward, Draper, Zupan, & Zambryski, 2002). Ces études de doubles hybrides chez la levure ont suggéré que VirB8 interagit avec VirB1, VirB4, VirB8, VirB9, VirB10 et VirB11. Toutes ces interactions ont été confirmées avec des protéines purifiées et l'étude du T4SS provenant de *B. suis*, de plus une nouvelle interaction entre VirB8 et VirB5 a été mise en évidence (Hoppner et al., 2005; Yuan, Carle, Gao, Sivanesan, Aly, Hoppner, et al., 2005). Des études d'immunoprécipitation de l'ADN-T (TrIP) ont montré que VirB8 peut être réticulée (*crosslinked*) avec le complexe de l'ADN-T, composé d'ADN monocaténaire et des protéines de virulence VirD2 et VirE2, mettant en évidence le rôle direct de VirB8 dans la translocation du substrat (E. Cascales & P. J. Christie, 2004b). Par des expériences de TrIP, certaines mutations du gène de VirB6 ont montré ne pas affecter la réticulation du substrat avec VirB6, mais ont bloqué la réticulation de l'ADN-T avec VirB8 ceci évoquant une participation séquentielle de ces deux protéines pour le transfert du substrat et reflétant un arrangement architectural possible pour cette partie du canal de translocation (S. J. Jakubowski et al., 2004). De plus, il a été démontré, par des études de

microscopie à immunofluorescence, que VirB6 et VirB8 sont colocalisées chez *A. tumefaciens* et que ces deux protéines ont un profil de fractionnement similaire après isolement des protéines VirB issues des membranes avec un détergent doux (P. K. Judd et al., 2005; Yuan, Carle, Gao, Sivanesan, Aly, Hoppner, et al., 2005). Plus précisément, VirB6 et VirB8 sont cofractionnées avec un complexe de masse moléculaire élevée comprenant les composants du noyau central du T4SS, ainsi qu'avec un complexe de faible masse moléculaire comprenant les protéines associées au pilus, ce qui suggère que ces deux protéines peuvent relier les deux unités fonctionnelles du T4SS (Yuan, Carle, Gao, Sivanesan, Aly, Hoppner, et al., 2005). Très récemment, VirB8 a été décrite comme interagissant avec VirB10 par l'intermédiaire de son brin bêta numéro 1 (Sharifahmadian, Nlend, Lecoq, Omichinski, & Baron, 2017). Pour finir, les interactions de VirB8 avec les autres protéines composant le T4SS sont généralement transitoires, mais néanmoins essentielles pour la fonctionnalité du complexe. Par conséquent, VirB8 peut être décrite comme facteur de nucléation pour l'assemblage du T4SS (Baron, 2006b).

### **1.5.3 Les protéines VirB8 forment des homodimères**

Les protéines VirB8 sont connues pour former des homodimères (A. Das & Y. H. Xie, 2000; Ding et al., 2002; Sharifahmadian, Arya, et al., 2017; Ward et al., 2002). L'analyse structurale des protéines VirB8, provenant d'*A. tumefaciens* et de *B. suis*, ainsi que des analyses *in vitro* des protéines purifiées confirment que les protéines VirB8 forment des dimères au niveau de la portion en hélices et plus précisément au niveau des hélices 2 et 4 (Bailey et al., 2006b; Sharifahmadian, Arya, et al., 2017; Smith et al., 2012; Terradot et al., 2005b). De plus, par des études de chromatographie d'exclusion stérique analytique, il a été démontré que les domaines périplasmiques de VirB8, purifiés de manière recombinante, forment des dimères dépendants de la concentration (Paschos, Patey, Sivanesan, Gao, Bayliss, Waksman, O'Callaghan, et al., 2006; Sharifahmadian, Arya, et al., 2017; Sivanesan & Baron, 2011b). En outre, les résidus retrouvés au niveau de l'interface de dimérisation de VirB8 provenant de *B. suis* sont importants pour la survie de *Brucella* dans les macrophages suggérant que

l'homomultimérisation de VirB8 a une importance fonctionnelle (Paschos, Patey, Sivanesan, Gao, Bayliss, Waksman, O'Callaghan, et al., 2006). Et pour finir, des analyses *in vitro* et *in vivo* de variants de VirB8, retrouvés au site de dimérisation d'*Agrobacterium*, ont montré l'importance de ces sites pour l'assemblage du T-pilus et les fonctions du T4SS (Sivanesan & Baron, 2011b). Toutes ces informations rassemblées suggèrent que les résidus impliqués dans la dimérisation des protéines VirB8 jouent un rôle important dans les fonctions du T4SS (Baron, 2006b).

#### **1.5.4 Inhibition des protéines VirB8 par des petites molécules organiques**

Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) et le rapport O'Neill soumis récemment au gouvernement britannique, nous sommes confrontés à une crise sanitaire majeure due à l'augmentation de la résistance des bactéries pathogènes aux antibiotiques ([www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport](http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport)). En septembre 2016, les Nations Unies ont tenu un sommet spécial sur la résistance aux antimicrobiens pour souligner l'importance du défi mondial que suscite la propagation des gènes de résistances, par l'intermédiaire de bactéries porteuses, et les échanges d'éléments génétiques mobiles tels que les plasmides distribuant les gènes dans la population. Le développement de nouveaux antibiotiques ou de traitements antimicrobiens alternatifs, tels que les thérapies par phages ou médicaments anti-virulence, est donc urgent. La conception d'inhibiteurs des T4SSs ajouterait une nouvelle approche qui réduirait la propagation des gènes de résistances aux antimicrobiens, en particulier dans les hôpitaux, où ce processus entraîne une morbidité et une mortalité croissante. Actuellement, l'interférence au niveau des fonctions des T4SSs n'a pas attiré beaucoup d'attention en tant que stratégie pour contrer la propagation des gènes de résistance aux antimicrobiens. Voilà pourquoi, pour désarmer de nombreux pathogènes et réduire la propagation des gènes de résistances aux antibiotiques, les protéines VirB8, provenant du T4SS de *B. suis*, ont été ciblées pour le développement de petites molécules inhibitrices des T4SSs (Baron, 2005). Tout d'abord, un criblage d'une banque de petites molécules a conduit à l'identification d'inhibiteurs spécifiques de VirB8 qui réduisaient la prolifération intracellulaire de *Brucella abortus* 2308 (Paschos et al., 2011). Le criblage d'inhibiteurs a identifié des



molécules qui inhibaient la dimérisation de VirB8, provenant de *B. suis*, et affectaient la fonctionnalité du T4SS (Paschos et al., 2011; Smith et al., 2012). De plus, une structure cristallographique d'un complexe entre VirB8 et une molécule inhibitrice appelée B8I-1 (2-(butylamino)-8-quinolinol) (PDB code : 4AKY) a révélé le site de liaison de l'inhibiteur retrouvé à proximité de l'hélice alpha-1 et des résidus E115, K182, R114 et Y229 (Fig. 35) (Smith et al., 2012). Ce site de liaison étant éloigné du site de dimérisation, les auteurs ont évoqué l'hypothèse que l'inhibition était la conséquence de changements conformationnels au niveau de VirB8 (Smith et al., 2012). Très récemment, un criblage de fragments, décrits comme étant des petites molécules de moins de 200 Da, a identifié des nouvelles petites molécules se liant à VirB8 provenant de *B. suis* (Sharifahmadian, Arya, et al., 2017). Notamment deux molécules ont une affinité de liaison différentielle entre VirB8 sauvage et un variant de VirB8 affectant le site de dimérisation ceci soulignant leurs différences conformationnelles (Sharifahmadian, Arya, et al., 2017).

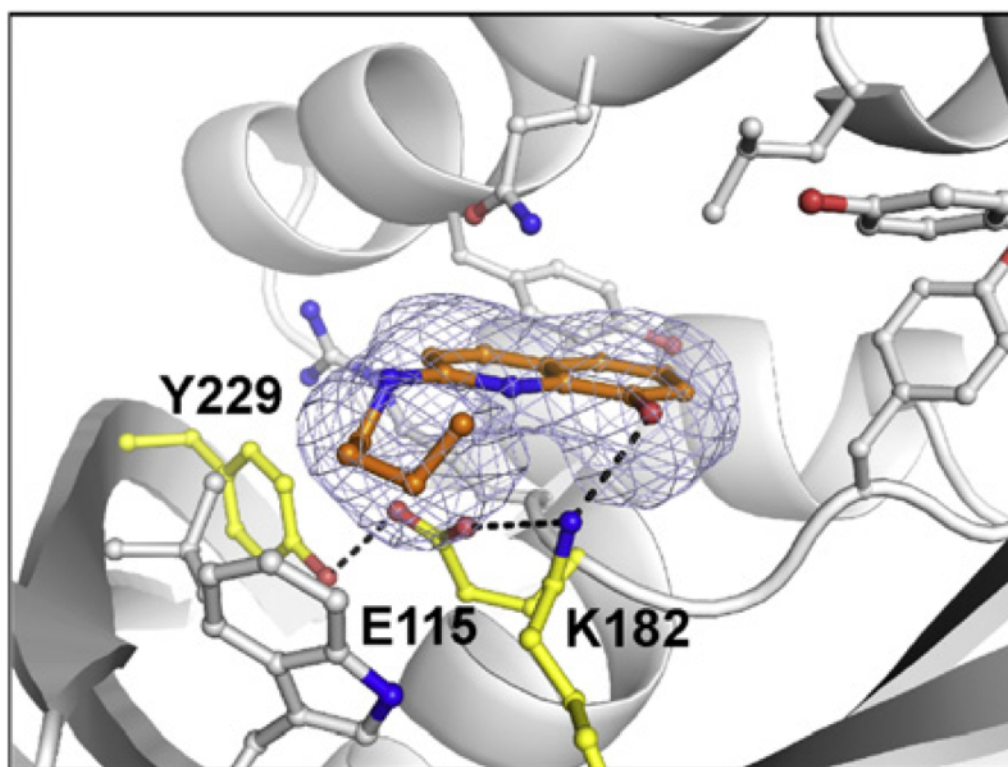


Figure 34. Structure cristallographique de VirB8 provenant de *B. suis* en complexe avec la molécule inhibitrice B8I-1 (PDB code : 4AKY). La carte de densité obtenue pour la molécule B8I-1 est représentée en bleu avec la molécule à l'intérieur. Le réseau de ponts

hydrogènes formé entre la molécule B8I-1 et les résidus E115, K182 et Y229 est montré en traits pointillés noirs. Image adaptée de (Smith et al., 2012).

## 1.6 Objectifs des projets de recherche et justification de la méthodologie

### 1.6.1 Objectifs généraux

L'objectif général de cette thèse était d'utiliser une approche expérimentale pluridisciplinaire intégrant de la biologie structurale, de la biochimie et de la biologie chimique visant à comprendre les bases moléculaires des T4SSs. Pour cela, l'accent a été mis sur un des composants essentiels du cœur central de ce système, les protéines VirB8, et plus particulièrement en se focalisant sur la protéine TraE, qui est un homologue des protéines VirB8 provenant du plasmide de conjugaison dénommé le pKM101. Dans le chapitre numéro 2 de cette thèse, une étude de la structure, de la fonction et de l'inhibition de TraE a été évoquée. Pour cela, une comparaison avec les structures disponibles des autres homologues de VirB8 a été menée, notamment VirB8 provenant d'*A. tumefaciens* et *B. suis* (PDB codes : 2CC3 et 2BHM respectivement). Puis une caractérisation structurale et fonctionnelle de l'interface de dimérisation obtenue pour TraE a été réalisée. De plus, la mise en évidence que TraE et les autres protéines VirB8, provenant d'*A. tumefaciens*, de *B. suis* et aussi d'*H. pylori*, peuvent former des hétérodimères et aussi que TraE peut interagir avec les protéines VirB10, qui est une autre protéine du cœur central des T4SSs, provenant d'*A. tumefaciens* et *B. suis*, a été décrite. Pour finir, une série de petites molécules dérivées d'inhibiteurs de la dimérisation de VirB8 provenant de *B. suis* a été testée de manière *in silico*, *in vitro* et enfin *in vivo*. Dans le chapitre numéro 3 de cette thèse, pour remédier à l'augmentation croissante de la résistance aux antimicrobiens, une stratégie basée sur l'étude structurale de TraE pour identifier des inhibiteurs de la conjugaison bactérienne médiée par les T4SSs a été développée. À cet égard, une banque de fragments a été criblée *in vitro*. Puis, une analyse structurale des complexes formés entre TraE et des fragments liants a été menée. De plus, de nouvelles petites molécules dérivées de

ces fragments liants ont été conçues. Et enfin, une caractérisation structurale des complexes formés entre TraE et ces nouvelles petites molécules ainsi qu'une analyse des effets, *in vivo*, sur la fonction de conjugaison du T4SS provenant du pKM101 ont été réalisées. Dans le chapitre numéro 4 de cette thèse, pour pallier au peu d'information disponible sur les composants du T4SS liés à la membrane interne des bactéries, une caractérisation structurale de la forme entière de TraE et de TraE en complexe avec TraD, une protéine homologue de VirB6 provenant du pKM101, a été effectuée. Par rapport à ce chapitre, une caractérisation biochimique de la protéine membranaire TraE seule et en complexe avec TraD a été tout d'abord réalisée. Et dans un second temps, une analyse structurale et la mise en contexte de ces protéines par rapport au T4SS en entier ont été développées. Pour conclure, les résultats obtenus dans cette thèse évoquent premièrement que les protéines VirB8 partagent des sites fonctionnellement importants qui peuvent être exploités pour concevoir des inhibiteurs spécifiques de la fonction des T4SSs. Puis, que la stratégie basée sur la caractérisation structurale, présentée dans le chapitre 3, peut être généralement applicable pour la conception d'inhibiteurs de transfert de gène de résistance aux antimicrobiens et de la virulence bactérienne. Et enfin, les résultats apportés par cette thèse fournissent des informations importantes au sujet des bases moléculaires du cœur central des T4SSs et aussi de nouvelles perspectives sur les interactions des protéines VirB8 avec d'autres composants des T4SSs.

## 1.6.2 Méthodologie générale

Pendant mes études doctorales, j'ai utilisé une grande diversité de techniques de biologie structurale, de biochimie et de biologie chimique. Du point de vue de la biologie structurale, la cristallographie aux rayons X a été pratiquée comme technique prédominante pour caractériser la protéine TraE, dans sa forme périplasmique, et aussi les complexes formés entre TraE et des fragments ou des petites molécules organiques. De plus, pour caractériser la protéine TraE dans sa forme entière ou le complexe TraD-TraE, j'ai utilisé la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS : *Small Angle X-ray Scattering*) et la microscopie électronique. Les expériences de microscopie électronique ont été menées en collaboration avec Aleksandr Sverzhinsky, provenant du laboratoire Pascal (Département de biochimie et médecine moléculaire de

l'Université de Montréal), et Aurélien Fouillen, provenant des laboratoires Nanci (Département de stomatologie de l'Université de Montréal) et Baron (Département de biochimie et médecine moléculaire de l'Université de Montréal). Pour identifier les fragments ou les petites molécules organiques se liant à TraE, un partage d'une banque de fragment a été mené en collaboration avec l'IRIC, des expériences de fluorimétrie différentielle à balayage (DSF : *Differential Scanning Fluorimetry*), menées en collaboration avec Benoit Bessette provenant du laboratoire Baron (Département de biochimie et médecine moléculaire de l'Université de Montréal), et des expériences d'extinction de fluorescence ont été réalisées en collaboration avec Jonathan Smart et Tarun Arya, provenant du laboratoire Baron (Département de Biochimie et médecine moléculaire de l'Université de Montréal). J'ai fait des expériences de doubles hybrides chez les bactéries pour d'une part caractériser l'homodimérisation et l'hétérodimérisation des protéines VirB8, puis d'autre part pour analyser les interactions entre TraE et les protéines VirB10 provenant d'*A. tumefaciens* et *B. suis*. Pour corroborer *in vitro* ces résultats obtenus, des expériences de réticulation (*crosslinking*) et de résonance plasmonique de surface (SPR : *Surface Plasmon Resonance*) ont été opérées en collaboration avec Mark A. Hancock provenant de la *SPR-MS Facility (McGill University)*. J'ai aussi procédé à des expériences, *in silico*, d'arrimages moléculaires pour observer les sites d'interactions obtenus entre TraE et les fragments ou les petites molécules organiques. La caractérisation biochimique du complexe TraD-TraE a été mise en place en collaboration avec Charline Mary provenant du laboratoire Baron (Département de biochimie et médecine moléculaire de l'Université de Montréal). Pour finir, j'ai effectué des tests de conjugaison plasmidique pour étudier les effets de la multimérisation de TraE et des fragments ou petites molécules organiques sur la fonction du T4SS formé par le pKM01.

### 1.6.3 Expériences de biologie structurale

Généralement, la résolution de structure à l'échelle atomique est limitée à trois techniques : la cristallographie aux rayons X, la spectroscopie par RMN et la microscopie électronique (Fig. 36) (Fernandez-Leiro & Scheres, 2016). La spectroscopie RMN se déroule en solution et convient à l'identification de la dynamique des structures protéiques et des

interactions en solution. Le plus gros problème associé à cette technique est la limitation en termes de taille de la protéine ou du complexe d'étude. Il est très difficile d'étudier des molécules plus grandes que 40 à 50 kDa par RMN. Au cours des dernières années, la microscopie électronique a pris énormément de place dans l'échiquier de la biologie structurale. Le prix Nobel de chimie 2017 a d'ailleurs été décerné aux inventeurs de la cryo-EM qui sont Jacques Dubochet, Joachim Frank et Richard Henderson. Cette technique très récente est en constante évolution au cours des dernières années, notamment avec l'apport de nouveaux détecteurs, ceux à détection d'électrons de manière directe, qui ont permis d'obtenir des structures à très hautes résolutions qui se comparent avec les résolutions obtenues par cristallographie aux rayons X ou RMN. Actuellement, les limitations majeures au sujet de cette technique sont d'une part l'accès aux instruments très coûteux de microscopie électronique et d'autre part, inversement à la RMN, il est très compliqué d'obtenir des structures à très hautes résolutions pour des protéines de moins de 80 à 100 kDa. Nous avons tout de même sélectionné cette méthode pour l'étude des protéines membranaires, TraE, dans sa forme entière formant un complexe de haut poids moléculaire, et du complexe formé entre TraD et TraE, là aussi dans leurs formes entières. La technique utilisée majoritairement dans les recherches évoquées dans cette thèse est la cristallographie aux rayons X. Cette technique est fondée sur l'analyse de la matière par l'intermédiaire de clichés de diffractions obtenus à l'aide de rayons X, particulièrement lorsque la matière est retrouvée sous forme de cristaux. La cristallographie aux rayons X a ses propres limitations, particulièrement l'obtention de cristaux permettant d'avoir des clichés de diffractions à hautes résolutions, mais de nombreuses informations pas appropriées continuent à circuler au sujet de cette technique. Notamment, la cristallographie est souvent critiquée, car elle permet d'obtenir une représentation statique d'une protéine immobilisée dans un état cristallin. En réalité, les cristaux de protéines sont composés de 40 à 60 % de molécules de solvant, généralement de l'eau, et d'environ 600 mg/ml de protéine, en moyenne, ceci conférant une flexibilité relative au sein des cristaux. De plus, des études d'encombrements moléculaires dans la cellule ont montré que les concentrations macromoléculaires totales dans le cytosol sont comprises entre 300 et 400 mg/ml ceci suggérant que l'environnement cristallin est une approximation raisonnable du cytosol (Ellis, 2001). Au niveau de notre recherche, nous avons utilisé cette technique pour caractériser TraE, dans sa forme périplasmique, et TraE en complexe avec des fragments et des petites molécules

organiques. Pour finir, la caractérisation structurale de TraE, dans sa forme entière, a aussi été réalisée par l'utilisation d'une technique de biologie structurale à basse résolution, le SAXS. Cette technique permet de déterminer la dimension et la forme des protéines ayant quelques nanomètres de diamètre, de l'ordre de 1 à 150 nm. Conceptuellement, les expériences de SAXS sont très simples. L'échantillon est éclairé par des rayons X et le rayonnement diffusé est enregistré par un détecteur. Comme les mesures de SAXS sont effectuées très près du faisceau primaire, la technique profite énormément de la brillance des faisceaux de rayons X fournis par les accélérateurs de particules connus sous le nom de synchrotron. De notre côté, nous avons réalisé ces expériences de SAXS au synchrotron d'Ithaca, connu sous le nom de MacChess, aux USA.

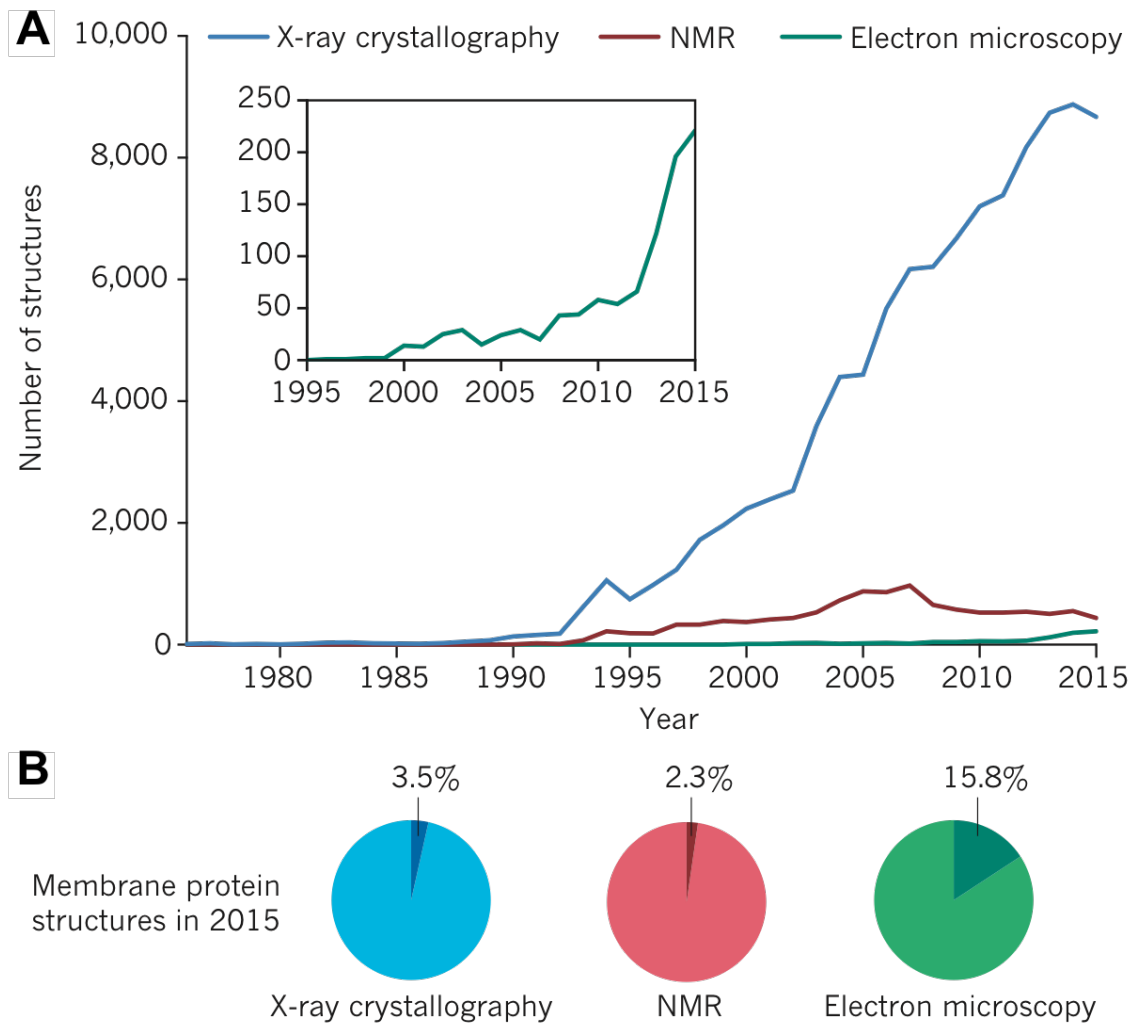


Figure 35. Croissance de la biologie structurale au cours des 40 dernières années. A) Le nombre de structures enregistrées dans la PDB, tel que déterminé par les techniques de cristallographie aux rayons X (en bleu), de RMN (en rouge) et de microscopie électronique (en vert) entre 1975 et 2015. B) Pourcentage de structures de protéines membranaires découvertes en 2015 en utilisant les trois techniques. Image adaptée de (Fernandez-Leiro & Scheres, 2016).

#### 1.6.4 Expériences de chimie biologique

Pour identifier des fragments ou des petites molécules organiques se liant à TraE, des expériences de chimies biologiques ont été réalisées notamment des expériences de DSF. Cette approche est généralement utilisée pour évaluer la stabilité des protéines dans une expérience dans laquelle la température est augmentée graduellement. Cette technique mesure des changements de la température de fusion des protéines en surveillant leur repliement en présence d'un colorant fluorescent, le SYPRO orange, qui se lie non spécifiquement aux surfaces hydrophobes des protéines. À une certaine température lorsque la protéine se déplie, le SYPRO orange se lie aux surfaces hydrophobes exposées au solvant ce qui entraîne une augmentation de sa fluorescence. Les plus gros avantages de cette technique sont qu'il faut une toute petite quantité de protéine, de l'ordre de 1 à 10  $\mu\text{M}$ , et que l'on peut réaliser cette expérience de criblage à haut débit sur un appareil de PCR en temps réel en obtenant des résultats très rapidement. Pour nos études, nous avons criblé une banque de fragments de 505 molécules et les changements des températures de fusion des protéines en présence des fragments, notamment la stabilisation par des fragments liants, ont été déterminés sur la base des changements de fluorescence du SYPRO orange. La première partie de la banque de fragments, composée de 186 molécules, a été produite en collaboration avec Edward Ruediger de l'Institut de recherche en immunologie et oncologie (IRIC) de l'Université de Montréal et les autres molécules ont été achetées chez la compagnie Maybridge. Pour valider les résultats de cette expérience de criblage, des expériences *in vitro* d'extinction de fluorescence intrinsèque ont été entreprises. Ce type d'expérience est basé sur le fait que la majorité des protéines portent un fluorophore intrinsèque naturel, par l'intermédiaire de leur tryptophane, éliminant ainsi le besoin d'étiqueter la protéine avec un fluorophore extrinsèque tel que la fluorescéine par exemple. Dans un premier temps, pour effectuer ces expériences nous avons réalisé un balayage de longueurs d'onde pour déterminer pour quelle longueur d'onde nous obtenons une émission de fluorescence intrinsèque maximale pour la protéine TraE seule. Puis dans un second temps, nous avons réalisé des cinétiques d'extinction de fluorescence en présence de fragments ou de petites molécules organiques pour déterminer la constante de dissociation aussi appelée  $K_D$ . Pour finir, afin de prédire *in silico* les sites d'interactions obtenus entre TraE et les fragments ou les petites molécules organiques, des expériences d'arrimages moléculaires ont été menées. Ces



expériences d'arrimage moléculaire sont des méthodes largement utilisées dans les protocoles de criblages virtuels lors du développement de nouveaux médicaments. De notre côté, nous les avons réalisées en utilisant la combinaison de logiciels retrouvés dans PyRx et plus particulièrement les logiciels AutoDock Vina ainsi qu'AutoDock 4. Généralement, les logiciels d'arrimage moléculaire utilisent des algorithmes qui classent les interactions potentielles entre les protéines et les petites molécules organiques en fonction de la prédiction de la force des interactions non covalentes.

### 1.6.5 Expériences de biochimie

Pour étudier d'une part, l'homodimérisation et l'hétérodimérisation des protéines VirB8, puis d'autre part, pour analyser les interactions entre TraE et les protéines VirB10 provenant d'*A. tumefaciens* et de *B. suis*, des expériences de doubles hybrides chez les bactéries ont été effectuées. Le système de double hybride bactérien exploite le fait que le domaine catalytique de l'adénylate cyclase de *B. pertussis* se compose de deux fragments complémentaires, appelés T25 et T18, qui ne sont pas actifs lorsqu'ils sont physiquement séparés. Lorsque ces deux fragments sont fusionnés à des protéines interagissant entre elles, une complémentation fonctionnelle entre les deux fragments est réalisée, et par conséquent, une synthèse de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) peut se dérouler. La production de l'AMPC déclenche la production de  $\beta$ -galactosidase dans une souche particulière d'*E. coli* via une cascade de signalisation. La quantité de  $\beta$ -galactosidase dans la cellule dépend de la force de l'interaction et peut être quantifiée en mesurant la dégradation de son substrat, le 2-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG). Pour corroborer *in vitro* ces résultats, des expériences de *crosslinking* et de SPR ont été réalisées. Lors des expériences de *crosslinking*, les agents chimiques utilisés permettent de capturer des complexes protéine-protéine en les liant de manière covalente lorsqu'elles interagissent. Dans notre étude, nous avons utilisé le disuccinimidyl suberate (DSS) comme agent de *crosslinking*. Ce DSS est perméable aux membranes biologiques et contient des esters de N-hydroxysuccimide (NHS) réagissant avec les amines primaires retrouvées soit dans la chaîne latérale des lysines ou soit à l'extrémité N-terminale de chaque polypeptide. En parallèle de ces expériences de *crosslinking*, nous avons

mené des essais de SPR (*Surface Plasmon Resonance*). La SPR est une technique optique permettant la détection d'un ligand, pour notre étude une protéine, se fixant à un récepteur immobilisé sur une surface. Les plus gros avantages de cette technique sont qu'elle ne nécessite aucun marquage préalable des molécules cibles et qu'elle permet une détection en temps réel de manière quantitative. Finalement, pour étudier les effets de la multimérisation de TraE et des fragments ou petites molécules organiques sur la fonction du T4SS codé par le pKM101, des tests de conjugaison plasmidiques ont été conduits. Pour mener à bien ces essais, des lignées cellulaires d'*E. coli*, plus particulièrement la lignée FM433 (cellules donneuses de conjugaison résistantes à l'ampicilline) contenant soit le pKM101 ou soit un variant du pKM101 délété du gène *traE* et la lignée WL400 (cellules receveuses de conjugaison résistantes au chloramphénicol) ont été utilisées. La complémentarité de l'insertion du gène *traE* a été menée en utilisant le plasmide pTrc200 exprimant TraE ou des variants de TraE. Après incubation des cellules donneuses et receveuses, le nombre de colonies WL400 résistants à la fois à l'ampicilline et au chloramphénicol indique la fréquence de conjugaison.

### **1.6.6 Synopsis**

L'introduction générale de cette thèse touche à des thèmes universels qui vont être explicités dans chaque chapitre. De même, les méthodologies décrites dans la section précédente représentent des éléments communs qui réapparaîtront dans les chapitres suivants. Les chapitres 2, 3 et 4 sont représentés dans leur édition finale de publication. Dans l'ensemble, nous espérons susciter une meilleure appréciation de la grande complexité que pose l'étude des T4SSs et leurs inhibitions en nous focalisant sur les protéines VirB8.

## **Chapitre 2 : Article 1**

Structural analysis and inhibition of TraE from the pKM101 type IV secretion system

**Bastien Casu<sup>1</sup>, Jonathan Smart<sup>1</sup>, Mark A. Hancock<sup>2</sup>, Mark Smith<sup>1</sup>, Jurgen Sygusch<sup>1</sup>, and Christian Baron<sup>1</sup>**

From the Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada<sup>1</sup>, and the SPR-MS Facility, Faculty of Medicine, McGill University, Montréal, QC, Canada<sup>2</sup>

Running title: *Dimerization and inhibition of TraE*

To whom correspondence should be addressed: Prof. Christian Baron, Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Pavillon Roger-Gaudry, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montréal, QC H3C 3J7, Canada, Telephone : (514) 343-6300 ; FAX : (514) 343-2210; E-mail : christian.baron@umontreal.ca

**Keywords:** plasmid, conjugation, type IV secretion system, membrane protein, protein-protein interaction

**Cet article a été publié dans:** The Journal of biological chemistry (JBC 2016, 291(45):23817-23829)

### **Contribution des auteurs:**

B.C : Participation au design de l'expérience, préparation des échantillons, interprétation des résultats et rédaction de l'article, J.S : Participation au design de l'expérience et révision de l'article  
M.H : Participation au design de l'expérience, réalisation des expériences de résonance plasmonique de surface et révision de l'article, M.S : Participation au design de l'expérience, réalisation des expériences de test d'expression de la protéine TraE et révision de l'article, J.S : Participation au design de l'expérience et révision de l'article, C.B: Élaboration et coordination de l'étude, et rédaction de l'article.

## ABSTRACT

Gram-negative bacteria use type IV secretion systems for a variety of macromolecular transport processes that include the exchange of genetic material. The pKM101 plasmid encodes a type IV secretion system (T4SS) similar to the well-studied model systems from *Agrobacterium tumefaciens* and *Brucella suis*. Here, we studied the structure and function of TraE, a homolog of VirB8 that is an essential component of all T4SS. Analysis by X-ray crystallography revealed a structure that is similar to other VirB8 homologs, but displayed an altered dimerization interface. The dimerization interface observed in the X-ray structure was corroborated using the bacterial two-hybrid assay, biochemical characterization of the purified protein and *in vivo* complementation, demonstrating that there are different modes of dimerization among VirB8 homologs. Analysis of interactions using the bacterial two-hybrid and crosslinking assays showed that TraE and its homologs from *Agrobacterium*, *Brucella* and *Helicobacter pylori* form heterodimers. They also interact with heterologous VirB10 proteins, indicating a significant degree of plasticity in the protein-protein interactions of VirB8-like proteins. To further assess common features of VirB8-like proteins, we tested a series of small-molecules

## *Dimerization and inhibition of TraE*

derived from inhibitors of *Brucella* VirB8 dimerization. These molecules bound to TraE *in vitro*, docking predicted that they bind to a structurally conserved surface groove of the protein and some of them inhibited pKM101 plasmid transfer. VirB8-like proteins thus share functionally important sites and these can be exploited for the design of specific inhibitors of type IV secretion system function.

---

Plasmids of the IncN incompatibility group have a narrow host range mediating horizontal gene transfer among Enterobacteria. They code for replication, drug and metal resistance, and entry exclusion proteins. They also contribute to the transfer of clinically important antibiotic resistance genes, e.g. encoding carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* (Kayama et al., 2015). The clinical isolate R46 (Mortelmans & Stocker, 1979) as well as its deletion variant pKM101 are the most studied model systems (Winans & Walker, 1985). They encode genes sensitizing bacteria to radiation damage and pKM101 gained notoriety since it was present in the Ames *Salmonella* strain used for the detection of mutagens (McCann, Springar, Kobori, & Ames, 1975). The transfer of antibiotic resistance genes by plasmid conjugation increasingly leads to problems in health care and it is therefore important to better

understand and to devise approaches to inhibit this process (Kumarasamy et al., 2010; Liu et al., 2015).

Analysis of the sequence of the genes encoding the pKM101 conjugation machinery revealed striking similarities to type IV secretion systems (T4SS) that transfer virulence factors from mammalian and plant pathogens to eukaryotic host cells (Pohlman, Genetti, & Winans, 1994; Winans, Burns, & Christie, 1996). The pKM101 conjugation machinery contains homologs to all the 12 components of the most studied model *Agrobacterium tumefaciens*; 11 of these proteins (TraL to TraG) are encoded in an operon similar to the VirB1-11 operon in *Agrobacterium*. Similar to other secretion systems of this class, pKM101 encodes homologs of putative ATPases (VirB4, VirB11 and VirD4), of core secretion system components (VirB1, VirB3, VirB6, VirB7, VirB8, VirB9 and VirB10) and of pilus components (VirB2 and VirB5). Whereas the biochemistry and the functions of individual T4SS components of the *Agrobacterium* and *Brucella* systems have been studied more thoroughly, structure biological approaches using co-expression of a subset of pKM101 core components (TraN, TraE, TraF and TraO, homologs of VirB7 to VirB10) led to the first high-resolution structure of the T4SS core complex using cryo-electron microscopy and

X-ray crystallography (Chandran et al., 2009; Fronzes, Schafer, et al., 2009; Trokter, Felisberto-Rodrigues, Christie, & Waksman, 2014b). Surprisingly, co-expression of the VirB8 homolog TraE was not necessary for the formation of the TraN-TraF-TraO complex under these conditions, but VirB8 homologs are essential for the function of T4SSs and they are thought to be assembly factors (Baron, 2006a).

VirB8-homologs are small periplasmic proteins of about 25 kDa comprising a short N-terminal cytoplasmic region, one transmembrane helix and a periplasmic region of 18 kDa. They are essential for all T4SS in which they have been studied and VirB8 was shown to be present in a helical arrangement around the cell in *A. tumefaciens* (Aguilar, Cameron, Zupan, & Zambryski, 2011; Aguilar, Zupan, Cameron, & Zambryski, 2010). The results of extensive genetic and biochemical analyses suggest that VirB8-like proteins are assembly factors that undergo a series of mostly transient interactions with other T4SS components (Berger & Christie, 1994a; A. Das & Y.-H. Xie, 2000; Kumar & Das, 2001b; Sivanesan & Baron, 2011a; Sivanesan, Hancock, Villamil Giraldo, & Baron, 2010; Villamil Giraldo et al., 2012; Yuan, Carle, Gao, Sivanesan, Aly, Höppner, et al., 2005). The X-ray structures of the periplasmic domains of VirB8 homologs from *A. tumefaciens* (VirB8a)

and from *B. suis* (VirB8b) were solved and both proteins were predicted to form dimers of similar geometry via an  $\alpha$ -helical region (S. Bailey, D. Ward, R. Middleton, J. G. Grossmann, & P. Zambryski, 2006a; Terradot et al., 2005a). Interestingly, analysis of the TraM protein from the plasmid pIP501 conjugation system from Gram-positive Enterococci and of the TcpC protein from *Clostridium perfringens* showed that despite the absence of apparent sequence similarity these proteins had a very similar fold (Goessweiner-Mohr et al., 2013; Porter et al., 2012). However, these proteins form trimers suggesting that VirB8-like proteins may be able to interact via different interfaces of their core structure. This notion is consistent with biochemical analysis suggesting that in line with its predicted role as an assembly factor VirB8 undergoes relatively weak protein-protein interactions with other T4SS components (Paschos, Patey, Sivanesan, Gao, Bayliss, Waksman, O'Callaghan, et al., 2006; Sivanesan et al., 2010; Villamil Giraldo et al., 2012). Comparative analysis of different VirB8 homologs from *Bartonella* species showed homo-dimerization and a limited degree of heterodimer formation, suggesting a mechanistic solution preventing non-functional interactions of homologs that are simultaneously expressed in one organism (Gillespie, Phan, Scheib, Subramanian,

Edwards, Lehman, Piitulainen, Sayeedur Rahman, et al., 2015). VirB8b was shown to interact with the close homolog TraJ from the pSB102 conjugation system, adding further evidence to the notion that VirB8 interactions are likely transient and may even be promiscuous (Bourg, Sube, O'Callaghan, & Patey, 2009; G. Patey, Z. Qi, G. Bourg, C. Baron, & D. O'Callaghan, 2006b).

Here, we have extended the analysis of interactions between VirB8 homologs. We show that even distant homologs from different species interact and that this promiscuity extends to interactions with VirB10 homologs. Structural and biochemical analysis of TraE reveals a divergence as to the mode of dimerization compared to previously characterized homologs, underlining the cognate plasticity of this protein. Based on structural information and on previous work showing that VirB8b is a target for small-molecule inhibitors (Paschos et al., 2011; Smith et al., 2012), we analyzed small molecules that bind to TraE and inhibit the conjugation of pKM101. We conclude that despite their divergent sequences and the transient nature of their interactions, VirB8-like proteins have common features that can be exploited for structure-based design of T4SS inhibitors.

## RESULTS

*The bacterial two-hybrid assay shows heterologous interactions between distantly related VirB8 homologs* - To assess the capacity of VirB8 proteins to interact with homologs from other T4SS, we expressed full-length VirB8a, VirB8b, TraE and the VirB8 homolog CagV from *Helicobacter pylori* as fusions to the T25 and the T18 domains of *Bordetella* CyaA cytotoxin. The interactions were analyzed in the bacterial two-hybrid (BTH) assay using *E. coli cyaA* deletion strain BTH101 and  $\beta$ -galactosidase activity as readout fused to the cytoplasmic N-terminus of the full-length proteins. The results show that all these proteins homodimerize and that TraE also forms heterodimers with VirB8a, VirB8b and CagV (Fig. 1A). Whereas the relative strength of the heterologous interactions was somewhat lower than that of TraE homodimerization, these results were nevertheless surprising since the sequence identities between the different homologs are low (35% to 14% as compared to TraE), the CagV protein from *H. pylori* being the most distantly related. *In vitro* crosslinking between the purified periplasmic domains of TraE, VirB8b and CagV provided further evidence that these proteins have the capacity to form homomultimers as well as heteromultimers (Fig. 2). To test whether VirB8 proteins also interact in a heterologous fashion with other

*Dimerization and inhibition of TraE* essential T4SS components from other organisms, we tested binding to VirB10 (Sivanesan et al., 2010). Using this assay TraE was shown to bind to VirB10 homologs from *B. suis* and from *A. tumefaciens*, further underlining its promiscuous binding capacity (Fig. 1B).

*Surface plasmon resonance analysis of interactions between CagV, TraE, and VirB8b* - As alternative approach to measure interactions between homologs CagV, TraE, and VirB8b ligands were amine-coupled to individual flow cells of SPR chips and then each was flowed overtop in solution (analyte). Single-cycle kinetic analyses (i.e. titration of low to high protein concentration without regeneration until the end of the series) showed that there was no non-specific binding of bovine serum albumin (baseline control) to any of the reference or protein-immobilized surfaces (Fig. 3). When tested against CagV-coupled surfaces, TraE bound in a significant, dose-dependent manner with rapid association and dissociation kinetics (Fig. 3A). Similarly, the responses for CagV and TraE binding to TraE-coupled surfaces were significant (Fig. 3B); lower yet increasing signal responses with VirB8b were also detected. When tested in the reverse orientation, TraE bound to VirB8b-coupled surfaces in a dose-dependent manner and VirB8b also interacted with itself (Fig. 3C). When analyzed according to a “steady-state

affinity” model, the orthogonal SPR data provides direct evidence for CagV-TraE, TraE-TraE, and TraE-VirB8b interactions in the same low micromolar affinity range (Fig. 3D).

*Structural analysis of TraE reveals an altered mode of dimerization* - To gain high-resolution insights into the molecular basis of the heterologous interactions, the X-ray structure of the periplasmic domain of TraE was determined by X-ray crystallography. Crystals of purified TraE diffracted up to 2.4 Å resolution (Table 1) and the structure was solved by molecular replacement using the homolog VirB8a that shares 25% amino acid identity as a search model. Structural comparison of TraE with its closest homologs VirB8a and VirB8b showed that the overall fold, comprising 5  $\alpha$ -helices on one side of the protein and 4  $\beta$ -sheets on the opposite side, is similar. However, the orientations of the  $\alpha$ -helices 1, 4 and 5 of TraE are somewhat different from VirB8a and VirB8b; the root mean square deviation (RMSD) is 0.66 Å compared to VirB8a and 1.67 Å compared to VirB8b (Fig. 4A, B and C). The most interesting difference is that the dimer interface is clearly altered from that of VirB8a and VirB8b regarding the participating residues (Fig. 4D) and in its overall geometry (Fig. 5). The dimer interface buries a total of 844 Å<sup>2</sup> for VirB8a and 925 Å<sup>2</sup> for Virb8b whereas the area of the TraE dimer interface is only 577 Å<sup>2</sup>. The

second and third contact regions described in VirB8a and VirB8b structures are not present in the TraE dimer and the two monomers are tilted in comparison to the more symmetrical arrangement of its homologs (Fig. 5). Despite these differences, *in silico* docking suggests that heterodimer formation of TraE with VirB8a and VirB8b is possible (Fig. 6), which is consistent with the results from the BTH assay (Fig. 1).

*The predicted dimerization site is important for VirB8 interactions in vitro and for its functionality in vivo* - To assess whether the atypical dimerization site predicted in the X-ray structure is biologically significant, variants of residues E97, Q105, K168 and Y214, which form hydrogen bonds across the dimer interface were constructed. Single amino acid changes such as Y214A or K168A had little or no effect on dimerization using the BTH assay. In contrast, dimerization of the variants E97A, Q105A and of those carrying double changes E97A/Q105A and K168A/Y214A was strongly reduced (Fig. 7A). Similarly, when variants of the periplasmic domain of TraE carrying single and double amino acid changes were analyzed by gel filtration, we found that the concentration-dependent dimerization observed in the wild type protein was significantly diminished if not abolished in both single and double variants (Fig. 7B).



Finally, to assess functionality in the natural biological context, we tested the ability of TraE and its variants to complement conjugation of a non-polar pKM101::traE transposon insertion mutant. This analysis revealed that conjugation was markedly reduced or not detectable in case of all single and double variants (Fig. 7C), despite the fact that the proteins were stably expressed. Taken together, these results support the biological relevance of the dimerization site predicted by X-ray crystallography. We next analyzed whether the structural information can be exploited for the design of inhibitors of TraE-dependent plasmid conjugation.

*Docking of VirB8b inhibitors and of novel derivatives to TraE* - A common feature of VirB8 homologs is the presence of a surface groove located between the  $\alpha$ -helical and the  $\beta$ -sheet faces of the protein and it was hypothesized that this groove has a functional role in mediating protein interactions by VirB8 homologs (Paschos, Patey, Sivanesan, Gao, Bayliss, Waksman, O'Callaghan, et al., 2006; Terradot et al., 2005a). We therefore explored whether putative binding by small molecules to this site in turn inhibits bacterial conjugation. Previous docking results showed that the most potent compounds that bound to this site in VirB8b were the inhibitors B8I-1, B8I-2 and B8I-3 (31). These and other small molecules also tested (Smith et al., 2012) were shown to

bind the equivalent surface groove of TraE (Fig. 8). To further probe this binding site, we also synthesized seven novel analogues of compound B8I-2 (Fig. 9), which from our previous work inhibited *Brucella* virulence (Smith et al., 2012). Analogues of B8I-2 were designed to probe for enhanced interaction with the binding site and *in silico* docking predicted that all these compounds would bind to TraE (Fig. 8C). We therefore tested their impact on TraE interactions *in vitro* and *in vivo*.

*Small molecules bind to TraE and inhibit pKM101 conjugation* - To measure small molecule binding, we established an *in vitro* assay based on the quenching of tryptophan fluorescence following addition of inhibitors to the purified periplasmic domain of TraE. Using this assay, we determined  $K_D$  values from low to high  $\mu\text{M}$  range for the different molecules (Tab. 2). The lowest  $K_D$  value of 2.7  $\mu\text{M}$  was observed for the B8I-2 analogue BAR-072 (Fig. 10A). Using chemical crosslinking, we showed that the purified periplasmic domain of TraE forms dimers and higher molecular mass multimers, which is consistent with the results from the BTH assay (Fig. 10B). The addition of BAR-072 attenuated crosslinker-dependent formation of multimers, suggesting that binding by this analogue interferes with dimerization (Fig. 10B and 10C). Finally, we assessed whether the TraE-binding small molecules have an effect

on plasmid conjugation. Conjugation experiments were conducted between a pKM101-carrying donor (FM433) and a plasmid-free recipient (WL400) in the presence of the small molecules at 50  $\mu$ M concentration. No effects on bacterial growth were observed at this concentration except for molecule B8I-3 that was not further pursued (data not shown). Analysis of plasmid transfer frequency showed that none of the original VirB8b inhibitors had a significant impact, but that four of the tested molecules significantly reduced pKM101 transfer (B8I-16, BAR-072, BAR-073 and UM-024) (Fig. 11A). The strongest effect (10-fold reduction) was observed for molecule BAR-072, correlating with the lowest  $K_D$  value observed by fluorescence quenching. None of the molecules that reduced pKM101 transfer impacted on the conjugation of the unrelated control plasmid RP4, suggesting that their effects are specific for pKM101 and not due to a non-specific effect on bacterial metabolism or viability (Fig. 11B).

## DISCUSSION

VirB8 homologs are essential components of all T4SS in which they have been studied. They are believed to undergo a series of transient protein-protein interactions contributing to T4SS assembly (Berger & Christie, 1994a; A. Das & Y.-H. Xie, 2000;

Kumar & Das, 2001b; Sivanesan & Baron, 2011a; Sivanesan et al., 2010; Villamil Giraldo et al., 2012; Yuan, Carle, Gao, Sivanesan, Aly, Höppner, et al., 2005). Although the sequence identities between VirB8 homologs are in the range of 20 to 40% the overall protein fold is well conserved (Bailey et al., 2006a; Gillespie, Phan, Scheib, Subramanian, Edwards, Lehman, Piitulainen, Sayeedur Rahman, et al., 2015; Terradot et al., 2005a), and this was confirmed here by determination of the TraE structure. In some cases, due to high divergence of the primary sequence, VirB8 homologs were found only upon their structural analysis (Goessweiner-Mohr et al., 2013; Kuroda et al., 2015; Porter et al., 2012), suggesting strong evolutionary pressure to conserve protein overall fold with functional specificity emerging at a later date. These data are consistent with the early hypothesis that VirB8 is an assembly factor that was based on its similarity to a nuclear transfer factor (NTF-2) (Terradot et al., 2005a). X-ray crystallographic approaches have shown that most studied VirB8 homologs form dimers. However, the more distantly related homologs from Gram-positive bacteria such as *Clostridium* TcpC and *Enterococcus* TraM crystallized as trimers, suggesting significant structural plasticity regarding VirB8-like protein multimerization. Whereas TraE crystallized as a dimer, the spatial arrangement of the two subunits was

clearly distinct from that of its closest homologs VirB8a and VirB8b. The biological significance of this dimerization site was verified by the analysis of variants at the interaction interface, suggesting that different spatial orientations are biologically significant even in the case of closely related VirB8 homologs (Paschos, Patey, Sivanesan, Gao, Bayliss, Waksman, O'Callaghan, et al., 2006; Sivanesan & Baron, 2011a).

The fact that the VirB8 fold is so highly conserved underlines the importance of this protein as a T4SS assembly factor. Several studies have shown that VirB8 undergoes multiple interactions (A. Das & Y.-H. Xie, 2000; R. B. Kumar, Y.-H. Xie, & A. Das, 2000a; Paschos, Patey, Sivanesan, Gao, Bayliss, Waksman, O'Callaghan, et al., 2006; Sivanesan et al., 2010; Villamil Giraldo et al., 2012; Yuan, Carle, Gao, Sivanesan, Aly, Höppner, et al., 2005), but until now only limited data was available on the molecular basis of these interactions. Considering that the periplasmic domain is relatively small (18 kDa) it is unlikely that VirB8 interactions are more than transient, which is consistent with the measured strength of interactions in the high nanomolar to micromolar range (Sivanesan et al., 2010; Villamil Giraldo et al., 2012). Nevertheless, specificity is important for ordered T4SS assembly and a recent study on VirB8 homologue proteins from *Bartonella*

and *Rickettsia* species suggests that structural barriers as well as differential expression prevent non-productive interactions between multiple VirB8 paralogs in these organisms (Gillespie, Phan, Scheib, Subramanian, Edwards, Lehman, Piitulainen, Sayeedur Rahman, et al., 2015). Whereas non-productive interactions are not pertinent in case of VirB8 homologs from different bacteria, the high degree of interactions between VirB8 homologs from *Agrobacterium*, *Brucella*, pKM101 and *H. pylori* observed in the BTH assay as well as *in vitro* using crosslinking as well as SPR analysis was unexpected. In addition to homodimer formation, we observed heterologous binding to VirB10 homologs indicating a high degree of plasticity of VirB8 interactions arising from the conserved protein fold. It would be of interest to test interactions with VirB8 homologs from Gram-positive bacteria in future (TcpC, TraM) to determine whether the plasticity of interactions extends to trimer-forming homologs. Binding between VirB8 homologs in the BTH assay does not necessarily imply functional complementation in the natural biological context in which other additional protein-protein interactions are likely to be important. For example, despite the fact that TraJ from plasmid pSB201 shares 50% sequence identity and bound *Brucella* VirB8 in the BTH assay, complementation with the full-length protein was not possible (Bourg et al.,

2009; Patey et al., 2006b). Similarly, we found that *Brucella* VirB8 does not complement *virB8* deletions in *A. tumefaciens* (unpublished results). The periplasmic domain from TraJ did complement to a limited extent when it was fused to the N-terminal domain of VirB8b, but expression of TraJ or of a TraJ-VirB8b fusion protein inhibited virulence. This is probably due to strong binding with VirB8b, suggesting that both the dimer as well as the free monomer forms are functionally important.

The biological role of the prominent hydrophobic surface groove between the  $\beta$ -sheet face of the protein and the  $\alpha$ -helices present at the dimerization site has been the subject of debate and it was hypothesized that it may be a protein-protein interaction site (Terradot et al., 2005a). Currently, there is no evidence for this notion, but we subsequently discovered that this surface groove is the binding site for small-molecule inhibitors of VirB8 dimerization (Paschos et al., 2011; Smith et al., 2012). At first this result was counterintuitive as the dimer interface is on the side opposite to the binding site. However, substituting amino acids at the inhibitor binding site reduced the potency of the inhibitors as well as dimerization, suggesting that conformational changes of this surface groove may be linked to dimerization. NMR analysis of VirB8b showed significant conformational changes between the

monomeric and the dimeric state that are consistent with this notion (Sharifahmadian, Omichinski and Baron; unpublished). Here, we probed TraE with small molecules that had been shown to inhibit VirB8b dimerization (Smith et al., 2012) as well as derivatives that were synthesized to improve the interaction potency to binding site residues. Using a fluorescence quenching assay, we showed that the VirB8b inhibitors and newly synthesized compounds bound to TraE with affinities in the micromolar range despite apparent differences of the binding sites in the two proteins. Molecular docking suggested that almost all the molecules bind to the surface groove between the  $\beta$ -sheet face and the  $\alpha$ -helices of the protein that is equivalent to that in VirB8b. We determined a wide variety of binding affinities and the molecule BAR-072 had the lowest  $K_D$  value of 2.7  $\mu$ M. Docking predicted that BAR-072 binds to four amino acids in the inhibitor-binding surface groove of TraE, whereas B8I-2 and other molecules only bind up to three amino acids, which could explain the difference in  $K_D$  values (Fig. 8B). Interestingly, BAR-072 had a significant effect on T4SS function leading to a 10-fold reduction of pKM101 transfer between bacteria. Further, molecule UM-024 that was weakly active against VirB8b also significantly inhibited pKM101 conjugation, while the most potent VirB8b inhibitor B8I-2 had no effect on

pKM101 conjugation suggesting that differences in the inhibitor binding sites can be exploited for the design of specific molecules. The low degree of correlation between the  $K_D$  values and the effects on pKM101 transfer (except for BAR-072) suggest the presence of an additional binding site or variations in the ability of the molecules to cross the cell envelope. Nevertheless, the observed attenuation of plasmid conjugation suggests for the first time that the inhibition of plasmid transfer is possible by targeting a specific component of a secretion/conjugation system. Our results also suggest that the surface groove targeted by VirB8b inhibitors may be suitable as a target for TraE inhibitors, pointing to a new paradigm enabling discovery of inhibitors targeting VirB8-like proteins in a wide variety of pathogens.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Strains and plasmids* - The strains and plasmids used are listed in supplementary table 3. *Escherichia coli* strains XL-1 Blue or DH5 $\alpha$  were used as hosts for cloning and mutagenesis. Strain BL21star ( $\lambda$ DE3) was used for overexpression of TraE, VirB8a, VirB8b and CagV; strain BTH101 was used for BTH assays.

*Quantitation of conjugative DNA transfer* - *E. coli* strains FM433 pKM101

(donor, ampicillin-resistant), FM433 pRP4 (donor, ampicillin-resistant) and WL400 (recipient, chloramphenicol-resistant) were grown in liquid LB medium at 37°C (with 100  $\mu$ g/ml for the pKM101- and RP4-carrying strains) to an OD<sub>600</sub> nm of 0.5 to 1, sedimented by centrifugation, and resuspended in an appropriate volume of LB medium without antibiotics. Equal amounts of donor and recipient strain (1  $\mu$ l of each) were mixed on prewarmed LB agar and incubated for 2 h at 37°C to enable conjugation, and the cells were then washed from the plate with 100  $\mu$ l of liquid LB. To quantify conjugative transfer, dilutions of the conjugation mixture were plated on LB agar plates containing appropriate antibiotics for selection of pKM101-containing recipient strain WL400 (100  $\mu$ g/ml ampicillin, 34  $\mu$ g/ml chloramphenicol). To determine complementation with TraE variants, strain FM433 carrying a non-polar transposon insertion in the *traE* gene (pKM101*traE*1228::Tn5 (Winans & Walker, 1985)) was transformed with complementation vector pTrc200 (negative control), pTrc200TraE (positive control), or with pTrc200 expressing TraE variants; complementation experiments were carried out as above. For analysis of the inhibition of conjugation with small molecules, the cells were cultivated on agar and in liquid media in the presence of 50  $\mu$ M of the small molecules

in the presence of 2.5% DMSO. The presence of DMSO and of the small molecules (with exception of B8I-3) did not negatively impact bacterial growth.

*DNA isolation and manipulation* - Plasmid DNA was isolated using Qiagen Miniprep kits (Qiagen, UK). Standard techniques were employed for the cloning, transformation, preparation and restriction analysis of plasmid DNA from *E. coli* (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989).

*Bacterial two-hybrid assay (BTH)* - Interactions between full-length TraE, VirB8a, VirB8b, CagV, VirB10a, VirB10b and TraE variants were assessed *in vivo* using the BTH system as described (Villamil Giraldo et al., 2015). The genes encoding VirB8 homologs, TraE variants and VirB10 homologs proteins were fused to the DNA sequences encoding the T18 and T25 fragments of the catalytic domain of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase (AC), and they were co-expressed in BTH101 AC (*cya*) deficient cells. The interactions were detected using functional complementation leading to cAMP and as a consequence to  $\beta$ -galactosidase production that was quantified using ortho-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside as the substrate.

*Protein overexpression and purification* - For protein overproduction, *E.*

*Dimerization and inhibition of TraE coli* strain BL21star ( $\lambda$ DE3) carrying expression plasmids was grown under aerobic conditions at 37°C in LB to exponential phase (OD<sub>600</sub> of 0.4–0.8), followed by the addition of 0.5 mM IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) for TraE, TraE variants, VirB8b and 1 mM IPTG for CagV to induce gene expression. Cultivation under aerobic conditions proceeded at 30°C for 4 h after induction for TraE and its variants, or at 25°C for 16 h after induction for CagV and VirB8b. For purification, bacterial cells were harvested, resuspended in binding buffer (50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 40 mM imidazole, pH 7.4) and lysed using a One Shot cell disrupter (Constant Systems Inc.) at 27 kPsi. Lysates were subsequently centrifuged twice at 15,000 rpm at 4°C, filtered through a 0.45  $\mu$ m membrane to remove cell debris, loaded onto a HisTrap Ni-chelate column (GE Healthcare) and eluted using a linear 50 ml gradient of 40–500 mM imidazole. The proteins were then desalted into TEV buffer (25 mM sodium phosphate, 125 mM NaCl, 5 mM DTT, pH 7.4) and subjected to cleavage of the N-terminal 6x-His-tag using 6xHis-tagged TEV protease in a ratio of 1:70 (TEV:protein) for 24 h at 20°C. Following cleavage, the solution was diluted ten times, centrifuged once at 13,000 rpm at 4°C and filtered through a 0.45  $\mu$ m membrane to remove precipitate, passed over a HisTrap Ni-chelate column (GE Healthcare) to bind the

tagged TEV protease, and the flow-through containing cleaved proteins was collected. The purified proteins were then desalted by PD-10 columns (GE Healthcare) into 20 mM HEPES, pH 7.4, 50 mM NaCl for TraE; 50 mM MES, pH 6.5, 100 mM NaCl for CagV; 50 mM Tris, pH 7.4, 50 mM NaCl for VirB8b and stored at 4°C. For crystallography, TraE was further purified by size exclusion chromatography using a Superdex 75 column (GE Healthcare). TraE protein concentrations were determined using the molar extinction coefficients at 280 nm of 27,390 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (with 6x-His-tag) and of 25,900 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (without 6xHis-tag). VirB8b protein concentrations were determined using the molar extinction coefficients at 280 nm of 34,380 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (with 6x-His-tag) and of 32,890 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (without 6xHis-tag). CagV protein concentrations were determined using the Bradford assay.

*Crystallization of TraE and data collection* - The TraE buffer was changed to 20 mM HEPES, 50 mM NaCl (pH 7.4) and the protein (15 mg/ml) was crystallized in 16% (w/v) PEG 10,000, 50 mM Bis-Tris (pH 5.5), 100 mM ammonium acetate. The crystals were cryoprotected in 16% (w/v) PEG 10,000, 50 mM Bis-Tris (pH 5.5), 100 mM ammonium acetate and 20% ethylene glycol. The crystals were flash frozen in liquid nitrogen and the data were collected at beamline X25 of the National Synchrotron Light Source at Brookhaven

#### *Dimerization and inhibition of TraE*

National Laboratory. The intensity data was processed using the HKL2000 program.

#### *Structure determination of TraE*

Structures were solved by molecular replacement using the structure of VirB8 from *A. tumefaciens* as reference model (PDB # 2CC3)(Bailey et al., 2006a). Refinement was performed using Phenix software suite of program to the highest possible resolution (Adams et al., 2002) made possible by collecting diffraction data in 180° sweeps to take full advantage of the space group symmetry redundancy (C222<sub>1</sub>) in order to maximize signal to noise ratio. Electron density maps were calculated to the resolution indicated in supplementary table 1 to ensure at least ~ 90% completeness in the highest resolution shell with an I/σ(I) > 2. Final model statistics, calculated with Phenix, molprobity and PROCHECK, are shown in supplementary table 1. The atomic coordinates and structure factors for TraE have been deposited at the Protein Data Bank (PDB #5I97). The model of the final structure have Rcryst (Rfree) value of 0.237 (0.275). All figures were prepared using the program PyMOL.

#### *Large-zone gel filtration*

*chromatography* - The molecular masses of the purified periplasmic domain of TraE and of its variants were determined by gel filtration using large-zone elution (Valdes & Ackers, 1979).

To this effect, 200  $\mu\text{L}$  aliquots with protein concentrations ranging from 12 to 240  $\mu\text{M}$  were applied to a Superdex 75 column (GE Healthcare) in 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.4 at 4°C. The void volume of the column was determined with Blue Dextran 2000, and the calibration curve was determined by using the Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit (GE Healthcare).

*Analysis of protein-protein interactions by crosslinking* - Chemical crosslinking with disuccinimidyl suberate (DSS, Pierce) was performed as described previously (Yuan, Carle, Gao, Sivanesan, Aly, Höppner, et al., 2005) and the formation of crosslinking products was quantified by SDS-PAGE, Western blotting and using the ImageLab Software 4.0 (Bio-Rad).

*Molecular docking analysis - In silico* docking was performed using Autodock Vina (Trott & Olson, 2010b) run through PyRx to manage the workflow and PyMol to visualize the results. The chemical structures for each ligand were retrieved from the hit2lead.com website, converted to PDB format using openbabel software, followed by processing with Autodock Tools 1.5.4 to assign Gasteiger charges, merging non-polar hydrogens and to set torsional bonds. Docking runs were performed within a 47 x 52 x 33 Å rectangle search space surrounding the binding pocket,

and output modes were ranked according to binding affinity (BA). Autodock Vina identified molecular conformations with the best fit and strongest BA (global minimums) by a stochastic algorithm exploring surfaces/pockets of the rigid macromolecule, through an iterative series of local optimizations (changing shape, bond angles, and position of the ligand), evaluating both intermolecular (hydrophobic interactions, repulsions, hydrogen bonding, etc.) and intramolecular (torsion, rotational torque) factors.

*Analysis of small molecule binding by fluorescence spectroscopy* - Changes in the intrinsic UV fluorescence emission of TraE upon binding of small molecules were recorded at 20°C with a Cary Eclipse Fluorometer (Varian) ( $\lambda_{\text{excitation}}$  295 nm,  $\lambda_{\text{emission}}$  340 nm, 5 nm excitation and emission slit widths) in 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.4. The spectra were corrected for dilution effects and the  $K_D$  values were calculated from the ligand binding fluorescence data fitted to a single site saturation curve with constant background using the Grafit 6.0 software package.

*Synthesis of small molecules* - Small molecule derivatives of B8I-2 were synthesized as described (Smith et al., 2012).



*Surface plasmon resonance* - Using label-free, real-time SPR, the interactions between CagV, TraE, and VirB8b were examined using a BIACORE 3000 system (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Upsala, Sweden; BIAcontrol v4.1 operating software). For quality control, each batch of purified protein was pre-tested on an UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF system (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) according to the manufacturer's recommendations (intact mass analysis in linear-positive mode, as well as Top-Down Sequencing (in-source decay) to verify the N-/C-terminal amino acid sequences of the intact proteins).

SPR experiments were performed on research-grade CM5 sensor chips (Biacore) at 25°C using filtered (0.2 µm) and degassed HBS-EP buffer (10 mM Hepes, pH 7.4; 150 mM NaCl; 3 mM EDTA; 0.005% (v/v) Tween-20). Immobilized protein surfaces (10 µg/mL in 10 mM sodium acetate pH 5.0 (CagV, TraE) or pH 4.0 (VirB8b)) were prepared using the Biacore Amine Coupling Kit as recommended by the manufacturer (final immobilization levels = 300-900 RU for each protein); corresponding reference surfaces were prepared in the absence of protein.

To assess binding specificity and affinity, single-cycle kinetic analyses were performed in which increasing concentrations

of BSA (negative control), CagV, TraE, and VirB8b were titrated in-tandem (0 – 25 µM; 2-fold dilution series) over reference and protein-immobilized surfaces at 25 µL/min in 'KINJECT' mode (1 minute association + 30 second dissociation). Between titration series, the surfaces were regenerated at 50 µL/min using two 30 sec pulses of solution I (HBS-EP containing 1.0 M NaCl and 0.05% (v/v) Empigen) followed by the 'EXTRACLEAN' and 'RINSE' procedures. Due to the rapid steady-state binding kinetics observed for each interaction pair, the binding responses were independent of mass transport limitations and all double-referenced data (Myszka, 1999) presented are representative of duplicate injections acquired from at least three independent trials. To predict overall equilibrium dissociation constants ( $K_D$ ) for each “ligand”, steady-state binding responses ( $R_{eq}$ ) were averaged near the end of each association phase, plotted as a function of “analyte” concentration ( $C$ ), and then subjected to non-linear regression analysis (“Steady state affinity” model; BIAevaluation v4.1 software). Complementary multi-cycle kinetic analyses (25 µL/min x 5 minute association + 5 minute dissociation) were performed in the similar manner and yielded consistent affinity constants.

**Acknowledgements:** We thank Dr. Pierre Lavallée and Benoit Jolicoeur (Université de Montréal, Department of Chemistry) for the synthesis of small molecules, Benoit Bessette for technical assistance, Dr. Durga Sivanesan for BTH constructs to measure for VirB8a and VirB10a BTH interactions and Dr. Gerhard Multhaup (McGill University, Department of Pharmacology and Therapeutics) for discussions on SPR experiments.

**Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

**Author contributions:** BC conducted and designed experiments, wrote manuscript; JS designed experiments, revised manuscript; MH conducted and designed experiments, revised manuscript; MS conducted and designed experiments, revised manuscript; JS designed experiments and revised manuscript; CB designed experiments and wrote manuscript

## FOOTNOTES

This work was supported by grants to C.B. from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR MOP-84239), to J.S. from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC), the NSERC-CREATE program on the Cellular Dynamics of Macromolecular Complexes (CDMC), the Bristol Myers Smith research Chair in Molecular Biology at Université de Montréal, the Groupe d'études des protéines membranaires (GÉPROM), the Canada Foundation for Innovation (CFI) and the Fonds de recherche du Québec-Santé (FRQ-S). The McGill SPR-MS facility thanks the CFI for infrastructure support.

The abbreviations used are: Adenylate cyclase (AC), bovine serum albumin (BSA), bacterial two hybrid (BTH) system, response units (RU), root mean square deviation (RMSD), surface plasmon resonance (SPR), type IV secretion system (T4SS).

## TABLES

TABLE 2.1. Data collection and refinement statistics.

	TraE
Wavelength (Å)	1.1
Resolution range (Å)	38.6 - 2.441 (2.529 - 2.441)
Space group	C 2 2 2 <sub>1</sub>
Unit cell parameters: a (Å), b (Å), c (Å), $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	112.049, 123.362, 109.8
Total reflections	184 794
Unique reflections	28 596 (2826)
Multiplicity	6.5 (6.0)
Completeness (%)	99.98 (99.93)
Mean I/sigma(I)	32.7 (2.3)
Wilson B-factor	46.46
R-merge	0.121
R-meas	0.132
Reflections used for R-free	2000
R-work <sup>a</sup>	0.2472 (0.3429)
R-free <sup>b</sup>	0.2801 (0.3475)
Number of non-hydrogen atoms	4,636
Macromolecules	4,569
Water	117
Protein residues	558
RMS bonds (Å)	0.004
RMS angles (°)	0.93
Ramachandran favored (%) <sup>c</sup>	99
Ramachandran allowed (%) <sup>c</sup>	1
Ramachandran outliers (%) <sup>c</sup>	0
Clashscore	4.21
Average B-factor (Å <sup>2</sup> )	38.20

All values in parentheses are given for the highest resolution shell.

<sup>a</sup>  $R_{\text{work}} = \sum_{\text{hkl}} |I_o(\text{hkl}) - |I_c(\text{hkl})|| / \sum_{\text{hkl}} |I_o(\text{hkl})|$ .

<sup>b</sup>  $R_{\text{free}} = \sum_{\text{hkl} \in T} |I_o(\text{hkl}) - |I_c(\text{hkl})|| / \sum_{\text{hkl} \in T} |I_o(\text{hkl})|$ , where T is a test data set randomly selected from the observed reflections prior to refinement. The test data set was not used throughout refinement and contained 7% of total unique reflections.

<sup>c</sup> Analyzed by Molprobit.

PDB deposition coordinates # 5I97.

**TABLE 2.2.** Binding of small molecules to TraE measured using a fluorescence quenching assay.

Tested molecule	K <sub>D</sub> (μM)*
B8I-1	11.4 ± 0.6
B8I-2	20.6 ± 1.4
B8I-3	9.9 ± 0.5
B8I-4	35.1 ± 3.1
B8I-5	30.3 ± 2.8
B8I-8	28.5 ± 2.5
B8I-16	28.8 ± 2.2
BAR-068	53.6 ± 3.9
BAR-069	27.9 ± 2.4
BAR-070	9.1 ± 0.3
BAR-071	10.0 ± 0.4
BAR-072	2.7 ± 0.1
BAR-073	7.3 ± 0.6
BAR-074	9.2 ± 0.4
UM-0125823	9.6 ± 0.2
UM-0125824	61.1 ± 5.5
UM-0125848	14.4 ± 0.5
UM-0125850	34.4 ± 1.6

\*Standard deviation derived from three replicas.

**TABLE 2.3.** Bacterial strains and plasmids.

Figure 1.	Strain	Genotype or Description	Source or Reference
	DH5α	<i>F</i> - Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) <i>U169 recA1 endA1 hsdR17</i> ( <i>rK</i> -, <i>mK</i> +) <i>phoA supE44 λ</i> - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
	XL-1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> ( <i>F'</i> <i>proAB lacIqZAM15 Tn10</i> ( <i>Tetr</i> ))	Agilent Technologies
	BL21(DE3) star	<i>F</i> - <i>ompT hsdSB</i> ( <i>rB</i> -, <i>mB</i> -) <i>gal dcm rne131</i> ( <i>DE3</i> )	Invitrogen
	BTH101	<i>F</i> - <i>cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1</i> ( <i>str</i> <sup>r</sup> ), <i>hsdR2, mcrA1, mcrB1</i>	(Karimova, Dautin, & Ladant, 2005)
	FM433	<i>Spc</i> <sup>r</sup> <i>araD139</i> Δ( <i>argF-lac</i> ) <i>U169</i>	

	<i>ptsF25 deoC1 relA1 flbB5301 rpsE13 Δ(srl-recA)306::Tn10</i> , conjugation donor	(Zinoni, Heider, & Bock, 1990)
WL400	<i>Cm<sup>r</sup>Str<sup>r</sup>araD139 Δ(argF-lac)U169, ptsF25 deoC1 relA1 flbB5301 rpsL150 ΔselD204::cat</i> , conjugation recipient	Leinfelder, W. Unpublished data.
<b>Plasmids</b>		
pHT	kan <sup>r</sup> pET24d derivative T7 expression vector with N-terminal 6xHis-tag and TEV protease cleavage site	(Smith et al., 2012)
pHTVirB8bp	kan <sup>r</sup> T7 promoter vector for the expression of 6xHis-tagged periplasmic domain of <i>B. suis</i> VirB8	(Smith et al., 2012)
pHTTraEp	kan <sup>r</sup> T7 promoter vector for the expression of 6xHis-tagged periplasmic domain of <i>pKM101</i> TraE	this work
pET21aCagVp	amp <sup>r</sup> T7 promoter vector for the expression of 6xHis-tagged periplasmic domain of <i>H. pylori</i> CagV	this work
pHTTraEp E97A	pHTTraEp modified to encode TraE with amino acid change E97A	this work
pHTTraEp Y214A	pHTTraEp modified to encode TraE with amino acid change Y214A	this work
pHTTraEp E97A-Q105A	pHTTraEp modified to encode TraE with amino acid change E97A-Q105A	this work
pUT18	pUC19 derivative including the T18 fragment (amino acids 225-399 of <i>B. pertussis</i> CyaA) N-terminal to the multiple cloning site	(Karimova et al., 2005)
pKNT25	pSU40 derivative including the T25 fragment (amino acids 1-224 of <i>B. pertussis</i> CyaA) N-terminal to the multiple cloning site	(Karimova et al., 2005)
pUT18C	pUC19 derivative including the T18 fragment (amino acids 225-399 of <i>B. pertussis</i> CyaA) C-	(Karimova et al., 2005)

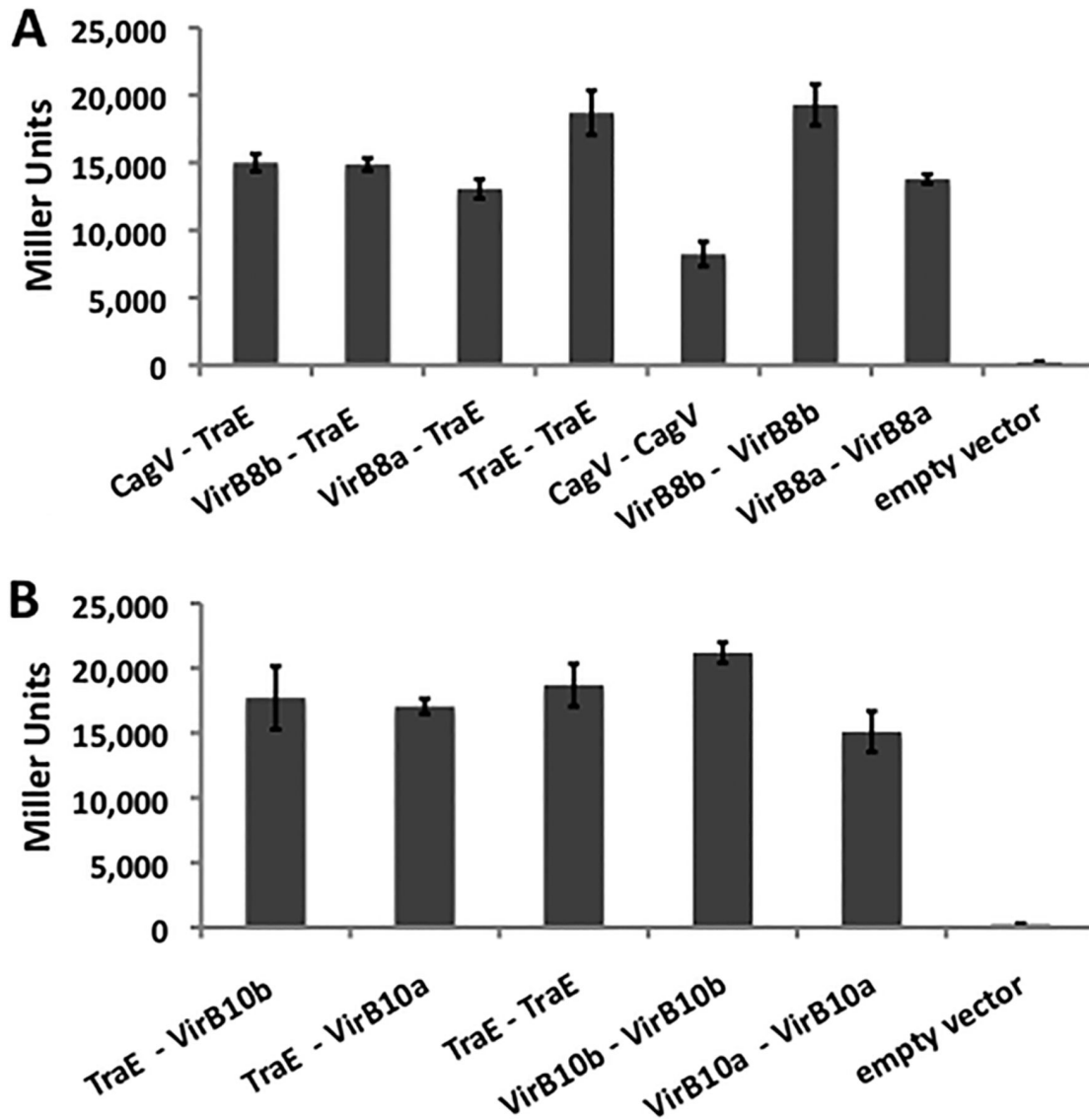
	terminal to the multiple cloning site	
pKT25	pSU40 derivative including the T25 fragment (amino acids 1-224 of <i>B. pertussis</i> CyaA) C-terminal to the multiple cloning site	(Karimova et al., 2005)
pUT18CVirB10b	amp <sup>r</sup> , pUT18C harboring 1176 bp XbaI/KpnI <i>virB10</i> fragment from <i>B. suis</i> (encoding full-length VirB10)	(Paschos et al., 2011)
pKT25VirB10b	kan <sup>r</sup> , pKT25 harboring 1176 bp XbaI/KpnI <i>virB10</i> fragment from <i>B. suis</i> (encoding full-length VirB10)	(Paschos et al., 2011)
pUT18CVirB10a	amp <sup>r</sup> , pUT18C harboring 1134 bp XbaI/KpnI <i>virB10</i> fragment from <i>A. tumefaciens</i> (encoding full-length VirB10)	this work
pKT25VirB10a	kan <sup>r</sup> , pKT25 harboring 1134 bp XbaI/KpnI <i>virB10</i> fragment from <i>A. tumefaciens</i> (encoding full-length VirB10)	this work
pUT18CVirB8b	amp <sup>r</sup> , pUT18C harboring 720 bp XbaI/KpnI <i>virB8</i> fragment from <i>B. suis</i> (encoding full-length VirB8)	(Sivanesan et al., 2010)
pKT25VirB8b	kan <sup>r</sup> , pKT25 harboring 720 bp XbaI/KpnI <i>virB8</i> fragment from <i>B. suis</i> (encoding full-length VirB8)	(Sivanesan et al., 2010)
pUT18CVirB8a	amp <sup>r</sup> , pUT18C harboring 711 bp XbaI/KpnI <i>virB8</i> fragment from <i>A. tumefaciens</i> (encoding full-length VirB8)	this work
pKT25VirB8a	kan <sup>r</sup> , pKT25 harboring 711 bp XbaI/KpnI <i>virB8</i> fragment from <i>A. tumefaciens</i> (encoding full-length VirB8)	this work
pUT18CCagV	amp <sup>r</sup> , pUT18C harboring ??? bp XbaI/KpnI <i>cagV</i> fragment from <i>H. pylori</i> (encoding full-length CagV)	this work
pKT25CagV	kan <sup>r</sup> , pKT25 harboring ??? bp XbaI/KpnI <i>cagV</i> fragment from <i>H. pylori</i> (encoding full-length	this work

	CagV)	
pUT18CTraE	amp <sup>r</sup> , pUT18C harboring 699 bp XbaI/KpnI <i>traE</i> fragment from <i>pKM101</i> (encoding full-length TraE)	this work
pKT25TraE	kan <sup>r</sup> , pKT25 harboring 699 bp XbaI/KpnI <i>traE</i> fragment from <i>pKM101</i> (encoding full-length TraE)	this work
pUT18CTraE E97A	pUT18CB8 modified to encode TraE with amino acid change E97A	this work
pUT18CTraE Q105A	pUT18CB8 modified to encode TraE with amino acid change Q105A	this work
pUT18CTraE K168A	pUT18CB8 modified to encode TraE with amino acid change K168A	this work
pUT18CTraE Y214A	pUT18CB8 modified to encode TraE with amino acid change Y214A	this work
pUT18CTraE E97A-Q105A	pUT18CB8 modified to encode TraE with amino acid change E97A-Q105A	this work
pUT18CTraE K168A-Y214A	pUT18CB8 modified to encode TraE with amino acid change K168A-Y214A	this work
pKT25TraE E97A	pKT25B8 modified to encode TraE with amino acid change E97A	this work
pKT25TraE Q105A	pKT25B8 modified to encode TraE with amino acid change Q105A	this work
pKT25TraE K168A	pKT25B8 modified to encode TraE with amino acid change K168A	this work
pKT25TraE Y214A	pKT25B8 modified to encode TraE with amino acid change Y214A	this work
pKT25TraE E97A-Q105A	pKT25B8 modified to encode TraE with amino acid change E97A-Q105A	this work
pKT25TraE K168A-Y214A	pKT25B8 modified to encode TraE with amino acid change K168A-Y214A	this work

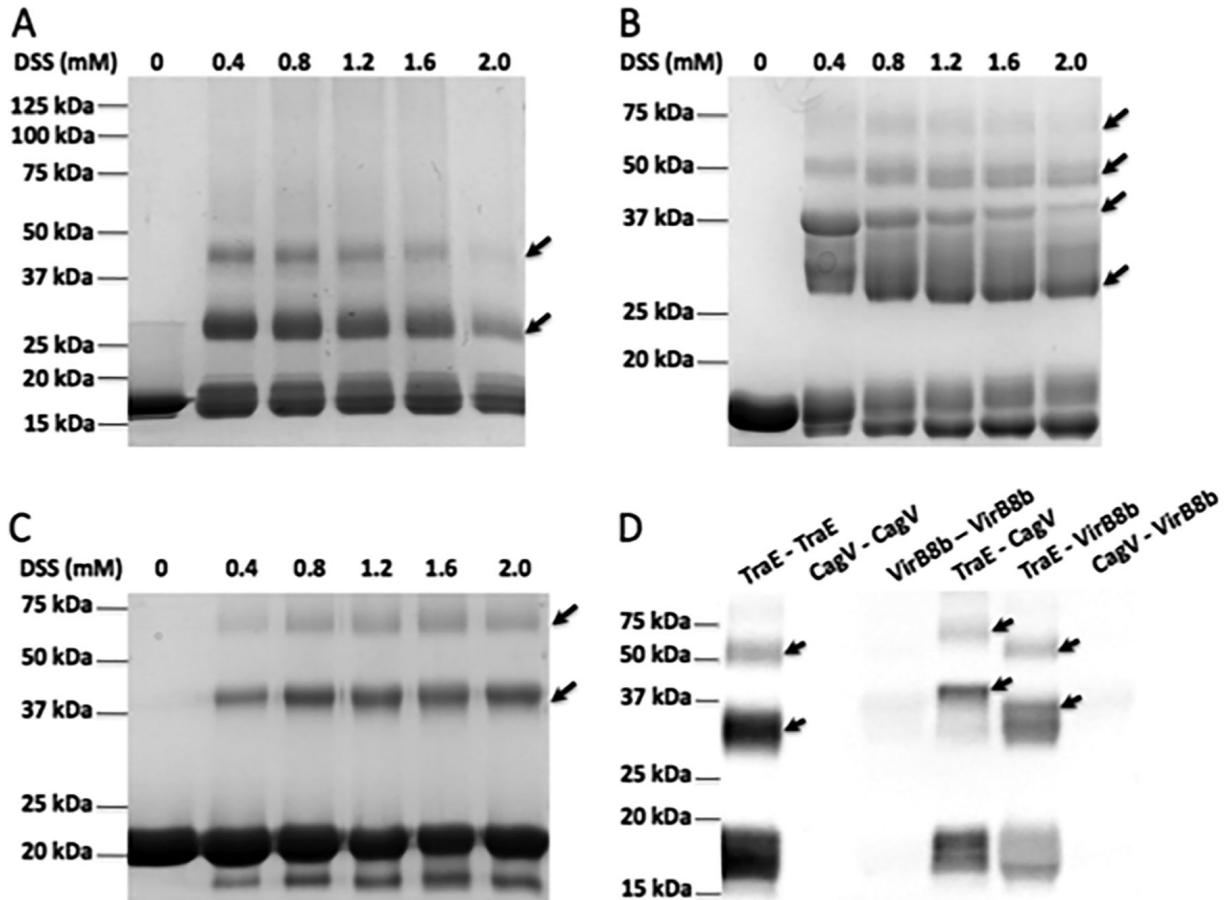
pTrc200	Str <sup>r</sup> , Spc <sup>r</sup> , pVS1 derivative, LacI <sup>q</sup> , <i>trc</i> promoter expression vector	(Schmidt-Eisenlohr, Domke, & Baron, 1999)
pTrc200TraE	pTrc200, traC PCR fragment cloned downstream of the <i>trc</i> promoter	this work
pTrc200TraE E97A	pTrc200TraE modified to encode TraE with amino acid change E97A	this work
pTrc200TraE Q105A	pTrc200TraE modified to encode TraE with amino acid change Q105A	this work
pTrc200TraE K168A	pTrc200TraE modified to encode TraE with amino acid change K168A	this work
pTrc200TraE Y214A	pTrc200TraE modified to encode TraE with amino acid change Y214A	this work
pTrc200TraE E97A-Q105A	pTrc200TraE modified to encode TraE with amino acid change E97A-Q105A	this work
pTrc200TraE K168A-Y214A	pTrc200TraE modified to encode TraE with amino acid change K168A-Y214A	this work
pKM101	Amp <sup>r</sup> , <i>mucA</i> , <i>mucB</i> , TraI-TraIII region for DNA processing, DNA transfer, and entry exclusion	(Langer & Walker, 1981)
pKM101 <i>traE</i>	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , pKM101 <i>traE</i> 1228::Tn5	(Winans & Walker, 1985)



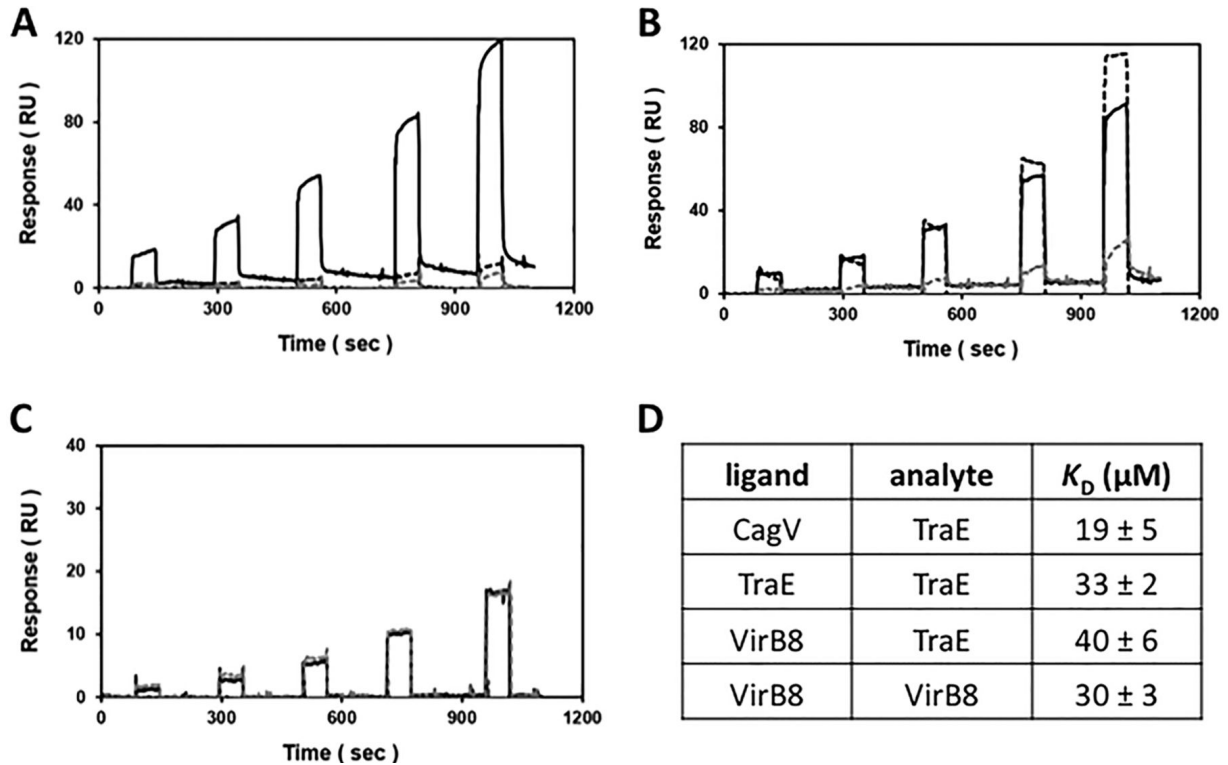
## FIGURES



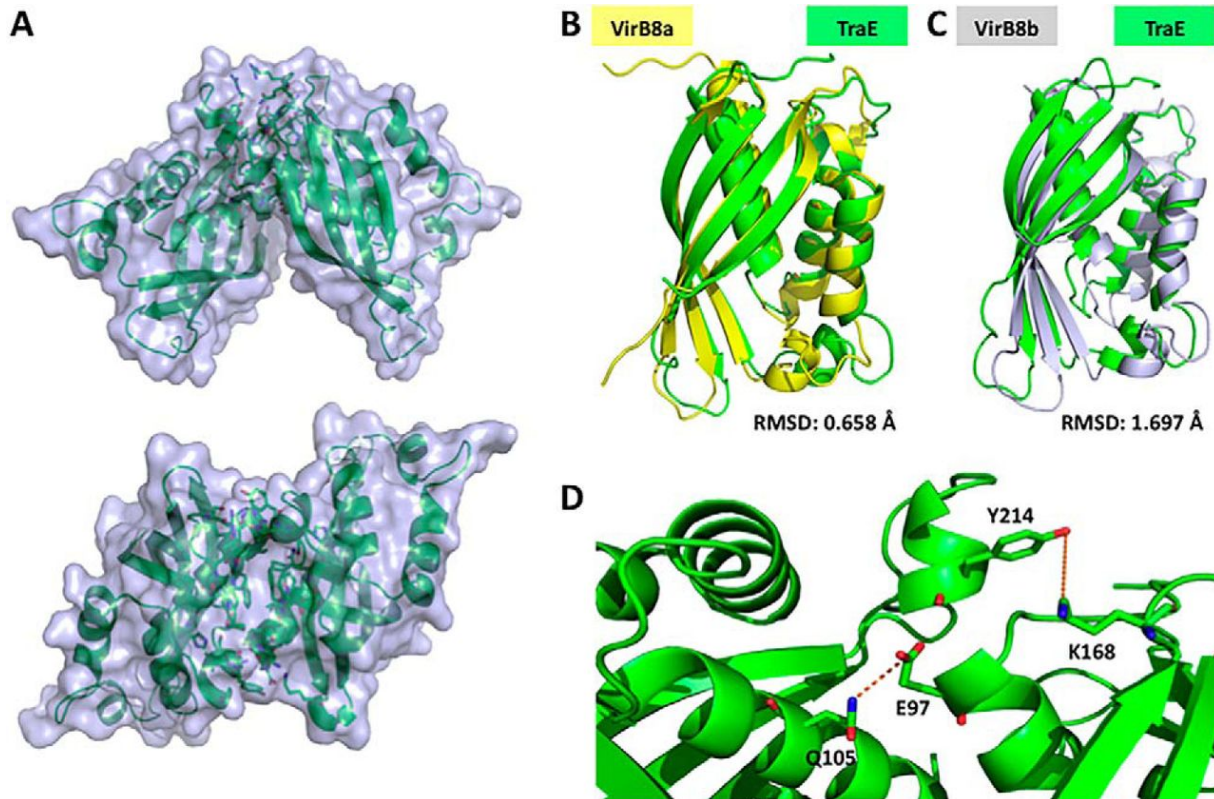
**FIGURE 2.1.** BTH analysis shows heterologous interactions between VirB8 homologs. The BTH assay was used to assess interactions between proteins fused to the adenylate cyclase domains, leading to production of  $\beta$ -galactosidase in *E. coli* reporter strains. (A) Interactions between VirB8 homologs from *Agrobacterium* (VirB8a), *Brucella* (VirB8b), *Helicobacter* (CagV) and pKM101 (TraE). (B) Interactions between VirB10 homologs from *Agrobacterium* (VirB10a), *Brucella* (VirB10b) and TraE. The homologous interactions between VirB8 proteins (A), and the homologous interactions between TraE and VirB10 proteins (B) were used as positive controls, while co-expression of the plasmid T25-TraE with an empty T18 fusion vector (A) or co-expression of the plasmid T25-VirB10b with an empty T18 fusion vector (B) were used as negative controls. Values and standard deviations were calculated from three independent experiments.



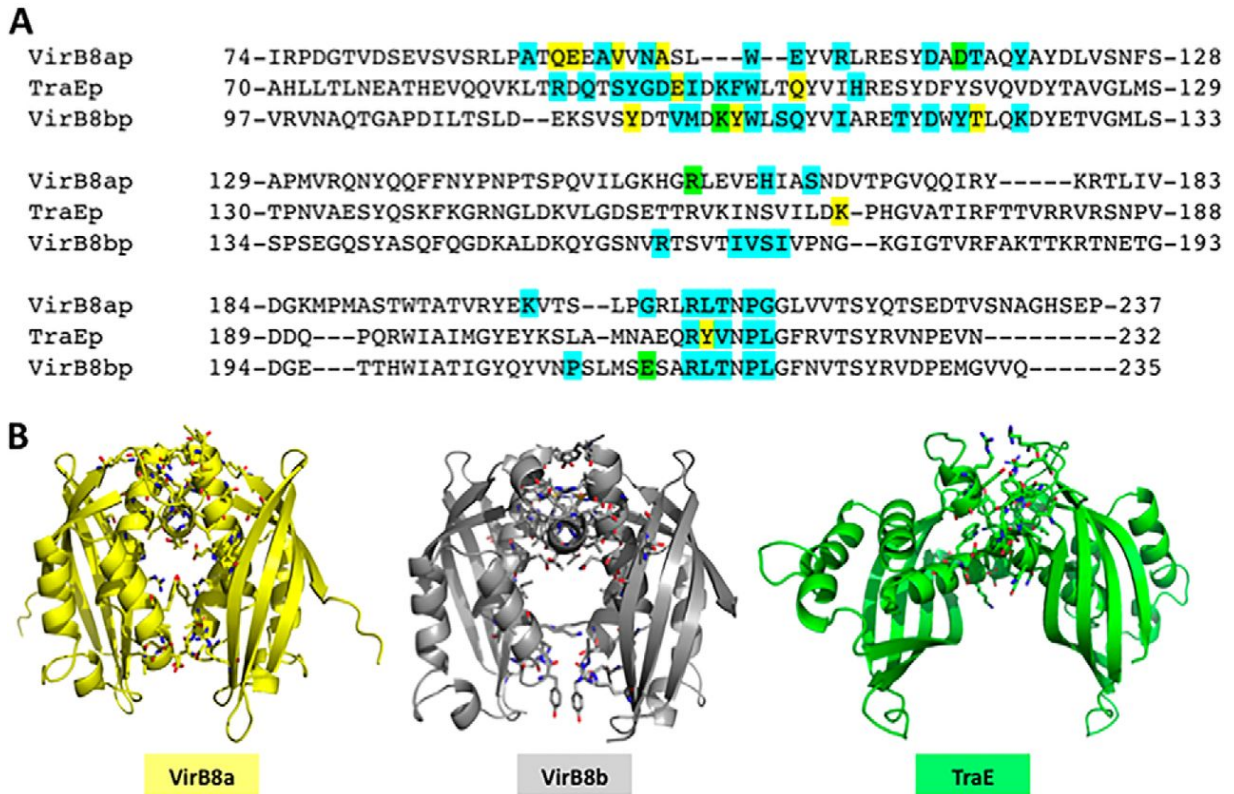
**FIGURE 2.2.** TraE, VirB8b and CagV have the capacity to form homomultimers and heteromultimers. SDS-PAGE analysis of the purified periplasmic domains of TraE (A), VirB8b (B) and CagV (C) in the absence (0 mM) and in the presence of the cross-linking agent DSS (0.4 mM to 2 mM). (D) Western blot analysis with TraE-specific antiserum after SDS-PAGE of the purified periplasmic domains of TraE, CagV and VirB8b following cross-linking with DSS (2 mM). Arrows indicate higher-molecular-weight complexes formed after cross-linking; TraE-CagV and TraE-VirB8b complexes in (D) migrate at higher molecular masses than TraE-TraE complexes due to the higher molecular masses of the heterologous interaction partners CagV and VirB8b.



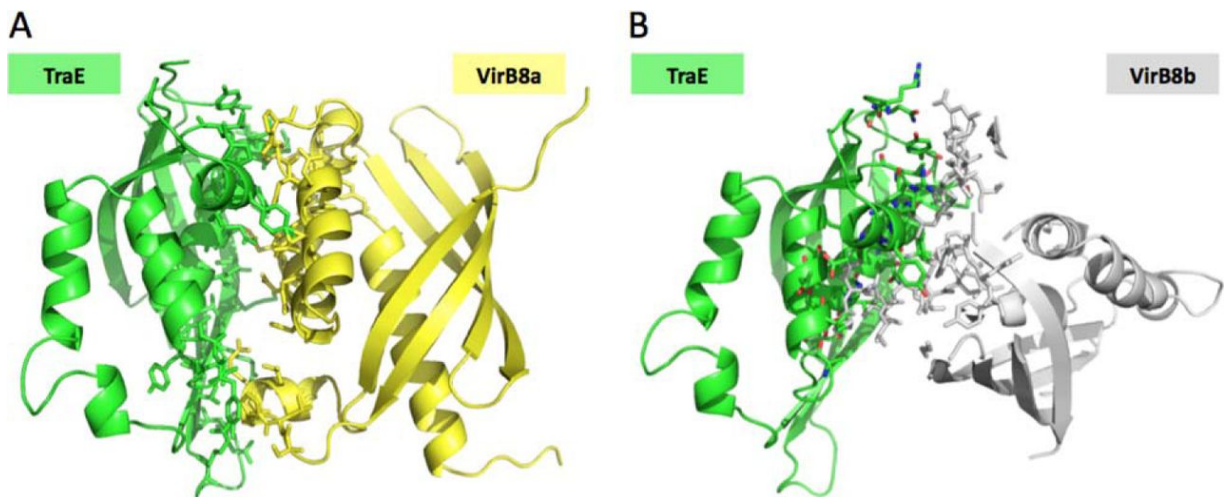
**FIGURE 2.3.** Representative single-cycle SPR analyses for tandem 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, and 25  $\mu\text{M}$  “analyte” injections (BSA, solid grey line; CagV, dashed black line; TraE, solid black line; VirB8b, dashed grey line) binding to amine-coupled “ligands” (A, CagV; B, TraE; C, VirB8b; 300-900 RU each) at 25  $\mu\text{L}/\text{min}$ . D, apparent equilibrium dissociation constants ( $K_D$ ) represent the average of at least three independent trials ( $\pm$  standard error).



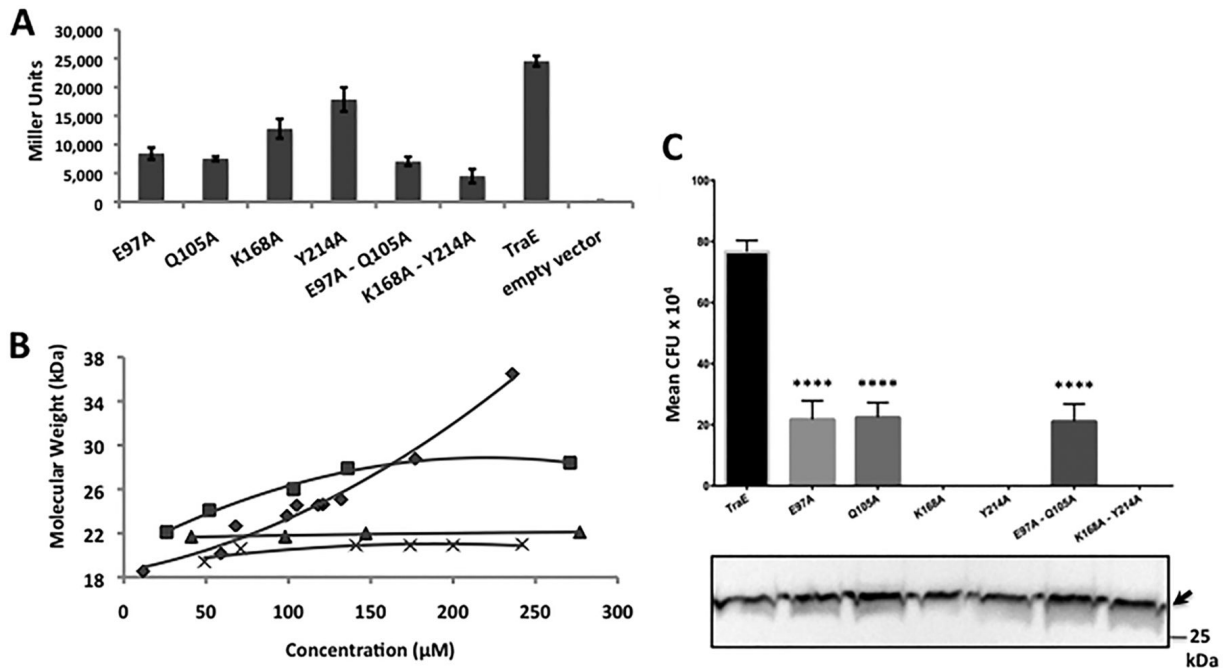
**FIGURE 2.4.** Structural analysis of TraE dimerization. (A) Structure of the TraE dimer determined by X-ray crystallography (side view and top view). (B) Comparison of TraE and VirB8 from *A. tumefaciens* (PDB: 2CC3) monomer structures. (C) Comparison of TraE and VirB8 from *B. suis* (PDB: 4AKZ) monomer structures. (D) Four amino acids (E97, Q105, K168, Y214) implicated in the formation of inter-protomer hydrogen-bonds at the observed dimerization interface.



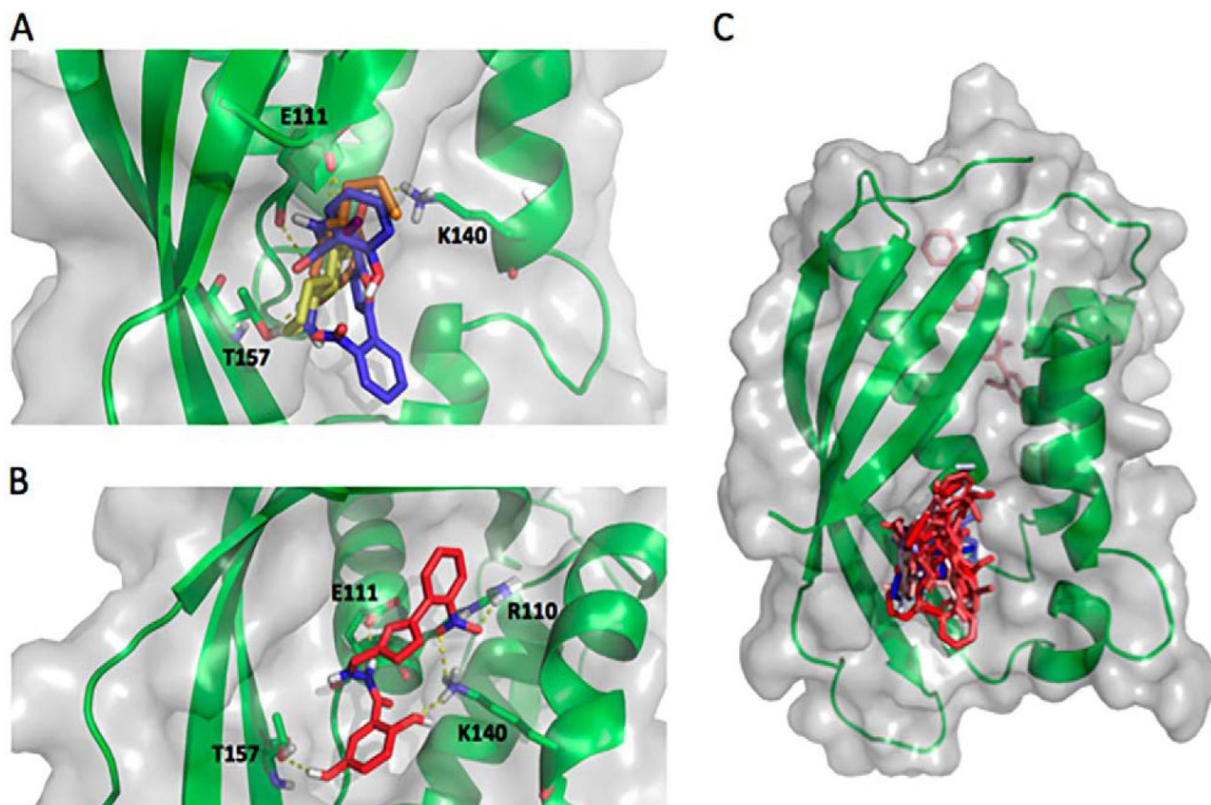
**FIGURE 2.5.** Comparison of the homodimer interface of the periplasmic forms of TraE, VirB8a and VirB8b. (A) Sequence alignment of the periplasmic domains of TraE, VirB8a and VirB8b with the amino acids at the homodimer interface (blue - residues present at the interface, yellow - residues making hydrogen bonds, green - residues making salt-bridges). (B) Overall geometry of the VirB8a (PDB: 2CC3) homodimer structure as compared to VirB8b (PDB: 2BHM) and TraE.



**FIGURE 2.6.** *In silico* docking to predict heterodimer formation between TraE, VirB8a and VirB8b using the Zdock server (Pierce et al., 2014). (A) Docking result showing potential TraE-VirB8a heterodimer. (B) Docking result showing potential TraE-VirB8b heterodimer.



**FIGURE 2.7.** Genetic and biochemical analysis shows the importance of TraE dimerization. (A) The BTH assay was used to measure the interactions between fusion proteins of TraE variants with adenylate cyclase domains, leading to production of  $\beta$ -galactosidase in *E. coli* reporter strains. The dimerization of TraE wild type protein was used as a positive control while co-expression of the plasmid T25-TraE with an empty T18 fusion vector were used as a negative control. Values and standard deviations were calculated from three independent experiments. (B) Gel filtration analysis at increasing concentrations of the periplasmic domain of TraE (diamonds) shows concentration-dependent dimer formation while its variants E97A (squares), Y214A (triangles) and E97A-Q105A (crosses) show no evidence for dimer formation as a function of concentration (C) pKM101 conjugation assay to assess the capacity of TraE and of its variants at the dimerization site to complement a pKM101::traE transposon insertion plasmid (CFU, colony forming units of recipient strain after plasmid transfer). The data represent averages and standard error of the mean of three biological replicate cultures. Asterisks denote statistically significant differences ( $p \leq 0.0001$ ,  $n = 3$ ). The lower panel show the Western blot using anti-TraE antibody. Signals shown by arrow correspond to the predicted molecular mass of TraE wt and variants.

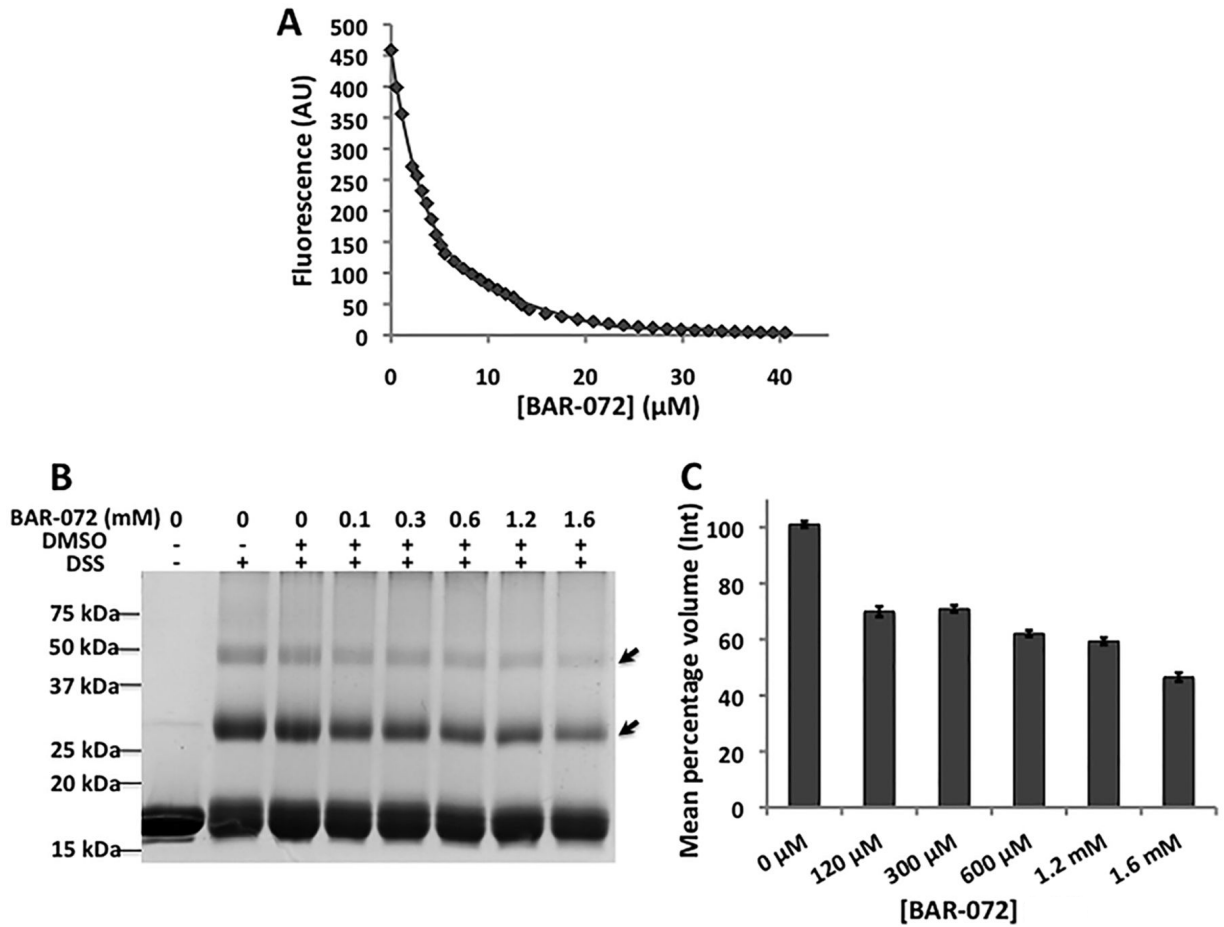


**FIGURE 2.8.** Docking of VirB8b inhibitors and of B8I-2 derivatives to TraE. (A) Predicted binding of B8I-1 (orange), B8I-2 (blue), B8I-3 (yellow) to TraE using AutoDock Vina. Amino acids E111, K140 and T157 form a hydrogen bond network in TraE. (B) Binding site of molecule BAR-072 (red) to TraE as predicted by AutoDock Vina. In addition to the hydrogen-bond network E111-K140-T157 contributing to ligand binding, R110 may form an additional hydrogen bond with BAR-072. (C) Cartoon (green) and surface (grey) representations of the TraE monomer showing the common binding site for 17 of 18 tested small molecules as predicted by AutoDock Vina. B8I-8 is the only compound predicted to bind in a surface groove in the back of the image. Atoms for each inhibitor were colored using a rainbow gradient based on the relative intermolecular binding energy with TraE (lowest energy shown in blue, highest energy shown in red).

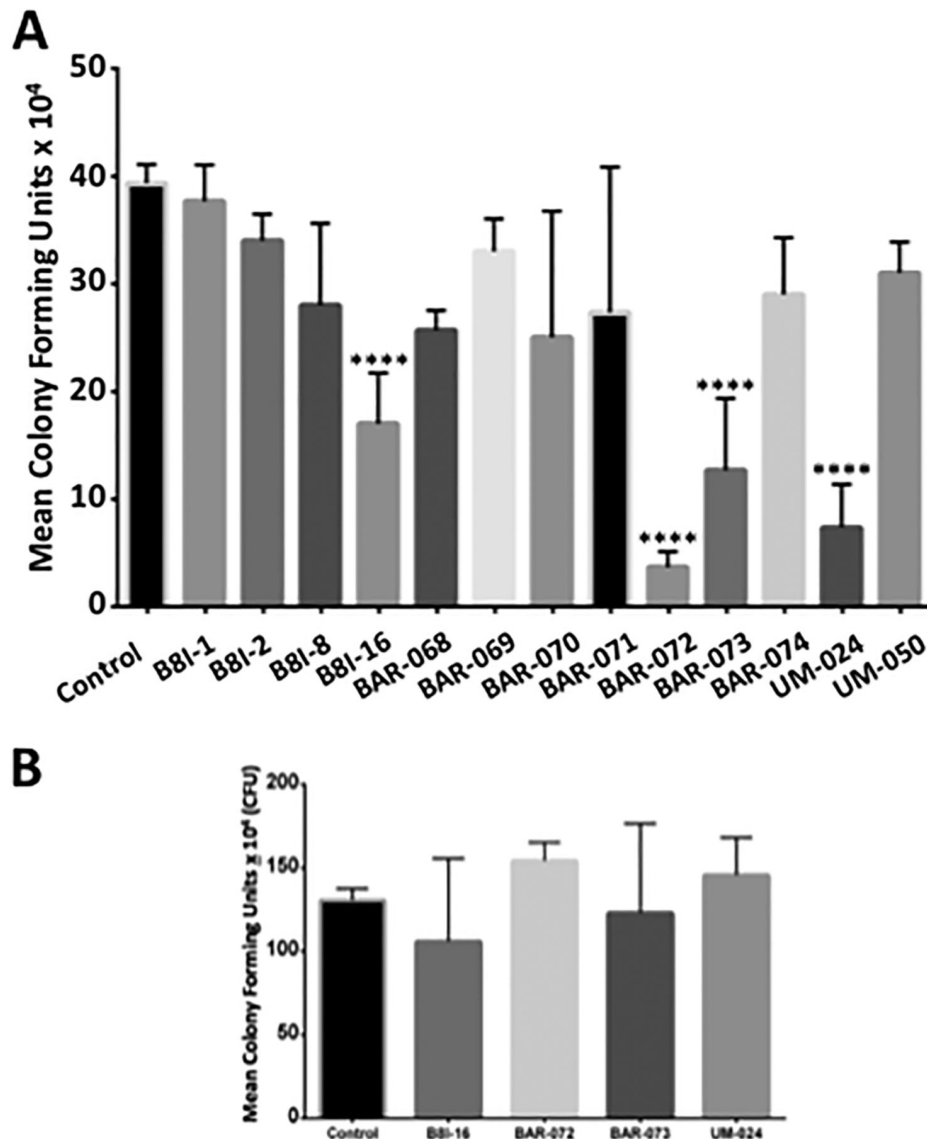


Name	Structure	Name	Structure	Name	Structure
B8I-1		BAR-068		UM-023	
B8I-2		BAR-069		UM-024	
B8I-3		BAR-070		UM-048	
B8I-4		BAR-071		UM-050	
B8I-5		BAR-072			
B8I-8		BAR-073			
B8I-16		BAR-074			

**FIGURE 2.9.** Chemical structures of small molecules tested by *in silico* docking, *in vitro* binding and *in vivo* conjugation assays. Previously tested molecules (B8I-1 to B8I-16, UM-023 to UM-050)(Smith et al., 2012)) and new B8I-2 analogues (BAR-068 to BAR-074) used to probe the binding site.



**FIGURE 2.10.** Effect of BAR-072 on TraE. (A) *In vitro* binding assay based on tryptophan quenching upon addition of BAR-072 to the purified periplasmic domain of TraE. (B) Cross-linking of TraE with DSS (0.4 mM) in presence of BAR-072 at given concentrations (0 to 1.6 mM, DMSO final concentration of 2.5%); arrows indicate higher-molecular-weight complexes formed after cross-linking of TraE. (C) Quantification of the formation of DSS-dependent cross-linking products of TraE (indicated by arrows in panel B) in the absence and in the presence of BAR-072 (0 to 1.6 mM). Formation of the two cross-linking products was normalized by comparison with the control without BAR-072 (100% is the control); the data represent averages and standard error of the mean of three replicates.



**FIGURE 2.11.** Effect of TraE-binding small molecules on conjugation. (A) Conjugation assays between pKM101-carrying donor strain FM433 and plasmid-free recipient WL400 were conducted in the presence of 50  $\mu$ M TraE-binding small molecules. (B) *RP4* conjugation assay in presence of inhibitors of pKM101 transfer. Conjugation assays between plasmid *RP4*-carrying donor strain FM433 and plasmid-free recipient WL400 were conducted in the presence of 50  $\mu$ M of the small molecules. The numbers of colony forming units compared to a control experiment in the absence of the small molecules are shown; data represent averages and standard error of the mean of three biological replicate cultures. Asterisks denote statistically significant differences ( $p \leq 0.0001$ ,  $n = 3$ ).

## Chapitre 3 : Article 2

**Title:** Fragment-based screening identifies novel targets for inhibitors of conjugative transfer of antimicrobial resistance by plasmid pKM101

**Authors:** Bastien Casu, Tarun Arya, Benoit Bessette, Christian Baron\*

**Affiliation:** Department of Biochemistry and Molecular Medicine,  
Faculty of Medicine,  
Université de Montréal, 2900 Boulevard Édouard-Montpetit, Montréal,  
QC, H3T 1J4, Canada

**\*Corresponding Author:** Christian Baron

Université de Montréal, 2900 Boulevard Édouard-Montpetit,  
Montréal, QC, H3T 1J4, Canada

E-mail: christian.baron@umontreal.ca

Phone: (514) 343-6300

**Keywords:** Type IV secretion, fragment-based screening, drug design, conjugation, plasmid, antimicrobial resistance

**Cet article a été publié dans:** Scientific reports (Sci Rep. 2017, 7(1):14907. doi: 10.1038/s41598-017-14953-1).

**Contribution des auteurs:**

B.C : Participation au design de l'expérience, préparation des échantillons, interprétation des résultats et rédaction de l'article, T.A : Participation au design de l'expérience et révision de l'article, B.B : Réalisation des expériences de fluorimétrie différentielle à balayage et révision de l'article, C.B: Élaboration et coordination de l'étude, et rédaction de l'article.

## **Abstract**

The increasing frequency of antimicrobial resistance is a problem of global importance. Novel strategies are urgently needed to understand and inhibit antimicrobial resistance gene transmission that is mechanistically related to bacterial virulence functions. The conjugative transfer of plasmids by type IV secretion systems is a major contributor to antimicrobial resistance gene transfer. Here, we present a structure-based strategy to identify inhibitors of type IV secretion system-mediated bacterial conjugation. Using differential scanning fluorimetry we screened a fragment library and identified molecules that bind the essential TraE protein of the plasmid pKM101 conjugation machinery. Co-crystallization revealed that fragments bind two alternative sites of the protein and one of them is a novel inhibitor binding site. Based on the structural information on fragment binding we designed novel small molecules that have improved binding affinity. These molecules inhibit the dimerization of TraE, bind to both inhibitor binding sites on TraE and inhibit the conjugative transfer of plasmid pKM101. The strategy presented here is generally applicable for the structure-based design of inhibitors of antimicrobial resistance gene transfer and of bacterial virulence.

## Introduction

The conjugative transfer of plasmids between Gram-negative bacteria is mediated by type IV secretion system (T4SS) and many pathogens such as *Helicobacter pylori*, *Bartonella* and *Brucella* species use this strategy for the transfer of virulence factors into mammalian cells. T4SS typically comprise 12 membrane-associated proteins that fall into three categories: cytoplasmic ATPases (VirB4, VirB11 and VirD4), surface-exposed pilus components (VirB2 and VirB5) and core components associated with the inner and/or the outer membrane (VirB1, VirB3, VirB6, VirB7, VirB8, VirB9 and VirB10) (Chandran Darbari & Waksman, 2015; Trokter et al., 2014b). X-ray and NMR structures of several individual proteins are available and additional information on the overall T4SS complex structure was obtained by electron microscopy and X-ray crystallography of subcomplexes from plasmid conjugation systems pKM101 and R388 (Chandran et al., 2009; Fronzes, Schafer, et al., 2009; Low et al., 2014a). Considering the importance of T4SS for bacterial virulence and for the transfer of antimicrobial resistance (AMR) genes (Brown & Wright, 2016; Chandran Darbari & Waksman, 2015; Trokter et al., 2014b), it would be interesting to design inhibitors of this process and these molecules could also serve as chemical probes for mechanistic studies (Baron, 2010; Ruer, Pinotsis, Steadman, Waksman, & Remaut, 2015; Zambelloni, Marquez, & Roe, 2015). Small molecule inhibitors of the ATPase activity of VirB11 homolog Cag $\alpha$  that inhibit the virulence of *H. pylori* were described, but no structural information on their binding site is available (Hilleringmann et al., 2006). Inhibitors of *Brucella* VirB8 were identified using an *in vivo* dimerization assay based on the bacterial two-hybrid system (Paschos et al., 2011). X-ray analysis of the periplasmic domain of the *Brucella* VirB8 protein, co-crystallized with an inhibitor, and *in silico* docking showed that these molecules bind to a surface groove of the protein (Smith et al., 2012). The most active VirB8 inhibitors are salicylidene acylhydrazides that inhibit dimerization of the protein and also the virulence of *Brucella* (Smith et al., 2012). Previous work has shown that derivatives of the most active molecule B8I-2 bind to the VirB8 homolog TraE from pKM101, inhibit its dimerization and conjugative transfer of the plasmid (Casu et al., 2016). Interestingly, the predicted inhibitor binding site is distant from the dimerization site of the protein, and until now is not clear how these molecules inhibit dimerization and protein functions (Sharifahmadian, Arya, et al., 2017). Here, we have identified novel chemical entities that bind

to the previously known site as well as to a novel site close to the dimerization interface of the protein.

## **Results**

### **Screening for TraE-binding fragments**

Here, we conducted a fragment-based screen to identify novel chemical entities that bind to and may identify novel druggable sites on TraE and other VirB8-like proteins. Fragment libraries are smaller (usually a few hundred molecules) than the libraries of small molecules typically used for high-throughput screening (several thousand to millions) and the screens can generally be conducted in a standard laboratory setting without highly specialized equipment (Mashalidis, Sledz, Lang, & Abell, 2013; Silvestre, Blundell, Abell, & Ciulli, 2013). The binding affinities of fragments that are typically smaller than 300 Da and lower than that of small molecules (larger than 500 Da), but fragments are excellent starting points for the synthesis of more potent small molecules contributing to the increasing popularity of fragment-based drug discovery (FBDD) (Mashalidis et al., 2013). Using a differential scanning fluorimetry (DSF) assay in an RT-PCR instrument we screened a fragment library of 505 molecules (supplementary Fig. 1) identifying 16 molecules that significantly increase the thermal melting point of the purified periplasmic domain of TraE (Fig. 1A). The structures of the molecules are diverse, yet all but one contain a carboxyl group that may be involved in interactions with charged amino acid side chains of the target (supplementary Fig. 2). Fluorescence quenching shows binding of the fragments and the  $K_D$  values between 23  $\mu\text{M}$  and 103  $\mu\text{M}$  are in the range of what is expected for fragments (Fig. 1B) (Mashalidis et al., 2013).

### **Identification of the binding sites on TraE and design of small molecule derivatives**

*In silico* docking suggests that many fragments may bind to a surface groove of TraE that was already shown to be an inhibitor binding site in VirB8-like proteins (Casu et al., 2016; Smith et al., 2012). In addition, docking predicted an additional potential binding site in an  $\alpha$ -helical region of TraE that is close to the dimerization interface (Fig. 1C). Whereas docking predictions



are increasingly reliable, the design of inhibitors requires high-resolution structural information and towards this goal we soaked TraE crystals with the binding fragments. We obtained X-ray structures in case of two fragments (1E6 and 4H10) that diffracted to 2.5 Å and 2.79 Å resolution, respectively (supplementary Tab. 2). Surprisingly, molecule 1E6 (2-furoic acid) bound to two sites on TraE (Fig. 2A and B). The first binding site is in the inhibitor-binding surface groove, whereas the second molecule binds to an  $\alpha$ -helical region at the dimerization site of VirB8-like proteins as was predicted by docking. In contrast, molecule 4H10 (2-chloroisonicotinic acid) binds adjacently to the first binding site of molecule 1E6 (Fig. 2D and 2E). Since both fragments bind in close proximity we reasoned that combining them may generate small molecules with higher affinity. Based on this rationale we obtained molecule 239852 (2-(2-furyl)isonicotinic acid) (Fig. 2F), which is essentially a fusion of 4H10 and 1E6, as well as four other similar molecules from a commercial supplier (Enamine).

### **Small molecules binding two alternative sites in TraE**

*In silico* docking predicted that all these molecules bind to one or both of the 1E6 binding sites observed by X-ray crystallography (supplementary Fig. 3). Analysis by X-ray crystallography revealed that two of the molecules bind to the two alternative sites on TraE thus confirming the docking predictions. Molecule 239852 binds to the previously described inhibitor binding surface groove (Fig. 3A and C), whereas molecule 105055 (4-(1H-pyrrol-1-yl)pyridine-2-carboxylic acid) binds to the  $\alpha$ -helical region of TraE close to the dimerization site of VirB8-like molecules (Fig. 3B and D). Interestingly, X-ray structure analysis of TraE revealed that the overall geometry of the dimer (Fig. 3D) differs from that of other VirB8 homologs (Fig. 3E) (Casu et al., 2016). This difference may reflect two conformational states of VirB8-like proteins. This opens the possibility that molecule 105055 may directly interfere with dimerization, while molecule 239852 could exert an effect similar to previously described VirB8 inhibitors.

### **Novel small molecules bind TraE and inhibit its functions**

To assess whether the 4H10/1E6-derived molecules bind TraE and impact protein function we next conducted a series of *in vitro* and *in vivo* assays. First, we tested binding to TraE using fluorescence quenching, revealing that both molecules 105055 and 239852 have increased

effects as compared to the original fragments 4H10/1E6 and they also stabilized the protein as assessed by DSF (Fig. 4A and B). The other derived molecules have binding activities similar to the original fragments, but they do not induce positive thermal shift changes, suggesting that their interaction with TraE is relatively weak (Fig. 4A and B). Second, we tested the effects of molecules 105055 and 239852 on dimerization using an *in vitro* cross-linking assay with the purified periplasmic domain of TraE. Both molecules significantly inhibit cross-linking, inhibition is more pronounced in the case of molecule 105055 and combination of both molecules further accentuates inhibition (Fig. 4C and supplementary Fig. 4). Third, we analysed whether the original fragments (4H10 and 1E6) or the derived molecules inhibit the conjugative transfer of pKM101. Addition of the fragments as well as of the derived small molecules that do not stabilize the protein in the DSF assay at concentrations of 50  $\mu$ M has no effect on conjugation. However, molecules 105055 as well as 239852 significantly reduce conjugative DNA transfer (Fig. 4D). The efficacy of conjugative transfer is further decreased to about 45% of the control when both molecules are combined. Interestingly, combination with the known TraE inhibitor BAR-072 (Casu et al., 2016) further reduces conjugation of these molecules to values as low as 4% of the control (Fig. 4D). The molecules do not negatively impact bacterial viability and they have no effect on transfer of the unrelated plasmid RP4, suggesting that the effect is specific for pKM101 (supplementary Fig. 5, (Casu et al., 2016)).

## Discussion

We here present a generally applicable structure-based strategy to identify inhibitors of bacterial conjugation. The DSF approach used as primary assay to screen a library of several hundred fragments can be conducted in most molecular biology laboratories since it uses a commonly available RT-PCR instrument and does not necessitate specialized high-throughput screening equipment. Using this approach, we confirmed that the previously identified inhibitor-binding surface groove of VirB8-like proteins is indeed a promising target for the binding of inhibitors that could be further explored for drug design. Despite repeated efforts in our group ((Casu et al., 2016; Sharifahmadian, Arya, et al., 2017; Smith et al., 2012) and unpublished work) we have obtained only one co-crystal structure with a binding small molecule (B8I-1) that did not have

a strong effect on *Brucella* virulence (Paschos et al., 2011). All the data on the binding of the most biologically active molecules (salicylidene acylhydrazide B8I-2 and its derivatives) to VirB8 and TraE were obtained by *in silico* docking – an approach that is increasingly reliable, but that cannot replace actual structural information. For this reason, it was very important to confirm by X-ray crystallography that two of the identified fragments (4H10 and 1E6) indeed bind to the surface groove of the protein that was predicted to bind B8I-2 and its derivatives. To our surprise, molecule 1E6 also binds to an alternative site that is close to the dimer interface of VirB8-like proteins. The discovery of this novel binding site opens additional opportunities for the design of small molecules that inhibit the functions of VirB8-like proteins.

Since fragments 4H10 and 1E6 bind adjacently to the surface groove, we designed a series of small molecules that essentially represent a fusion of these molecules. Interestingly, the newly designed small molecules 105055 as well as 239852 bind to both respective sites that have been identified by fragment screening. Even more importantly, they inhibit dimerization of the protein as well as conjugative transfer of plasmid pKM101. The degree of inhibition is relatively modest, but it is further enhanced by combining the two molecules also adding the previously identified conjugation inhibitor BAR-072 (Casu et al., 2016). This work constitutes a key step for the structure-based design of more potent conjugation inhibitors based on the novel chemical entities we have identified here. Also, our data demonstrate the existence of two potential druggable sites on TraE. It will be interesting to assess whether both sites can be exploited for fragment-based approaches aimed at identifying inhibitors of other VirB8-like proteins.

The strategy validated here is applicable to VirB8-like proteins from the T4SS of bacterial pathogens for which structural and functional information is available (Bailey et al., 2006a; Gillespie, Phan, Scheib, Subramanian, Edwards, Lehman, Piitulainen, Sayeedur Rahman, et al., 2015; Goessweiner-Mohr et al., 2013; Terradot et al., 2005a). However, the application is not limited to T4SS components and this approach could be broadly applied to any conjugation system component or virulence factor for which high-resolution structural information is available. The availability of a defined target and of structural information is crucial for structure-based drug design aimed at improving hits identified by screening. In the absence of such information on the target and its structure, it can be quite challenging to further advance

inhibitor and drug development. This was the case for inhibitors of bacterial type III secretion systems where it took several years after discovery of the molecules to identify the targets and the inhibitor binding sites (D. Wang et al., 2011; Zambelloni et al., 2015). The strategy presented here can be applied to a wide variety of virulence factors and has potential to contribute to the development of drugs that reduce AMR gene transfer and bacterial virulence.

## **Methods**

### **Protein overexpression and purification**

Protein overexpression and purification was performed as described previously (Casu et al., 2016). The TraE buffer was changed to 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.4. TraE protein concentrations were determined using the molar extinction coefficient at 280 nm of 25 900 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### **Differential scanning fluorimetry**

A library of 505 fragments was used in this study of which 186 were previously described (Sharifahmadian, Arya, et al., 2017) and the others are listed in supplementary table 3. DSF experiments were performed as described previously (Sharifahmadian, Arya, et al., 2017). DSF was conducted using 5 μM of protein, 10X concentration of SYPRO Orange (from 5000X stock solution, ThermoFisher) in 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.4 and 5% final concentration of DMSO. For fragment-based screening and molecule optimization, fragments or small molecules were added to final concentrations of 5 mM. SYPRO Orange fluorescence was monitored over 20–95 °C with a LightCycler® 480 instrument (Roche, USA). The LightCycler® 480 Software (Roche) was used to calculate the first derivative of the resulting melting curve, with the steepest point of the slope being the T<sub>m</sub>. Fragments were considered to be hits when ΔT<sub>m</sub> was higher than 1°C, which is two times higher than the standard deviation of the DMSO control.

### **Analysis of small molecule binding by fluorescence spectroscopy**

Changes of the intrinsic UV fluorescence emission of TraE upon binding of fragments and small molecules were recorded at 20°C with a Cary Eclipse Fluorometer (Varian) (λ<sub>ex</sub> 295 nm, λ<sub>em</sub>

340 nm, 5 nm excitation and emission slit widths) in 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.4. The spectra were corrected for dilution effects and  $K_D$  values were calculated from the ligand binding fluorescence data fitted to a single site saturation curve with constant background using the Grafit 6.0 software package.

### **Crystallization of TraE, formation of fragment or small molecule complexes with TraE crystals and data collection**

The TraE protein (15 mg/ml) was crystallized in 16% (w/v) PEG 10 000, 50 mM Bis-Tris (pH 5.5), 100 mM ammonium acetate. To obtain TraE–fragment or TraE-small molecule complexes, crystals of TraE were soaked for time periods ranging from 1 min to 6 h in a cryoprotectant solution containing 16% (w/v) PEG 10 000, 50 mM Bis-Tris (pH 5.5), 100 mM ammonium acetate, 20% ethylene glycol and 1–10 mM fragments or small molecules. After soaking, the crystals were flash frozen in liquid nitrogen and the data were collected at the Cornell High Energy Synchrotron Source (CHESS, USA) beamline F1. The intensity data was processed using the HKL2000 program.

### **Structure determination of TraE**

Structures were solved by molecular replacement using the template (PDB # 5I97) as reference model. Refinement was performed using Phenix software suites to achieve the highest possible resolution (Adams et al., 2002). Electron density maps were calculated to the resolution indicated in supplementary table 2. Final model statistics, calculated with Phenix, molprobtity and PROCHECK, are shown in supplementary table 2. Stereochemical restraints for ligands were generated with Elbow from Phenix software. The atomic coordinates and structure factors for TraE in complex with fragments and small molecules have been deposited at the Protein Data Bank (PDB # 5WIC, PDB # 5WII, PDB # 5WIO, PDB # 5WIP). All figures were prepared using the program PyMOL.

### **Molecular docking analysis**

*In silico* docking was performed using Autodock Vina (Trott & Olson, 2010a) run through PyRx to manage the workflow and PyMol to visualize the results. The chemical structures for each ligand were drawn with MarvinSketch (v15.7.13.0, 2015), ChemAxon

(<http://www.chemaxon.com>), converted to PDB format, followed by processing with Autodock Tools 1.5.4 to assign Gasteiger charges, merging non-polar hydrogens and to set torsional bonds. Docking runs were performed within a 47 x 52 x 33 Å rectangle search space surrounding the binding pocket, and output modes were ranked according to binding affinity (BA).

### **Analysis of protein-protein interactions by crosslinking**

Chemical crosslinking with disuccinimidyl suberate (DSS, Pierce) was performed as described previously (Casu et al., 2016) and the formation of crosslinking products was quantified by SDS-PAGE and using the ImageLab Software 4.0 (Bio-Rad).

### **Quantitation of conjugative DNA transfer**

Quantitation of conjugative DNA transfer was performed as described previously (Casu et al., 2016). For analysis of the inhibition of conjugation by fragments or small molecules, the cells were cultivated on agar and in liquid media in the presence of 50 µM of the small molecules in the presence of 2.5% DMSO. The presence of DMSO and of the fragments or small molecules did not negatively impact bacterial growth.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants to C.B. from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR MOP-84239), the NSERC-CREATE program on the Cellular Dynamics of Macromolecular Complexes (CDMC), a seed grant from Merck, Sharp and Dohme, the Canada Foundation for Innovation (CFI) and the Fonds de recherche du Québec-Santé (FRQ-S). The authors would like to thank Nazzareno D'Avanzo (Université de Montréal) for discussions on crystallographic analysis. Synchrotron X-ray data were collected at MacCHESS beamline F1. CHESS is supported by the NSF & NIH/NIGMS via NSF award DMR-1332208, and the MacCHESS resource is supported by NIH/NIGMS award GM-103485.

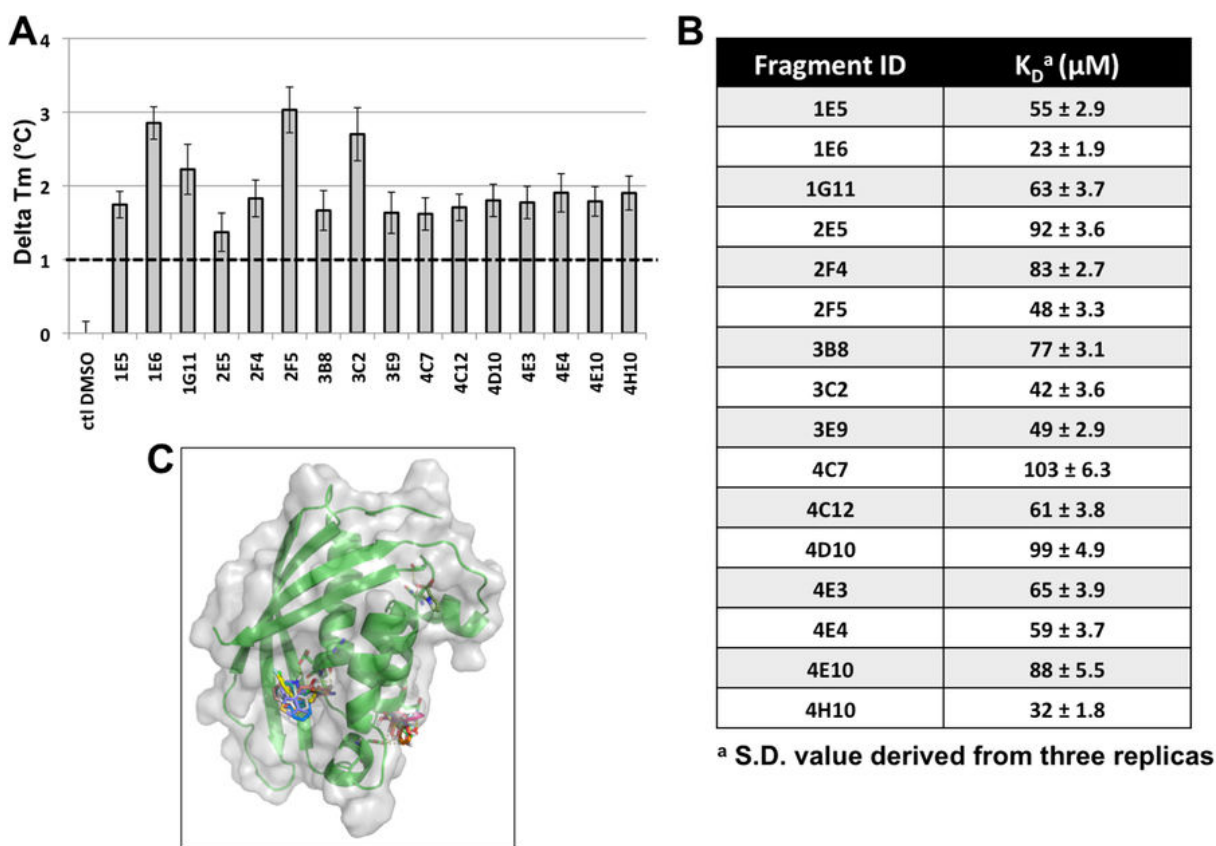
### **Author contributions**

B.C performed biochemical experiments B.C. and T.A. performed X-ray crystallography, B.C. and B.B. performed DSF experiments, B.C. and C.B. conceived the experiments and wrote the manuscript. All authors analysed the results, read and approved the manuscript for submission.

### Competing financial interests

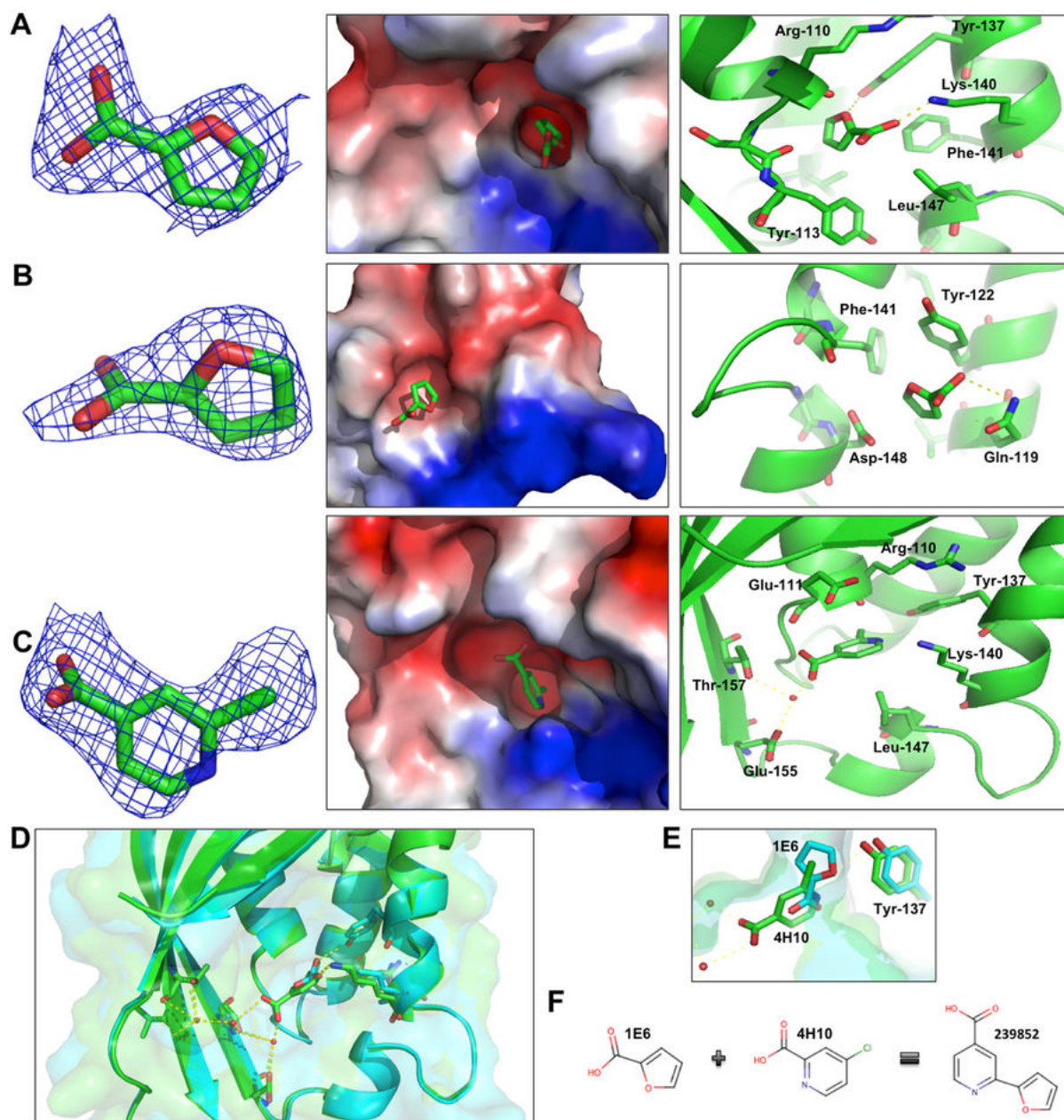
The authors declare that they have no competing financial interests.

### Figures



<sup>a</sup> S.D. value derived from three replicas

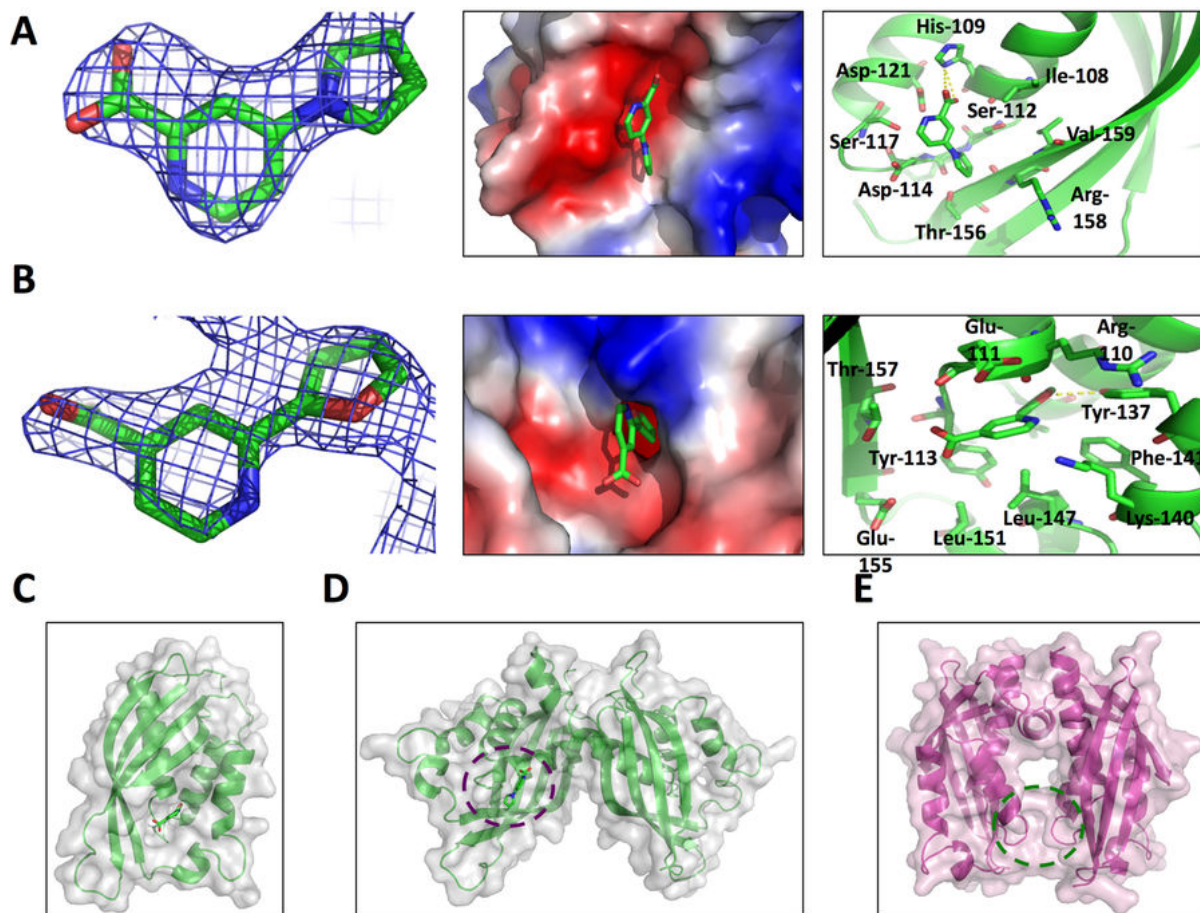
**Figure. 3.1. Binding fragments identified by DSF screening.** (A) Replicates of DSF experiment for binding fragments. Data presented are from three separate experiments conducted in triplicates, error bars reflect the standard deviation. (B) Binding of fragments to TraE calculated using fluorescence quenching as assay. (C) Predicted binding of fragments to TraE using AutoDockVina.



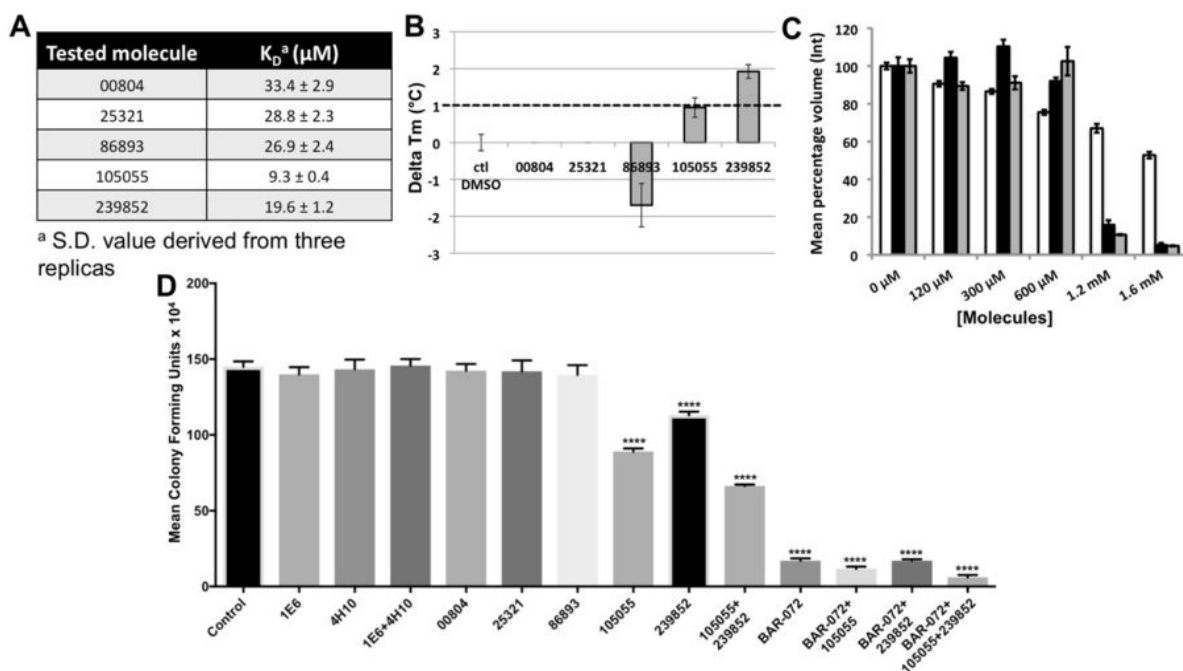
**Figure 3.2. X-ray crystal structures of fragments bound to TraE.** (A) First binding site of 1E6 fragment, (B) second binding site of 1E6 fragment and (C) 4H10 fragment bound to TraE. From left to right, fragment stick representations with the 2Fo-Fc electron density maps shown as a blue mesh at  $\geq 1.0 \sigma$ , electrostatic potential surface representations of TraE with fragments inside the binding pockets and amino acids in the binding pocket of each fragment. (D) Overlay of the TraE-1E6 (in green) and TraE-4H10 (in blue) complex crystal structures (RMSD is 0.69



Å) with the description of the amino acids participating in hydrogen bonds represented by dashed yellow lines. Hydrogen bonds with fragments are represented by dashed yellow lines. Water molecules coordinating binding between the fragments and TraE are shown as small red spheres. (E) Focus on the position of fragments 1E6 and 4H10 inside the binding pocket (F) Schematic combination of fragments 1E6 and 4H10 binding to TraE to design small molecule inhibitor 239852.



**Fig. 3.3. X-ray crystal structure of small molecules bound to TraE.** (A) Binding sites of molecule 105055 and (B) of molecule 239852. From left to right, fragment stick representations with the 2Fo-Fc electron density maps shown as a blue mesh at 0.9  $\sigma$  for 239852 and 1.0  $\sigma$  for 105055, electrostatic potential surface representations of TraE-bound small molecules and amino acids implicated in binding, hydrogen bonds with small molecules are represented by dashed yellow lines. (C) Overall geometry of TraE structure in complex with molecule 239852 (D-E). Overall geometry of TraE dimer structure in complex with molecule 105055 and comparison with the structure of the VirB8 dimer from *Brucella suis* (PDB code 2BHM) (Terradot et al., 2005a). The position of the binding site is represented by a dashed purple circle for TraE and by a dashed green circle for VirB8.



**Figure 3.4. Characterization of the effects of small molecules *in vitro* and *in vivo*.** (A) Binding of small molecules to TraE calculated using the fluorescence quenching assay. (B) DSF experiments to assess binding of small molecules. Data presented are from three separate experiments conducted in triplicates, error bars reflect the standard deviation. (C) Formation of DSS-dependent cross-linking products of TraE in the absence and in the presence (0 - 1.6 mM) of molecules 239852, 105055, and combination of 105055 and 239852. Formation of the cross-linking product was normalized by comparison with the control without small molecules (100% is the control), shown in white for 239852, in black for 105055 and in grey for the combination of 105055 and 239852; the data represent averages and S.E. (error bars) of the mean of three replicates. (D) Conjugation assays between pKM101-carrying donor strain FM433 and plasmid-free recipient WL400 in the presence of 50  $\mu\text{M}$  TraE-binding fragments and small molecules. The numbers of colony-forming units compared with a control experiment in the absence of the small molecules are shown; data represent averages and S.E. (error bars) of three biological replicate cultures. Asterisks, statistically significant differences ( $p \leq 0.0001$ ,  $n = 3$ ).

## Chapitre 4 : Article 3

**Title:** The VirB8 homolog TraE from plasmid pKM101 forms a hexameric ring structure and interacts with the VirB6 homolog TraD

**Authors:** Bastien Casu<sup>1</sup>, Charline Mary<sup>1</sup>, Aleksandr Sverzhinsky<sup>1</sup>, Aurélien Fouillen<sup>1,2</sup>, Antonio Nanci<sup>1,2</sup> and Christian Baron<sup>1\*</sup>

**Affiliation:** <sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

<sup>2</sup>Laboratory for the Study of Calcified Tissues and Biomaterials, Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

**\*Corresponding author:** christian.baron@umontreal.ca

**Keywords:** type IV secretion system, VirB8-like, VirB6-like, membrane protein, membrane pore, conjugation, MALS, electron microscopy, SAXS, antimicrobial resistance

**Cet article a été publié dans:** The Proceedings of the National Academy of Sciences USA (Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 May 21. pii: 201802501. doi: 10.1073/pnas.1802501115).

### **Contribution des auteurs :**

B.C : Participation au design de l'expérience, préparation des échantillons, interprétation des résultats et rédaction de l'article, C.M : Participation au design de l'expérience, réalisation des expériences de clonage du pETduetTraD-TraE et révision de l'article, A.S et A.F: Participation au design de l'expérience, réalisation des expériences de microscopie électronique et révision de l'article, A.N : Participation au design de l'expérience et révision de l'article, C.B: Élaboration et coordination de l'étude, et rédaction de l'article.

## **Abstract**

Type IV secretion systems are multi-protein assemblies that translocate macromolecules across the cell envelope of bacteria. X-ray crystallographic and electron microscopic analyses have increasingly provided structural information on individual T4SS components and on the entire complex. As of now, relatively little information has been available on the exact localization of the inner membrane-bound T4SS components, notably the mostly periplasmic VirB8 and the very hydrophobic VirB6 protein. We here show that the membrane-bound full-length version of the VirB8 homolog TraE from the plasmid pKM101 secretion system forms a high molecular mass complex that is distinct from the previously characterized periplasmic portion of the protein that forms dimers. Full-length TraE was extracted from the membranes with detergents and analysis by size-exclusion chromatography, cross-linking and SEC-MALS show that it forms a high molecular mass complex. Electron microscopy and SAXS analysis demonstrate that full-length TraE forms a hexameric complex with a central pore. We also overproduced and purified the VirB6 homolog TraD and show by cross-linking, size-exclusion chromatography and electron microscopy that it binds to TraE. Our results suggest that TraE and TraD interact at the substrate translocation pore of the secretion system.

## **Significance**

The overproduction and purification of membrane proteins is intrinsically difficult making their analysis challenging. We purified the TraE membrane protein from a bacterial conjugation system that is involved in plasmid transfer. Our results suggest that this protein forms hexamers with a central pore and we also show that it binds to the TraD protein. The structure of TraE is completely different from that of the previously characterized periplasmic domain. This has intriguing implications for the role of TraE and of its interaction partner TraD in substrate translocation across the bacterial cell envelope. This work makes an important contribution to understanding of the mechanism of plasmid transfer, contributing to the design of approaches to inhibit the spread of antibiotic resistance genes.

## Introduction

Secretion systems mediate the passage of macromolecules across cellular membranes. In bacteria, secretion systems are essential for survival and they also play an important role for bacterial virulence. The best-studied examples of bacterial secretion systems that are virulence factors are the type III (T3SS) and type IV secretion systems (T4SS) (Burkinshaw & Strynadka, 2014; Chandran Darbari & Waksman, 2015; Trokter et al., 2014b). The bacterial T4SS family can be divided into three functional groups. First, as in *Brucella* species T4SSs deliver effector proteins into eukaryotic cells during the course of an infection. Second, in pathogens such as *Helicobacter pylori*, T4SSs mediate DNA uptake from and release of DNA into the extracellular environment. Finally, as in the incompatibility group N plasmid pKM101 studied here, T4SSs mediate the conjugative transfer of plasmids into other bacteria (Winans & Walker, 1985).

The well-characterized *Agrobacterium tumefaciens* system serves as example of the typical composition of T4SSs that are generally composed of 12 proteins (Chandran Darbari & Waksman, 2015; Trokter et al., 2014b). T4SSs include three ATPases (VirB4, VirB11, and VirD4) that power complex assembly and substrate translocation. The extracellular pilus consists of a minor (VirB5) and a major (VirB2) subunit. The central periplasmic core complex comprises seven proteins (VirB1, VirB3, VirB6, VirB7, VirB8, VirB9, and VirB10) including an inner membrane channel believed to be composed of VirB6, VirB8 and VirB10. Here, we focus on VirB8- and VirB6-like proteins that are essential for the function of all T4SSs in which they have been studied. Recent results using high-resolution negative-stain electron microscopy have provided groundbreaking insights into the T4SS structure, but the exact localization of VirB8 and of VirB6 proteins is currently unknown (Fronzes, Christie, et al., 2009; Fronzes, Schafer, et al., 2009; Low et al., 2014a). VirB8 homologs are thought to be assembly factors that interact with many other T4SS components in a mostly transient fashion (Aguilar et al., 2011; Aguilar et al., 2010; Casu et al., 2016; A. Das & Y.-H. Xie, 2000; Paschos, Patey, Sivanesan, Gao, Bayliss, Waksman, O'Callaghan, et al., 2006; Sivanesan & Baron, 2011a; Sivanesan et al., 2010; Villamil Giraldo et al., 2012; Yuan, Carle, Gao, Sivanesan, Aly, Höppner, et al., 2005). They are membrane proteins of typically 25 kDa comprising a short N-terminal cytoplasmic region of about 40 amino acids, one transmembrane  $\alpha$ -helix, and a

periplasmic region of 18 kDa. Since work with membrane proteins is intrinsically challenging only the structures of the periplasmic portions of VirB8 homologs have been solved until now, but it is quite likely that the N-terminus and the transmembrane  $\alpha$ -helix make important contributions to protein structure and function (Bailey et al., 2006a; Gillespie, Phan, Scheib, Subramanian, Edwards, Lehman, Piitulainen, Sayeedur Rahman, et al., 2015; Goessweiner-Mohr et al., 2013; Terradot et al., 2005a). So far, structural information is not available for VirB6 proteins that are very hydrophobic inner membrane proteins containing five or more transmembrane helices that are believed to locate at or close to the translocation pore (S.J. Jakubowski, V. Krishnamoorthy, E. Cascales, & P.J. Christie, 2004; P.K. Judd, R.B. Kumar, & A. Das, 2005; Villamil Giraldo et al., 2015; Villamil Giraldo et al., 2012). VirB6 and VirB8 can be cross-linked to the translocated DNA substrate in *A. tumefaciens*, which led to the notion that they may participate directly in substrate translocation (E. Cascales & P.J. Christie, 2004). These data suggest that they act at the same or at subsequent steps during substrate translocation, but an interaction between these proteins has not been directly shown until now.

Membrane proteins constitute approximately 30% of the proteome in each living organism and play crucial roles in many fundamental cell processes. They are the targets of the majority of available drugs, but due to technical challenges for structural studies the structures of relatively few membranes proteins are known (Kloppmann, Punta, & Rost, 2012; Overington, Al-Lazikani, & Hopkins, 2006). To address this lack of information in the case of VirB8 and VirB6 homologs, we studied the full-length version of the VirB8 homolog TraE and with the VirB6 homolog TraD from plasmid pKM101. Using a combination of crosslinking experiments, multi-angle light scattering (MALS), single particle electron microscopy (EM) and small-angle X-ray scattering (SAXS) we show that the quaternary structure of TraE is very different from that of the previously characterized periplasmic domains of VirB8 homologs. Our data demonstrate that TraE forms a hexamer with a central pore and that it interacts directly with TraD.

## Results

### Expression and purification of full-length VirB8 homologs

Since expression of membrane proteins can be a considerable challenge, we first optimized the conditions for overproduction of N-terminally His-tagged full-length VirB8 homologs from *Brucella suis* (VirB8b), *H. pylori* (CagV) and plasmid pKM101 (TraE) (Fig. 1a). Since expression of TraE resulted in the highest amount of overproduction, we pursued the analysis of this protein and analyzed the efficacy of extraction from the membrane with six different detergents (Fig. 1b). Extraction with octyl glucose neopentyl glycol (OGNG) gave the highest yield and was used for membrane extraction, followed by purification *via* immobilized metal affinity chromatography (IMAC) and size exclusion chromatography (SEC) (Ndongo et al.).

### Crosslinking and SEC-MALS show that full-length TraE forms a high molecular mass complex

In our previous work we have shown that the periplasmic domains of VirB8b and TraE form concentration-dependent dimers and multimer formation can also be monitored by crosslinking (Casu et al., 2016; Paschos, Patey, Sivanesan, Gao, Bayliss, Waksman, O'Callaghan, et al., 2006). To compare the multimeric state of full-length TraE relative to that of its periplasmic domain, we subjected equal amounts of the proteins to cross-linking with varying concentrations of the homo-bifunctional cross-linking agent disuccinimidyl suberate (DSS). The periplasmic domain primarily forms dimers (Fig. 2a), and low amounts of higher-molecular mass multimers are observed at higher protein concentrations (data not shown). In contrast, when the full-length protein is incubated with DSS, dimers as well as higher molecular mass multimers successively form and the monomeric protein diminishes indicating high crosslinking efficacy (Fig. 2b). This result suggests that the quaternary structure of the full-length protein is quite distinct from that of the periplasmic portion. To obtain quantitative information, we further characterized TraE by SEC-MALS analysis enabling us to calculate the absolute molecular masses of the TraE oligomer (207 kDa), of OGNG micelles (41 kDa) (Fig. S1) as well as of the protein-detergent complex (248 kDa) (Fig. 2c). According to the molecular mass derived from MALS analysis,



TraE may form hexamers or heptamers and we next obtained direct insights into the structure of these complexes.

### **Electron microscopy and SAXS analysis suggest that TraE forms hexamers**

To obtain independent evidence for the quaternary structure of TraE we analyzed purified detergent-solubilized TraE by negative stain electron microscopy. We observe uniform ring-like particles of  $\sim 130\text{\AA}$  diameter and the particles apparently have similar orientations (Fig. 3a). Particles were manually picked, extracted, and 2D image analysis was performed. Approximately half of the class averages show featureless rings with varying pore sizes (Fig. S2). The remaining class averages contain regions of density within the rings and we observe six regions of density (Figs. 3b and 3c). These results suggest that TraE forms a hexameric complex, which is consistent with the MALS data. In parallel, detergent-solubilized TraE complexes were characterized by small angle X-ray scattering (SAXS) using inline size exclusion chromatography to ensure the homogeneity of the analyzed sample (Fig. 4a). The molecular weight estimated from the Porod volume ( $MW = V_p/1.6$ ) and the volume of correlation are in the range of 200-225 kDa, which is in accord with the molecular weight calculated by SEC-MALS. The  $R_g$  of TraE in solution is  $44\text{ \AA}$  and the normalized pairwise distance distribution of the curve  $P(R)$  (Fig. 4b) shows a maximum distance ( $D_{\max}$ ) of  $137\text{ \AA}$ . In order to interpret the SAXS results at the molecular level, an *ab initio* model was calculated and we were able to fit the theoretical scattering profile for a rigid body model with the experimental SAXS data (Fig. 4c) with a  $\chi^2$  value of 1.16. Based on the results of cross-linking, MALS and EM analyses we assumed that TraE forms hexamers and this symmetry was applied to reconstruct an *ab initio* protein structure shown in Fig. 4d and Fig. 4e, respectively. Interestingly, the SAXS-based model suggests that a pore exists at the centre of the hexameric complex. This result is consistent with observations made by EM and it has interesting implications for the functional interpretation of these data.

## **TraE and TraD interact and form a high molecular mass complex**

Previous data suggest that VirB6 and VirB8 interact at or close to the translocation pore, but no direct biochemical evidence was available for this notion. To address this question, we overexpressed N-terminally His-tagged TraD (His<sub>6</sub>-TraD) and we also co-expressed His<sub>6</sub>-TraD and non-tagged TraE in *E. coli*, the proteins were extracted from the membrane with detergents and purified by IMAC and SEC. After co-expression and detergent extraction, TraE co-eluted with His<sub>6</sub>-TraD from the IMAC column (data not shown), suggesting that these proteins interact and analysis by SEC shows that they form a complex of approximately 200 kDa (Fig. 5a). To assess whether His<sub>6</sub>-TraD and the His<sub>6</sub>-TraD-TraE complex form multimers similar to TraE, we subjected the proteins to cross-linking with varying concentrations of DSS. We observed that similar to TraE alone (Fig. 2b), His<sub>6</sub>-TraD (Fig. 5b) as well as His<sub>6</sub>-TraD-TraE form higher molecular mass complexes in the presence of DSS (Fig. 5c and 5d). These results show that TraD and TraE interact and form multimers, but analysis by SDS-PAGE and western blotting did not enable us to identify distinct high molecular mass complexes that can be assigned to distinct TraD or TraD-TraE complexes.

## **Electron microscopy confirms that TraD and TraE form a high molecular mass complex**

To obtain additional insights into the structure of the TraD-TraE complex, we conducted negative staining electron microscopy analyses revealing that these proteins form a complex of smaller dimensions as compared to the TraE complex (Fig. 6 and Fig. S3). This result is consistent with the analysis by SEC and the overall asymmetrical shape of this complex (53Å x 103Å) comprising a core body with an elongated extension is quite distinct from the symmetrical hexamer of 130Å diameter formed by TraE alone (Fig. 3a). To corroborate the presence of TraD and TraE in the complex we conducted immuno-EM analysis with TraE-specific antisera, His<sub>6</sub>-specific beads and gold bead-labelled secondary antibodies and negative-staining EM confirms the presence of both proteins in the complex (Fig. S4).

## Discussion

The results presented here provide insights into the structures of integral inner membrane T4SS components for the first time. Until now, VirB8-like proteins were primarily considered as assembly factors and this notion was based on the fact that they interact with many other T4SS components, mostly in a relatively transient fashion. Biochemical work showing these interactions was performed primarily with the purified periplasmic domains of the protein (Casu et al., 2016; Fercher et al., 2016; Paschos, Patey, Sivanesan, Gao, Bayliss, Waksman, O’Callaghan, et al., 2006; Villamil Giraldo et al., 2012; Yuan, Carle, Gao, Sivanesan, Aly, Höppner, et al., 2005), but interactions of full-length VirB8 homologs were also shown using the bacterial and the yeast two-hybrid systems (Andrieux, Bourg, Pirone, O’Callaghan, & Patey, 2011; Bourg et al., 2009; A. Das & Y.-H. Xie, 2000; Patey et al., 2006b; Sivanesan & Baron, 2011a). The fact that the quaternary structure of full-length TraE is very different from that of the periplasmic portion underlines a critical role of the N-terminal transmembrane helix and of the cytoplasmic domain for protein assembly and function. The role of these parts of the protein attracted relatively little attention until now, but studies with the bacterial two-hybrid system showed that they contribute to dimerization (Andrieux et al., 2011; Bourg et al., 2009; Patey et al., 2006b). The fact that purified full-length TraE assembles into a hexamer with a possible pore at the center was unexpected and suggests that the protein also plays a structural role in the T4SS. This notion is consistent with previous observations suggesting that the protein binds the translocated DNA substrate in *Agrobacterium* (E. Cascales & P.J. Christie, 2004).

The exact localization of VirB8-like proteins in T4SS complexes is currently unknown, but the SAXS model proposed here enables us to dock the protein into the available structures obtained by X-ray crystallography and electron microscopy (Chandran et al., 2009; Fronzes, Schafer, et al., 2009; Low et al., 2014a). The dimensions of the SAXS model, combined with knowledge on the localization of TraE at the inner membrane, enable docking into the T4SS structure to the top of the “arch” observed in the structure of the plasmid R388 T4SS<sub>3-10</sub> (Fig. S5) (Low et al., 2014a). Considering the available data on VirB8/TraE protein interactions with VirB4 and VirB6 homologs this localization would be biologically significant and it is consistent with the previously observed VirB8-VirB6-VirB4 co-fractionation (Yuan, Carle, Gao, Sivanesan, Aly,

Höppner, et al., 2005). The hexameric TraE structure may localize on top of VirB4-like proteins that were shown to be present in two copies of hexamers (Fig. S5a) (Low et al., 2014a). The observation of VirB8 hexamers and the docking of two copies on top of VirB4 complexes is also consistent with the experimentally determined stoichiometry of approximately 12.6 VirB8 molecules in the T4SS subcomplex from plasmid R388 T4SS<sub>3-10</sub> (Low et al., 2014a). Previous work in the *Agrobacterium* system showed crosslinking of VirB8 to translocated DNA substrates, which suggested that VirB8 and VirB6 form a functional subcomplex that possibly constitutes the pore of the T4SS (E. Cascales & P.J. Christie, 2004). We here present direct evidence for a complex between VirB8- and VirB6-like proteins supporting the notion that they act together in substrate translocation. The TraE multimer is strikingly similar to the higher molecular mass complex observed in the case of TraM, its homolog from the plasmid R64 conjugation system, and complexes of similar dimensions were also observed in the case of homolog DotI from the *Legionella pneumophila* type IV secretion system (Kuroda et al., 2015). The SAXS and EM results presented here demonstrate that this protein forms a hexamer with a central pore and this discovery has important implications for the mechanism of type IV secretion. In addition, docking of the TraE structure into the centre of the structure of a T3SS (Schraidt & Marlovits, 2011) shows that the hexamer would fit the dimensions of these macromolecular transporters in a similar fashion, even if T3SSs are not evolutionary related and do not contain VirB8 homologs (Fig. S5b).

Based on the available data we propose a model for the assembly of VirB8/TraE-like proteins at the inner membrane of Gram-negative bacteria (Fig. S6). VirB8-like proteins integrate into the inner membrane following the standard protein insertion pathway, followed by dimerization. The available X-ray structures of VirB8 from *Brucella* (Terradot et al., 2005a), *Agrobacterium* (Bailey et al., 2006a) and TraE from pKM101 (Casu et al., 2016) show alternative modes of dimerization. These may reflect alternative conformational states of the protein that assembles into a hexamer, possibly exposing different interfaces for interactions with other T4SS components, e.g. with the pilus components VirB2 and VirB5 and this process may be coordinated via its interaction with VirB4 (Yuan, Carle, Gao, Sivanesan, Aly, Höppner, et al., 2005). The interactions with structural components such as VirB10 (A. Das & Y.-H. Xie, 2000; Sivanesan et al., 2010) may link VirB8 complexes to the central substrate translocation pore that

may be formed by VirB6 (E. Cascales & P.J. Christie, 2004; Villamil Giraldo et al., 2012). The TraD-TraE complex characterized here with biochemical methods and by EM substantiates the notion that these proteins interact, but it is smaller than the TraE hexamer alone. Therefore, the TraD-TraE complex likely represents an intermediate state for the assembly of these proteins at the T4SS core. In future, higher-resolution structural studies of VirB8/TraE and of its complexes with VirB6 homologs and with other proteins, e.g. by X-ray crystallography or cryo-electron microscopy, are required to test this model and to establish the role of the versatile VirB8-like proteins and of their complexes with VirB6 in T4SS assembly and function.

## **Experimental Procedures**

### **Strains, plasmids and DNA manipulation**

The strains and plasmids used are described in Table S1. *Escherichia coli* strains XL-1 Blue or DH5 $\alpha$  were used as hosts for cloning and BL21(DE3)star for VirB8b, CagV, TraD, TraE and TraD-TraE protein overproduction. Qiagen Miniprep kits (Qiagen, UK) were used to isolate plasmid DNA. Standard techniques were employed for the cloning, transformation, preparation and restriction analysis of plasmid DNA from *E. coli* (Yanisch-Perron, Viera, & Messing, 1985).

### **Small scale membrane protein expression and solubilization tests**

For protein overproduction, *E. coli* strain BL21star ( $\lambda$ DE3) carrying expression plasmids was grown under aerobic conditions at 37°C in LB to exponential phase (OD<sub>600</sub> of 0.4–0.8). For VirB8b, CagV and TraE, expression was induced by the addition of 0, 0.1, 0.5 and 1 mM IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside), temperatures at 18, 25, 30 and 37°C and cultures left shaking for 1 hour to 16 hours at 220 rpm. Cells were collected by centrifugation at 13,300 rpm for 10 min at 4°C. Bacterial pellets were suspended in lysis buffer (50 mM HEPES, pH 8.0, 25 % sucrose) containing 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 % Triton X-100, 1 mg/ml lysozyme and one tablet of mini-complete protease inhibitor cocktail (Roche) and kept 1 hour on ice. To separate soluble and insoluble fractions, centrifugation at 13,300 rpm for 30 min at 4°C was done and the

supernatant was used for isolation of the membranes. Proteins in cell lysates were detected by western blotting with an anti-His-tag antiserum (1:5,000 dilution: AM1010a; Abgent). Following ultracentrifugation at 250,000 g for 1 hour at 4°C, total membranes were collected and solubilized for 1.5 hour at 4°C in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 300 mM NaCl, 40 mM imidazole and 1% (w/v) of detergents (decyl maltoside (DM), dodecyl maltoside (DDM), lauryl maltose neopentyl glycol (LMNG), decyl maltose neopentyl glycol (DMNG), octyl glucose neopentyl glycol (OGNG), 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)) with minicomplete protease inhibitor cocktail. This material was then centrifuged for 45 min at 34,500 g and detergent-solubilized proteins in the supernatant were detected by western blotting with an anti-His-tag antiserum (1:5,000 dilution).

### **TraE and TraD-TraE membrane protein expression and purification**

*E. coli* strain BL21star ( $\lambda$ DE3) harboring pHTTraE, pHTTraD, pETDuetTraDTraE were grown in LB supplemented with 50  $\mu$ g/ml kanamycin or 100  $\mu$ g/ml ampicillin only for pETDuetTraDTraE. Overnight pre-cultures in LB were used to inoculate 1 L cultures (37°C) until they reached an OD<sub>600</sub> of 0.4-0.8. Expression was induced by addition of 1 mM IPTG, at 18°C and cultures were left incubated for 16 h. For purification, bacterial cells were harvested, resuspended in binding buffer (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 300 mM NaCl, 40 mM imidazole) with minicomplete protease inhibitor cocktail and DNase I at 100  $\mu$ g/ml, and lysed twice using a One shot cell disrupter (Constant Systems Inc.) at 27 kPsi and 4°C. Debris was removed by centrifugation twice at 15,000 rpm for 30 min at 4°C and the supernatant was retained. Pursuing ultracentrifugation at 250,000 g for 1 hour at 4°C, total membranes were collected and solubilized for 1.5-2 hours at 4°C in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 300 mM NaCl, 40 mM imidazole and 1% (w/v) detergent OGNG with minicomplete protease inhibitor cocktail. This material was then centrifuged for 45 min at 34,500 g to collect OGNG-solubilized TraE or DDM-solubilized TraD and TraD-TraE complex for purification over a HisTrap Ni-chelate column (GE Healthcare) and eluted using a linear 50 ml gradient of 40-500 mM imidazole. For SAXS, EM and biochemical analysis, TraE, TraD and TraD-TraE were further purified by size exclusion chromatography (Ndongo et al.) using a Superdex 200 column (GE Healthcare). TraE and TraD-TraE protein concentrations were determined using molar

extinction coefficients at 280 nm of 35,870 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (with 6x-His-tag) and of 89,270 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (with 6x-His-tag).

### **Protein-detergent complex analysis**

The TraE-OGNG complex was analyzed by SEC-MALS with the use of an ÄKTAmicro system (GE Healthcare) coupled to a Dawn HELEOS II multiple-angle light scattering (MALS) detector and an OptiLab T-rEX online refractive index detector (Wyatt Technology). The absolute molecular mass was calculated by analyzing the scattering data using Wyatt's ASTRA analysis software package version 6.1.6.5 (Wyatt Technology). Protein samples were separated on a Superdex 200 10/300 analytical SEC column (GE Healthcare) with a flow-rate of 0.3 ml/min. Bovine serum albumin was used for calibration. A 0.1 ml sample of TraE at a concentration of 1 mg/ml was injected and eluted in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 300 mM NaCl, 40 mM imidazole, 0.15 % OGNG. The molecular masses of TraE and OGNG were determined by dual detection method implemented in the conjugated analysis mode of the ASTRA analysis software. The refractive index increment of OGNG was calculated using the dn/dc determination method developed by Wyatt (Fig. S1). The refractive index increments of TraE and OGNG used were 0.185 ml.g<sup>-1</sup> and 0.118 ml.g<sup>-1</sup>, respectively. The extinction coefficient of TraE for UV detection at 280 nm was calculated from the amino acid sequence.

### **Analysis of homo-oligomerization of TraE, homo-oligomerization of TraD and hetero-oligomerization of TraD-TraE by crosslinking**

Chemical crosslinking with disuccinimidyl suberate (DSS, Pierce) was performed as described (Yuan, Carle, Gao, Sivanesan, Aly, Hoppner, et al., 2005). The crosslinking product formation for homo-oligomerization of TraE was monitored by SDS-PAGE and staining with Coomassie blue dye. For homo-oligomerization of TraD and hetero-oligomerization of TraD-TraE, the formation of crosslinking products was detected by western blotting with an anti-His-tag antiserum (1:5,000 dilution) to detect His<sub>6</sub>-TraD, and with an anti-TraE antiserum (1:3,000 dilution), respectively.

## Negative stain electron microscopy, image analysis and gold labelling

Parlodion-supported and carbon-coated copper grids (SPI Supplies, USA) were negatively glow-discharged (Leica Microsystems, Canada) before adsorbing 5  $\mu\text{l}$  of SEC-purified sample at 2 ng/ $\mu\text{l}$  for 1 min and stained with 5  $\mu\text{l}$  of freshly prepared 1.5% uranyl formate (Electron Microscopy Sciences, USA) for 1 min. Samples were imaged at room temperature using a FEI Tecnai T12 (Eindhoven, The Netherlands) Transmission Electron Microscope (TEM) equipped with a Tungsten filament and operated at 80 kV. Images were collected at defocus between 2–4  $\mu\text{m}$  on a FEI Eagle 4k x 4k CCD camera at a magnification of  $\sim 67,000\times$ , with pixel size of 1.64  $\text{\AA}$ . For TraE, image processing was performed using the EMAN2 package (Tang et al., 2007). A total of 1,061 particles were picked manually and extracted with 160 x 160 pixel box size. The SPARX software suite was used for particle alignment, K means clustering (reference-free), and multi-reference alignment (Hohn et al., 2007). No symmetry was applied at any point. For analysis of the TraD-TraE complex, image processing and 2D classification was performed using the Scipion and XMIPP software. A total of 84,236 particles were picked automatically and extracted with 60 x 60 pixel box size. For colloidal-gold labeling of the TraD-TraE complex and negative controls (buffer only, bovine serum albumin and ovalbumin), samples were applied for 1 min onto a glow-discharged carbon-coated copper grids. Excess liquid was blotted, and grids were incubated for 30 min at 4°C on a drop of 5 nm Ni-NTA nanogold beads solution (Nanoprobes, USA). Following incubation, grids were washed three times on a drop of ice-cold purification buffer containing 30 nM imidazole and two times on a drop of ice-cold H<sub>2</sub>O. For labeling of TraD, samples were stained for 1 min with 1.5% uranyl formate. For dual labeling, grids were blocked 15 min with ovalbumin before a 1 hour incubation with anti-TraE rabbit antiserum (dilution 1:4000), washed 3 times with PBS-triton and finally blocked a second time with ovalbumin before a 30 min incubation with 10 nm protein A-coupled gold beads (1:50 dilution, Utrecht, The Netherlands). Samples were then negatively stain with 1.5% uranyl formate. Samples were imaged using a FEI Tecnai T12 (Eindhoven, The Netherlands) Transmission Electron Microscope (TEM) operated at an acceleration voltage of 120 kV. Images were collected at defocus between 2–4  $\mu\text{m}$  on a FEI Eagle 4k x 4k CCD camera at a range of magnification between  $\sim 67,000\times$  and  $\sim 1,000,000\times$ .



## Small Angle X-ray Scattering data collection and analysis

An inline SEC-SAXS configuration was used for data collection (Table S2). Protein samples were separated on a Superdex 200 analytical SEC column (GE Healthcare) with a flow-rate of 0.3 ml/min. Sample of 0.5 ml of TraE at a concentration of 1 mg/ml was injected and eluted in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 300 mM NaCl, 40 mM imidazole, 0.15 % OGNG. Scattering data were measured at the beam line G1 of the Biological Small-Angle X-Ray Solution Scattering (BioSAXS) source at the Macromolecular Diffraction at the Cornell High Energy Synchrotron Source (MacCHESS, Ithaca, USA). Data were collected on a dual Pilatus 100K-S SAXS/WAXS detector at a wavelength of 1.245 Å, covering a scattering vector range ( $q = 4\pi\sin\theta/\lambda$ ) from 0.008 to 0.8 Å<sup>-1</sup>. Data were analyzed, integrated and averaged with RAW software package version 1.0.1 (Nielsen et al., 2009). Buffer blanks were averaged and subtracted from the data. A linear Guinier fit plot was calculated using the RAW software. Guinier analysis and radius of gyration (R<sub>g</sub>) estimation were performed in Primus and confirmed by automatic analysis using AutoRG (Konarev, Volkov, Sokolova, Koch, & Svergun, 2003). The largest dimension of the molecule,  $D_{\max}$ , and the Porod volume were calculated using GNOM (Svergun, 1992). The pair distribution function P(R) and forward scattering  $I(0)$  were computed with AutoGNOM (Petoukhov, Konarev, Kikhney, & Svergun, 2007) and compared with those determined in Primusqt (Konarev et al., 2003). GASBOR (Svergun, Petoukhov, & Koch, 2001) was used to reconstruct an *ab initio* protein structure by a chain-like ensemble of dummy residues and a P6 symmetry was applied. Structural figures were prepared using PyMOL (*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1*, Schrödinger, LLC) and UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004). To fit the SAXS envelope with X-ray and EM structures, MultiFit add-on from UCSF Chimera was used (Lasker, Topf, Sali, & Wolfson, 2009) and finally a manual orientation of the X-ray structure was done. Data have been deposited in the Small Angle Scattering Biological Databank ([www.sasbdb.org](http://www.sasbdb.org), SASDB#75)

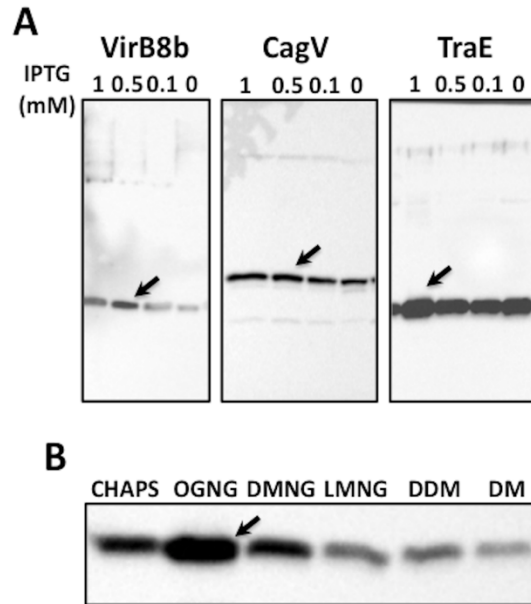
## Data sharing plan

On request, all the original data will be made available after publication.

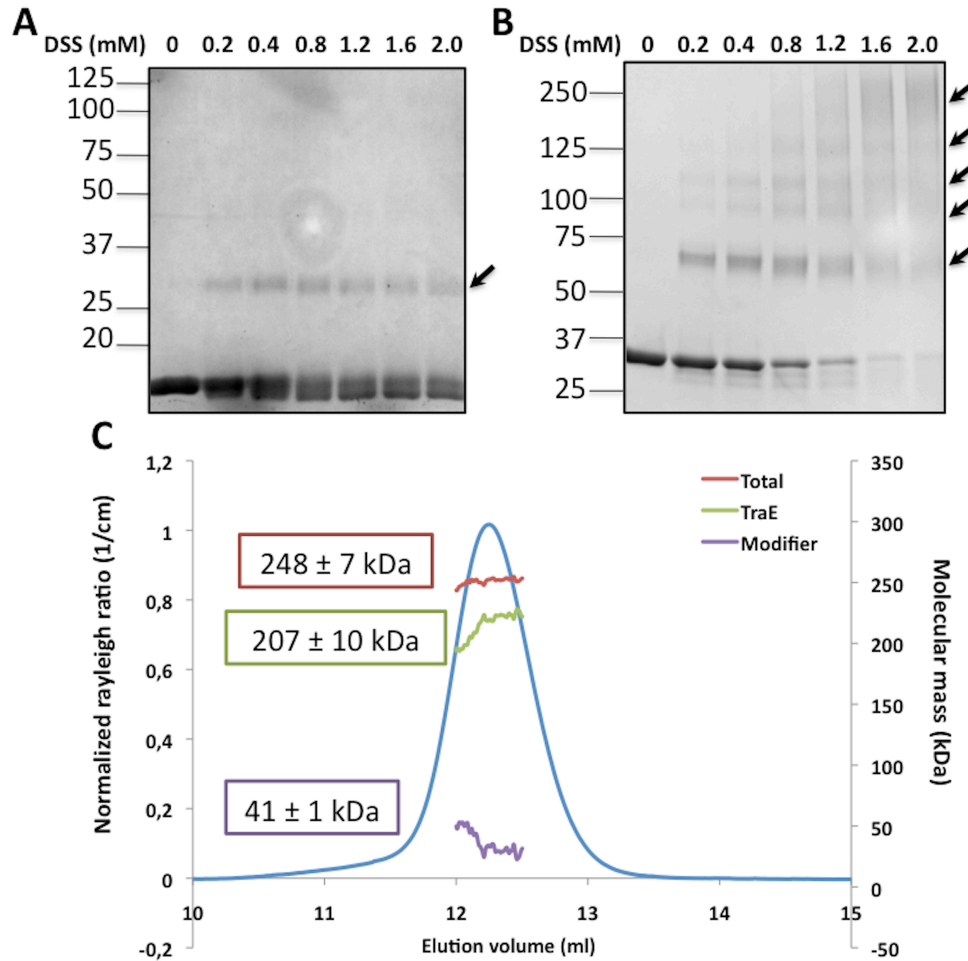
## **Acknowledgements**

This work was supported by grants to C.B. from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR MOP-84239) and to A.N. (CIHR MOP-110972), the NSERC-CREATE program on the Cellular Dynamics of Macromolecular Complexes (CDMC), the Groupe d'études des protéines membranaires (GÉPROM), the Canada Foundation for Innovation (CFI) and the Fonds de recherche du Québec-Santé (FRQ-S). The authors would like to thank Jurgen Sygusch (Université de Montréal) for discussions on SAXS analysis, Jesse Hopkins and Richard Gillian (CHESS, Cornell, USA) for assistance with the SAXS measurements and Joaquin Ortega (McGill University, Canada) for advice on single-particle EM analysis. Synchrotron SAXS data were collected at MacCHESS beamline G1. CHESS is supported by the NSF & NIH/NIGMS via NSF award DMR-1332208, and the MacCHESS resource is supported by NIH/NIGMS award GM-103485.

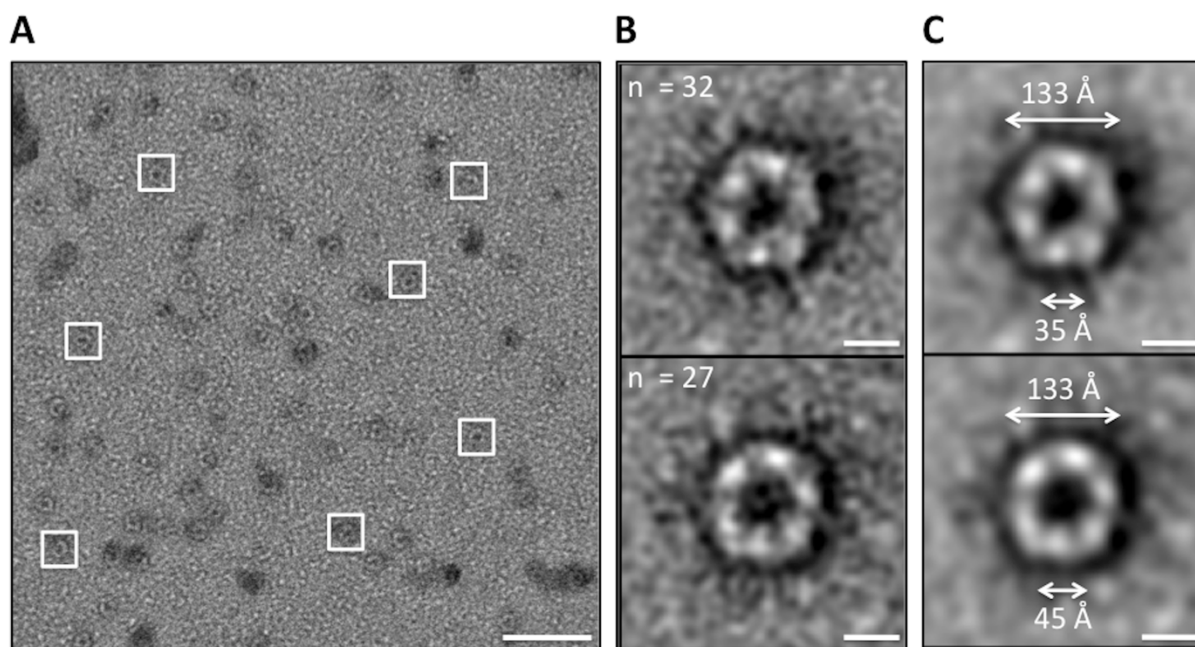
## Figures and figure legends



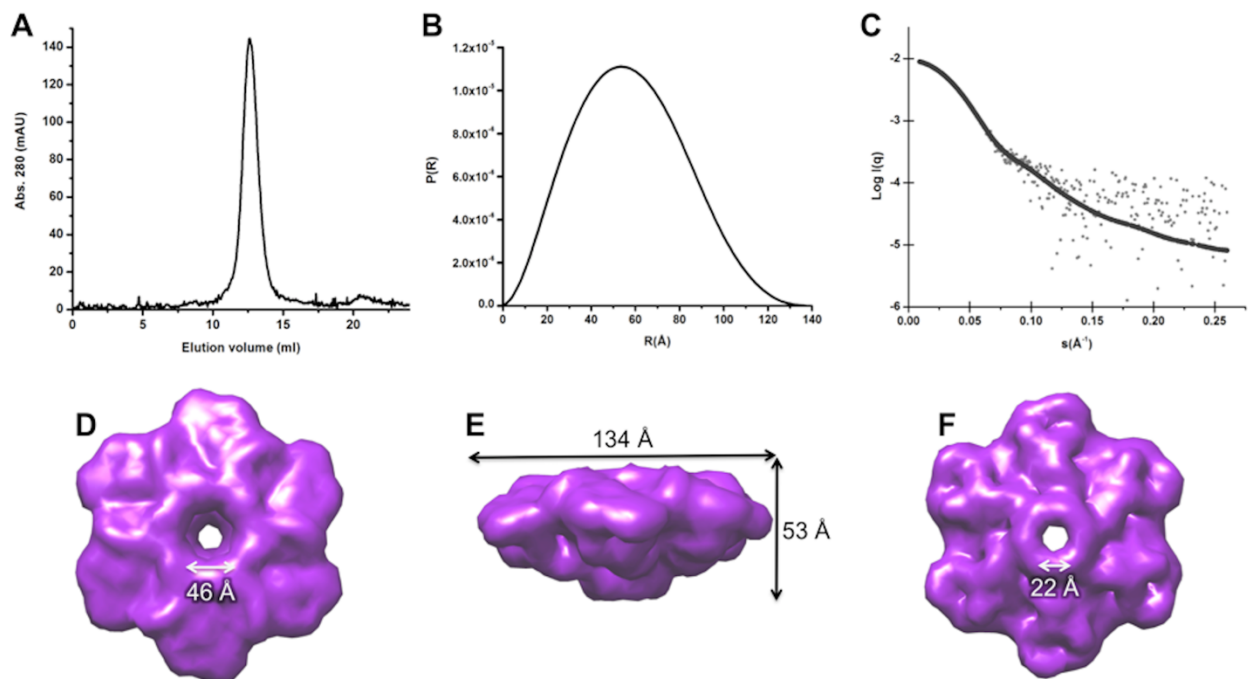
**Fig. 4.1. Overexpression and detergent solubilization of VirB8-like full length proteins.** (a) Western blot analysis with a His-tag-specific antiserum to test the overexpression of VirB8-like proteins using the indicated concentrations of the expression inducer IPTG: *Brucella* (VirB8b; 30°C, 6 h), *Helicobacter* (CagV; 30°C, 6 h) and pKM101 (TraE; 18°C, 16 h). (b) Western blot analysis with a His-tag-specific antiserum to test the solubilization of TraE in several detergents (decyl maltoside (DM), dodecyl maltoside (DDM), decyl maltose neopentyl glycol (DMNG), lauryl maltose neopentyl glycol (LMNG), octyl glucose neopentyl glycol (OGNG), 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)). Arrows indicate optimal conditions.



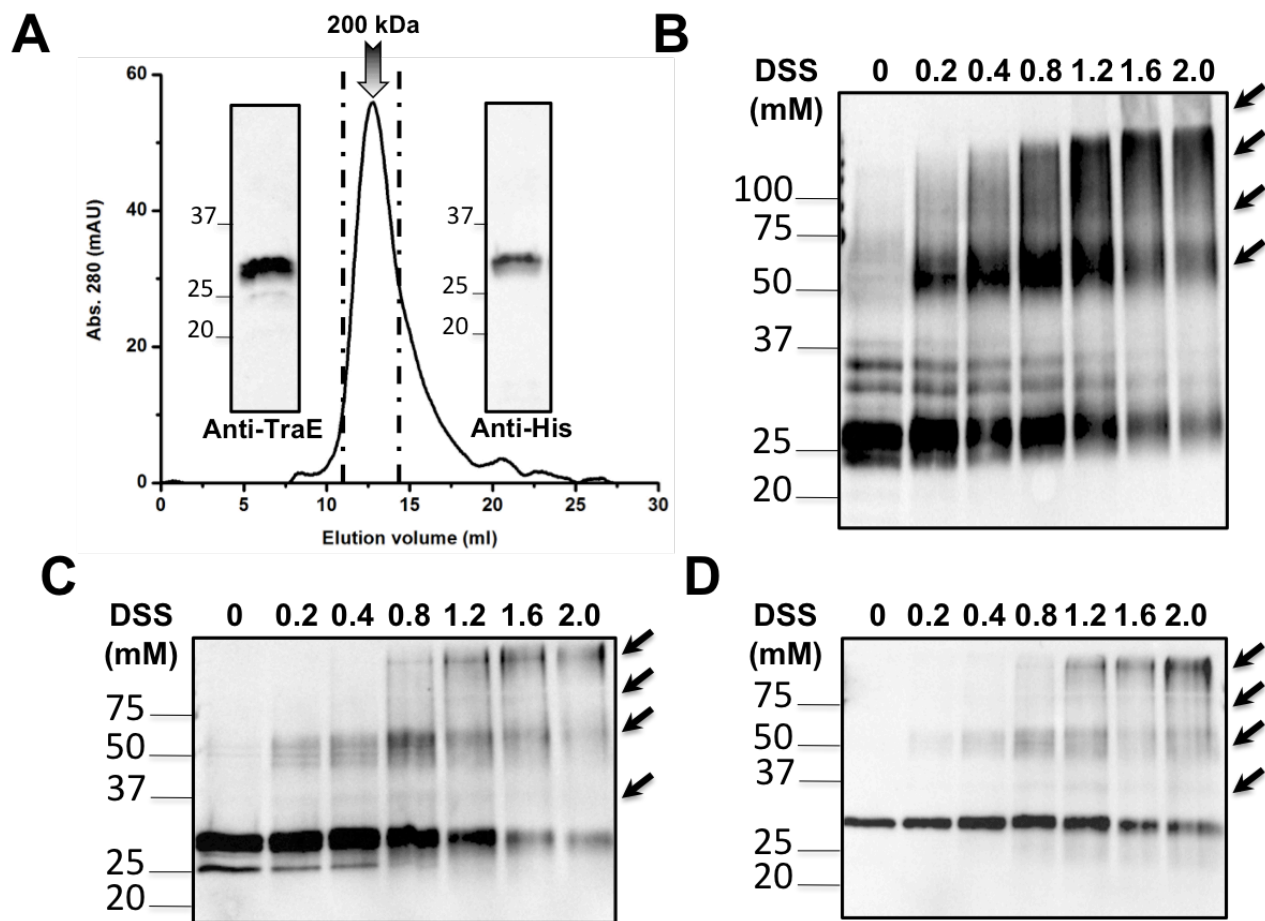
**Fig. 4.2. Analysis of the oligomerization state of TraE.** SDS-PAGE analysis of the purified periplasmic domain of TraE at 1 mg/ml (*a*) and of purified full-length TraE at 1 mg/ml (*b*) in the absence (0 mM) and in the presence of increasing concentrations of the cross-linking agent DSS (0.2 mM to 2 mM). Proteins in the gels were stained with Coomassie blue dye and arrows indicate higher-molecular-weight complexes formed after cross-linking. (*c*) Elution profile of the TraE oligomer is shown with the molecular weight estimated by MALS. The molar masses corresponding to the total complex, the TraE oligomer and the modifier (detergent micelle) throughout the elution peaks are shown.



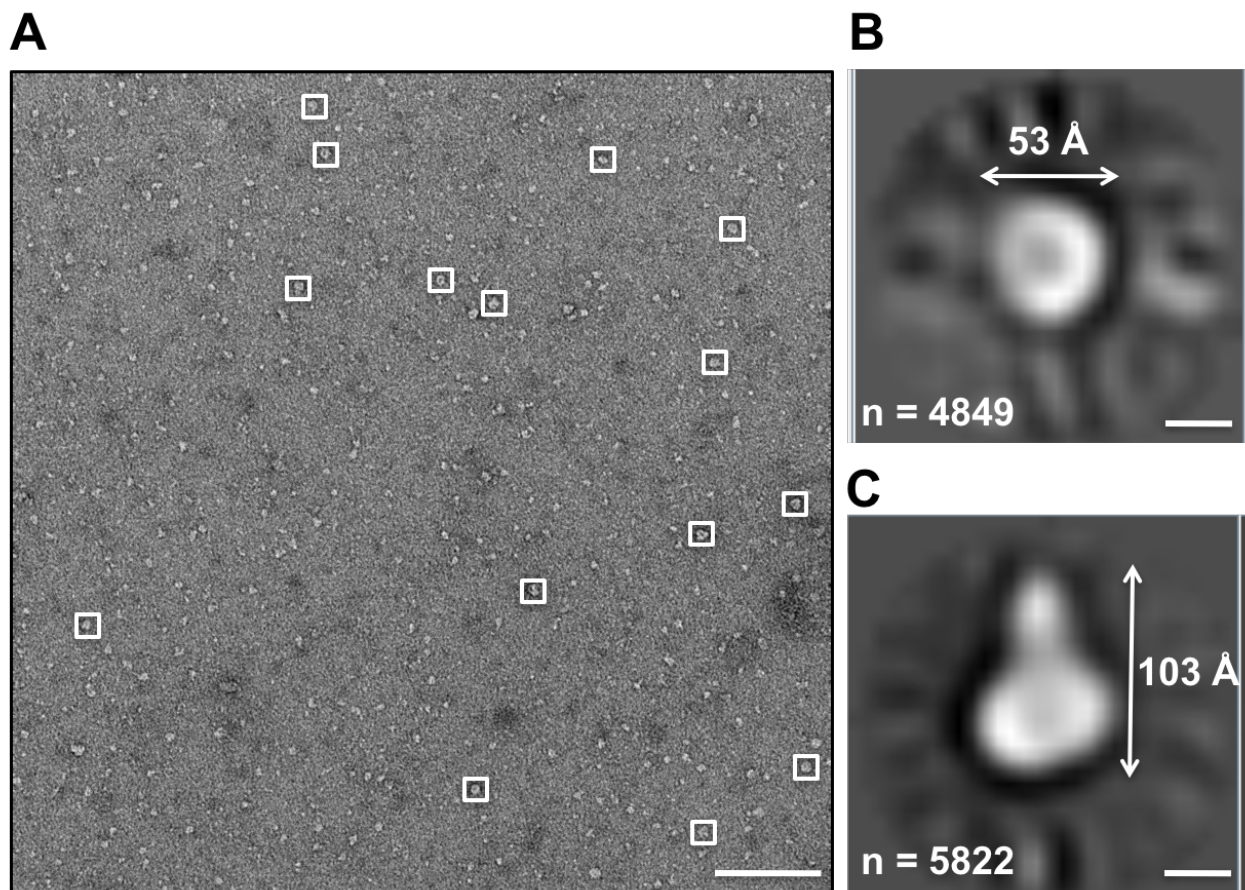
**Fig. 4.3. EM analysis of the TraE structure.** (a) A typical negative stain micrograph of the TraE complex showing uniform particles of  $\sim 130$  Å; scale bar 500 Å. (b) Representative 2D class averages following alignment, reference-free clustering, and multi-reference alignment of 1061 particles. Numbers of particles used for generating each average are shown in upper left corner of panels; scale bar 50 Å. (c) Projections of TraE structures after a low-pass filter at 15 Å and the approximate dimensions are illustrated; scale bar 50 Å.



**Fig. 4.4. SEC-SAXS analysis of TraE.** (a) SEC profile of TraE sample used for the inline SAXS experiment. (b) Normalized pair distribution functions  $P(R)$  calculated automatically with AutoGNOM. (c) Fit of the theoretical scattering profile for the rigid body model (grey plot) with the experimental SAXS data (black line). (d) Top view, (e) side view and (f) down view of the average molecular envelope calculated for TraE (SASDB#75). The approximate envelope dimensions are illustrated.



**Fig. 4.5 Size exclusion chromatography and cross-linking analysis of TraD and of the TraD-TraE complex.** (a) SEC profile of the TraD-TraE complex showing an apparent molecular mass of 200 kDa. SDS-PAGE and western-blot analysis of the SEC peak fraction with TraE-specific antiserum and with His-tag-specific antiserum to detect N-terminally His-tagged TraD (His<sub>6</sub>-TraD). (b) Purified His<sub>6</sub>-TraD was incubated with varying concentrations of DSS and crosslinking products were detected after SDS-PAGE and western blotting with His-tag-specific antiserum; (c) purified His<sub>6</sub>-TraD-TraE complex was incubated with varying concentrations of DSS and crosslinking products were detected after SDS-PAGE and western blotting with antiserum specific for His<sub>6</sub>-TraD; (d) purified His<sub>6</sub>-Tra-TraE complex was incubated with varying concentrations of DSS and crosslinking products were detected after SDS-PAGE and western blotting with TraE-specific antiserum. Arrows indicate higher-molecular-weight complexes formed after cross-linking.



**Fig. 4.6. EM analysis of the TraD-TraE structure.** (a) A typical negative stain micrograph of the TraD-TraE complex showing uniform particles with dimensions of  $\sim 60$  Å and  $\sim 100$  Å, respectively; scale bar 500 Å. (b) Representative 2D class averages following alignment, reference-free clustering, and multi-reference alignment of 84,236 particles. Numbers of particles used for generating each average are shown in bottom left corner of panels and the approximate dimensions are illustrated; scale bar 30 Å.



## **Chapitre 5 : Discussion et conclusion**

Le but général de cette thèse était d'explorer et de comprendre des questions non-résolues au sujet des bases moléculaires des T4SSs en utilisant une approche expérimentale pluridisciplinaire intégrant de la biologie structurale, de la biochimie et de la biologie chimique. Pour cela, ma recherche a été focalisée sur un des composants essentiels du cœur central des T4SSs, les protéines VirB8, et plus précisément sur la protéine TraE qui est un homologue des protéines VirB8 provenant du plasmide pKM101. Au cours des chapitres précédents, nos études ont fourni des indications précieuses sur plusieurs fronts, notamment au sujet de la structure, de la fonction et de l'inhibition de TraE, mais aussi au sujet de la caractérisation structurale de la forme entière de TraE et de TraE en complexe avec TraD, une protéine homologue de VirB6 provenant du pKM101. Dans ce dernier chapitre, dans la perspective d'évoquer une vue d'ensemble, les différents éléments de ma thèse sont passés en revue et les questions en suspens sont abordées.

### **5.1 Caractérisation structurale de la forme périplasmique de TraE**

Les protéines de type VirB8 sont des composants essentiels des T4SSs et dans la littérature, l'hypothèse principale au sujet de la fonction de ces protéines est qu'elles effectuent une série d'interactions protéine-protéine transitoires contribuant à l'assemblage du T4SS (Berger & Christie, 1994b; Bourg et al., 2009; A. Das & Y. H. Xie, 2000; Fercher et al., 2016; Kumar & Das, 2001a; Paschos, Patey, Sivanesan, Gao, Bayliss, Waksman, O'Callaghan, et al., 2006; Sharifahmadian, Nlend, et al., 2017; Sivanesan & Baron, 2011b; Villamil Giraldo et al., 2012; Yuan, Carle, Gao, Sivanesan, Aly, Hoppner, et al., 2005). Bien que les identités de séquence entre les homologues des protéines VirB8 soient comprises entre 20 et 40%, le repliement protéique global, comprenant cinq hélices alphas d'un côté de la protéine et quatre feuillets bêtas du côté opposé, est bien conservé et la détermination structurale de TraE a confirmé cela (Fig. 37) (Bailey et al., 2006b; Gillespie, Phan, Scheib, Subramanian, Edwards,

Lehman, Piitulainen, Rahman, et al., 2015; Terradot et al., 2005b). Dans certains cas, en raison de la forte divergence de leur séquence primaire, les homologues de VirB8 n'ont été trouvés que lors de leurs analyses structurales, ceci suggérant une forte sélection du point de vue de l'évolution pour conserver la topologie générale de la protéine avec une spécificité fonctionnelle émergeant à une date ultérieure (Goessweiner-Mohr et al., 2013; Kuroda et al., 2015; Porter et al., 2012). Ces données sont cohérentes avec l'hypothèse initiale selon laquelle VirB8 est un facteur d'assemblage basé sur sa similitude avec un facteur de transfert nucléaire (NTF-2) (Terradot et al., 2005b). Des approches par cristallographie aux rayons X et par RMN ont montré que les protéines de type VirB8 les plus étudiées, provenant d'*A. tumefaciens* et de *B. suis*, forment des dimères (Bailey et al., 2006b; Sharifahmadian, Arya, et al., 2017; Terradot et al., 2005b) (Fig. 33, p52). Cependant, des homologues des protéines VirB8 provenant des bactéries à Gram-positifs telles que la protéine TcpC, provenant de *Clostridium*, et la protéine TraM, provenant d'*Enterococcus*, ont cristallisé en tant que trimères, suggérant une plasticité structurale significative en ce qui concerne la multimérisation des protéines de type VirB8 (Fig. 34, p52-53) (Goessweiner-Mohr et al., 2013; Porter et al., 2012). Alors que TraE a cristallisé elle aussi sous forme de dimère, il a été montré que la disposition spatiale des deux sous-unités était clairement distincte de celle obtenue pour ses homologues les plus proches VirB8 provenant d'*Agrobacterium tumefaciens* et VirB8 provenant de *Brucella suis* (Fig. 5, Chapitre 2, p96). La signification biologique du site de dimérisation a été vérifiée par l'analyse, *in vitro* et *in vivo*, de plusieurs constructions de variants des résidus E97, Q105, K168 et Y214, impliqués au niveau de liaisons hydrogènes retrouvées dans cette interface, suggérant que des orientations spatiales différentes sont biologiquement significatives même dans le cas d'homologues de VirB8 étroitement apparentés (Fig. 7, Chapitre 2, p97) (Paschos, Patey, Sivanesan, Gao, Bayliss, Waksman, O'Callaghan, et al., 2006; Sharifahmadian, Arya, et al., 2017; Sivanesan & Baron, 2011b).

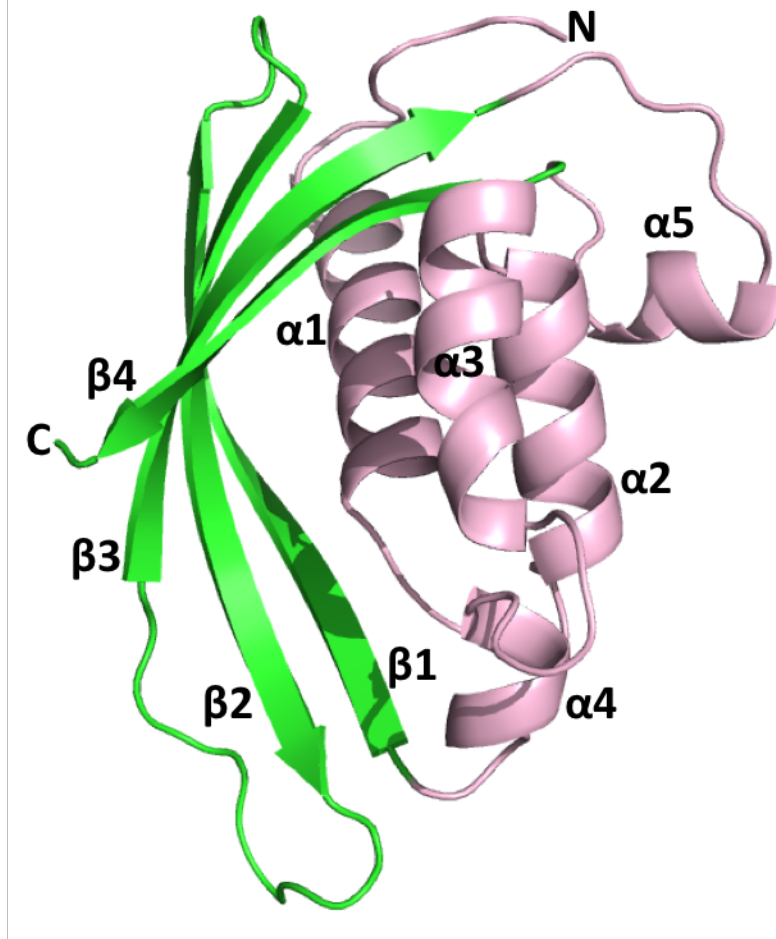


Figure 36. Représentation en ruban de la structure obtenue par cristallographie aux rayons X, du domaine périplasmique de la protéine TraE provenant du pKM101 (PDB code : 5I97). En rose sont représentées les hélices alphas et en vert sont montrés les feuillets bêtas.

## 5.2 Les protéines de type VirB8 participent à l'assemblage des T4SSs

Le fait que le repliement des protéines VirB8 soit si hautement conservé souligne l'importance de cette famille de protéines en tant que facteur d'assemblage. Plusieurs études ont montré que VirB8 effectue de multiples interactions, notamment avec les protéines VirB6 et VirB10 faisant elles aussi partie du cœur central des T4SSs, mais jusqu'à présent, seules des données limitées étaient disponibles au sujet des bases moléculaires de ces interactions (A. Das & Y. H. Xie, 2000; Kumar et al., 2000b; Paschos, Patey, Sivanesan, Gao, Bayliss, Waksman, O'Callaghan, et al., 2006; Sharifahmadian, Nlend, et al., 2017; Sivanesan & Baron, 2011b; Villamil Giraldo et al., 2012; Yuan, Carle, Gao, Sivanesan, Aly, Hoppner, et al., 2005). Considérant la petite taille du domaine périplasmique, environ 18 kDa, il est probable que les interactions avec les protéines VirB8 soient transitoires, ce qui est cohérent avec la force des interactions précédemment mesurée dans la gamme des hauts nanomolaires jusqu'aux micromolaires (Sivanesan & Baron, 2011b; Villamil Giraldo et al., 2012). Néanmoins, la spécificité est importante en ce qui concerne l'ordre de l'assemblage des T4SSs et une étude sur les protéines de type VirB8, provenant des espèces *Bartonella* et *Rickettsia*, a suggéré que les barrières structurales ainsi que l'expression différentielle empêchent les interactions non productives entre plusieurs paralogues de VirB8 dans ces organismes (Gillespie, Phan, Scheib, Subramanian, Edwards, Lehman, Piitulainen, Rahman, et al., 2015). Alors que les interactions non productives ne sont pas pertinentes dans le cas des protéines VirB8 provenant de différentes bactéries, le haut degré d'interactions entre les homologues de VirB8 provenant d'*Agrobacterium*, de *Brucella*, du pKM101 et d'*H. pylori* observé par des expériences de BTH, de réticulation et de SPR était inattendu notamment du fait du faible pourcentage d'identité de séquence, 14%, pour CagV, l'homologue provenant d'*H. pylori* (Fig. 1A, 2 et 3, Chapitre 2, p92-94). En plus de la formation d'homomultimère et d'hétéromultimère entre les différents homologues de VirB8, nous avons observé, par des expériences de BTH, une liaison hétérologue avec les protéines de type VirB10, provenant d'*A. tumefaciens* et *B. suis*, indiquant un haut degré de plasticité au niveau des interactions de VirB8 relevant du repliement protéique conservé (Fig. 1B, Chapitre 2, p92). Dans le futur, il sera intéressant de tester les interactions avec des homologues de VirB8 provenant de bactéries à Gram-positifs, telles que TcpC ou TraM, pour

déterminer si la plasticité des interactions s'étend aux homologues formant des trimères. La liaison entre les protéines de type VirB8 dans le test BTH n'implique pas nécessairement une complémentation fonctionnelle dans le contexte biologique naturel dans lequel d'autres interactions protéine-protéine supplémentaires sont susceptibles d'être importantes. Par exemple, malgré le fait que TraJ, provenant du plasmide pSB201, partage 50% d'identité de séquence et se lie à VirB8 provenant de *Brucella* dans le test BTH, la complémentation avec la protéine complète n'était pas possible (Bourg et al., 2009; G. Patey, Z. Qi, G. Bourg, C. Baron, & D. O'Callaghan, 2006a). De même, il a été montré que VirB8 provenant de *B. suis*, ne complémente pas un variant d'une souche délétée du gène *virB8* provenant d'*A. tumefaciens* (résultats non publiés). Le domaine périplasmique de TraJ peut compléter dans une moindre mesure lorsqu'il est fusionné au domaine N-terminal de VirB8 provenant de *B. suis*, mais l'expression de TraJ ou d'une protéine de fusion TraJ-VirB8 provenant de *B. suis* a inhibé la virulence. Ceci est probablement dû à une forte liaison avec VirB8 provenant de *B. suis*, ce qui suggère que les formes dimériques ainsi que les formes monomériques libres sont fonctionnellement importantes.

### **5.3 Développement et optimisation d'inhibiteurs ciblant les protéines VirB8**

Le rôle biologique du creux hydrophobe, situé entre le feuillet bêta et les hélices alphas présentes au niveau de l'interface de dimérisation, a fait l'objet de débats et il a été supposé qu'il pourrait s'agir d'un site d'interaction protéine-protéine (Terradot et al., 2005b). Actuellement, il n'y a aucune évidence pour cette notion, mais il a été découvert par la suite que ce creux hydrophobe est le site de liaison pour des petites molécules organiques inhibant la dimérisation de VirB8 provenant de *B. suis* (Paschos et al., 2011; Smith et al., 2012). Au départ, ce résultat était contre-intuitif car l'interface de dimérisation est du côté opposé au site de liaison (Fig. 38). Cependant, la substitution des acides aminés impliqués au niveau du site de liaison de ces inhibiteurs a réduit à la fois la force d'inhibition mais aussi la dimérisation, suggérant que les changements conformationnels au niveau de ce creux hydrophobe peuvent affecter la dimérisation. Une analyse, réalisée par RMN, a montré des changements conformationnels

significatifs entre l'état monomérique et dimérique qui sont compatibles avec cette notion (Sharifahmadian, Arya, et al., 2017). Dans le chapitre 2 de cette thèse, nous avons tout d'abord sondé TraE avec les petites molécules inhibant VirB8 provenant de *B. suis* ainsi que des dérivés de la molécule B8I-2, étant la molécule inhibant le plus fortement VirB8 provenant de *B. suis*, qui ont été synthétisés pour améliorer la force d'interaction au niveau des résidus retrouvés dans le creux hydrophobe (Fig. 39) (Smith et al., 2012). En utilisant des expériences *in vitro* d'extinction de fluorescence intrinsèque, il a été montré que les inhibiteurs de VirB8 provenant de *B. suis* et les composés nouvellement synthétisés se liaient à TraE avec des affinités dans la gamme du micromolaire malgré les différences apparentes au niveau du creux de liaison hydrophobe dans les deux protéines (Table 2, Chapitre 2, p85). De plus, l'arrimage moléculaire *in silico* a suggéré que presque toutes les petites molécules se lient dans un creux hydrophobe équivalent à celui déjà identifié chez VirB8 provenant de *B. suis* (Fig. 8C, Chapitre 2, p99). Il est intéressant de noter que la molécule BAR-072 apparaît être la plus liante, avec une valeur de  $K_D$  de 2,7 micromolaires et l'arrimage moléculaire a prédit que cette molécule lierait quatre acides aminés alors que la molécule B8I-2 n'en lierait que trois ce qui pourrait expliquer la différence au niveau des valeurs de  $K_D$  (Figure. 8A et B, Chapitre 2, p99). Également, la molécule BAR-072 a un effet significatif sur la fonction du T4SS provenant du pKM101 conduisant à une réduction de dix fois du transfert du pKM101 entre les bactéries (Fig. 11, Chapitre 2, p. 102). En outre, la molécule UM-024, qui était faiblement active contre VirB8 provenant de *B. suis*, a inhibé significativement la conjugaison du pKM101, tandis que l'inhibiteur de VirB8 provenant de *B. suis* le plus puissant, B8I-2, n'a pas eu d'effet sur la conjugaison du pKM101, suggérant que des différences dans les sites de liaison de l'inhibiteur pourraient être exploitées dans le futur pour la conception de molécules spécifiques. Le faible degré de corrélation entre les valeurs de  $K_D$  et les effets sur le transfert du pKM101, sauf pour la molécule BAR-072, suggère la présence d'un site de liaison supplémentaire ou des variations dans la capacité des molécules à traverser l'enveloppe cellulaire. Néanmoins, l'atténuation observée de la conjugaison plasmidique suggère pour la première fois que l'inhibition du transfert plasmidique est possible en ciblant un composant spécifique d'un système de sécrétion. Nos résultats évoquent également que le creux hydrophobe ciblé par les inhibiteurs de VirB8 provenant de *B. suis* peut convenir comme cible pour les inhibiteurs de TraE, ouvrant vers un

nouveau paradigme lorsque l'on travaille sur la découverte d'inhibiteurs ciblant les protéines de type VirB8 dans une grande variété de pathogènes.



Figure 37. Représentation en ruban de la structure, obtenue par cristallographie aux rayons X, du domaine périplasmique de la protéine VirB8 provenant de *B. suis* formant un dimère (PDB code : 4AKY). Les résidus clés pour l'inhibition de VirB8 provenant de *B. suis* par B8I-1/2 sont représentés en rouges (E115 et K182) et les résidus ayant une moindre importance sont en jaunes (R114, Y229 et L151). Le site de dimérisation avec son résidu critique, la M102, est indiqué en vert. L'hélice alpha reliant le site de liaison à l'inhibiteur et le site de dimérisation est marquée en bleu. Image adaptée de (Smith et al., 2012).

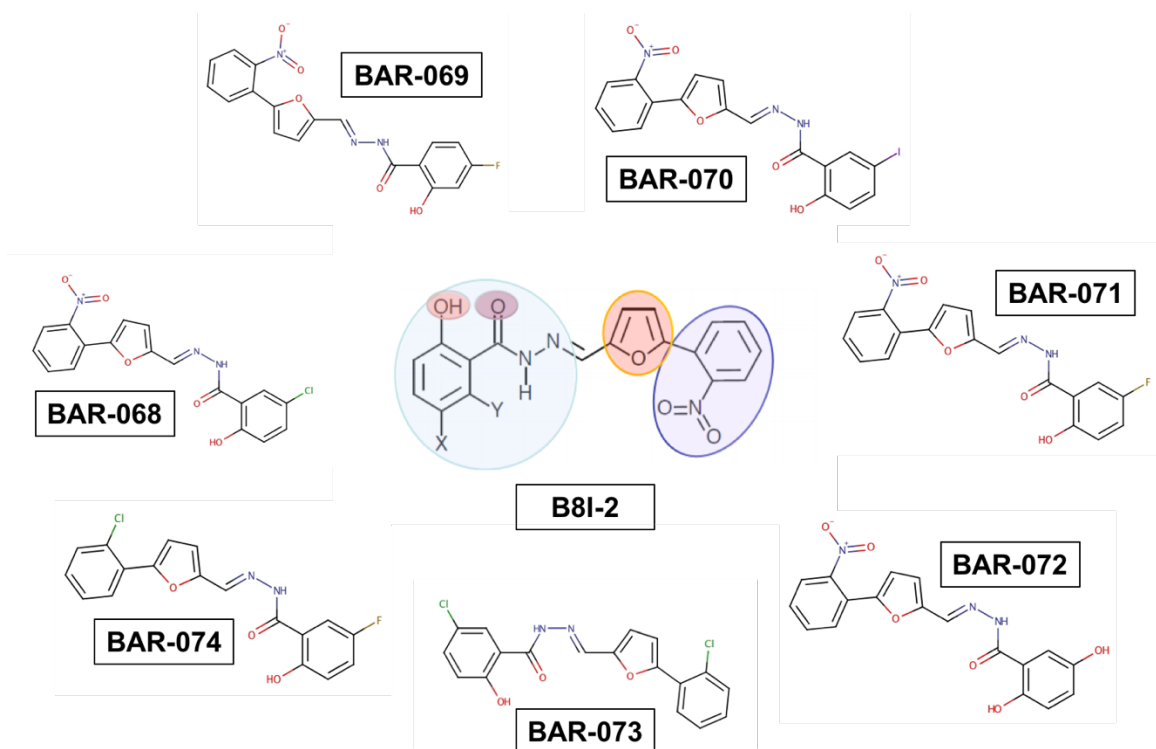


Figure 38. Structures chimiques de la petite molécule organique B8I-2, étant la molécule inhibant le plus fortement VirB8 provenant de *B. suis*, encerclée par des analogues de cette molécule dénommés BAR-068 à BAR-074. Les dérivés BAR ont été synthétisés en ajoutant des fonctions chimiques du type alcool et/ou halogènes, aux positions X et Y représentées sur la formule de la petite molécule organique B8I-2, pour essayer à la fois d'améliorer la force d'inhibition de ces molécules mais aussi leurs solubilités.

Dans le chapitre numéro 3 de cette thèse, pour remédier à l'augmentation croissante de la résistance aux antimicrobiens, une stratégie basée sur l'étude structurale de TraE pour identifier des inhibiteurs de la conjugaison bactérienne médiée par les T4SSs a été développée. Une approche par DSF a tout d'abord été utilisée pour cribler une banque composée de plusieurs centaines de fragments. Cette approche a comme avantage majeur de pouvoir être réalisée dans la plupart des laboratoires de biologie moléculaire du fait qu'elle utilise un instrument de RT-PCR couramment disponible et ne nécessite pas d'équipement spécialisé pour le criblage à haut



débit. En utilisant cette approche, nous avons confirmé que le creux hydrophobe précédemment identifié dans le chapitre 2 est en effet une cible prometteuse lorsque l'on veut créer des inhibiteurs de la conjugaison bactérienne. De plus, malgré des efforts répétés au sein de l'équipe du Docteur Christian Baron, il n'a été possible d'obtenir qu'une seule structure cristallographique d'un complexe entre VirB8 provenant de *B. suis* et une molécule inhibitrice appelée B8I-1 (Fig. 35, Chapitre 1, p.56) (Sharifahmadian, Arya, et al., 2017; Smith et al., 2012). Toutes les autres données de liaison des molécules les plus biologiquement actives, notamment la molécule B8I-2 et ses dérivés, avec VirB8 provenant de *B. suis* et TraE ont été obtenues par arrimage moléculaire, une approche *in silico* qui apparaît être de plus en plus fiable de nos jours, mais qui ne peut remplacer les informations obtenues par des techniques de biologie structurale. Pour cette raison, il a été très important de confirmer par cristallographie aux rayons X que des fragments identifiés par DSF, plus précisément les fragments 4H10 et 1E6, peuvent se lier au creux hydrophobe précédemment identifié. À notre grande surprise, il a été démontré que le fragment 1E6 se lie également à un site alternatif se trouvant proche de l'interface de dimérisation retrouvée dans la structure cristallographique de TraE (Fig. 2B, Chapitre 3, p. 121). La découverte de ce nouveau site de liaison peut ouvrir des possibilités supplémentaires lorsque l'on veut créer des petites molécules organiques inhibant les fonctions des protéines de type VirB8. Puisque nous avons prouvé que les fragments 4H10 et 1E6 se lient de manière adjacente au niveau du creux de surface hydrophobe, il a été conçu une série de petites molécules organiques qui représentent essentiellement une fusion de ces deux fragments (Fig. D, E et F, Chapitre 3, p. 121). De manière intéressante, nous avons montré que les molécules 105055 et 239852, nouvellement conçues, se lient aux deux sites de liaisons qui ont été identifiés suite au criblage de fragments (Fig. 3, Chapitre 3, p. 123). En outre, il est important de noter que ces deux petites molécules organiques inhibent à la fois la dimérisation de TraE de manière *in vitro* mais aussi affectent, *in vivo*, le transfert du plasmide de conjugaison le pKM101 (Fig. 4, Chapitre 3, p. 124). Le niveau d'inhibition est relativement modeste mais il est augmenté en combinant les deux molécules et en y ajoutant également l'inhibiteur BAR-072 précédemment identifié. Ce travail constitue une étape clé pour la conception de nouveaux inhibiteurs de la conjugaison plus puissants, basés sur les nouvelles entités chimiques que nous avons identifiées. De plus, nos données démontrent l'existence de deux sites de liaison sur TraE pouvant être exploités dans le futur pour créer des médicaments. Il sera également intéressant d'évaluer si

ces deux sites peuvent être retrouvés lors d'une approche basée sur l'étude structurale d'autres protéines de type VirB8, par exemple provenant de *B. suis* ou de la bactérie pathogène de l'humain *H. pylori*, par l'intermédiaire d'un criblage de fragments, pour identifier des inhibiteurs de leurs fonctions respectives. La stratégie validée dans ce chapitre est applicable aux protéines de type VirB8 provenant de T4SS de bactéries pathogènes pour lesquelles des informations structurales et fonctionnelles sont disponibles (Bailey et al., 2006b; Gillespie, Phan, Scheib, Subramanian, Edwards, Lehman, Piitulainen, Rahman, et al., 2015; Goessweiner-Mohr et al., 2013; Terradot et al., 2005b). Non seulement, l'application n'est pas limitée aux composants des T4SSs et cette approche pourrait être plus largement appliquée à tout autre composant des systèmes de conjugaison ou facteurs de virulence pour lesquels des informations structurales à haute résolution sont disponibles. La disponibilité d'une cible définie et d'informations structurales sont deux caractéristiques cruciales lors de la conception de médicaments basée sur la structure visant à améliorer les résultats identifiés par le criblage. En l'absence de telles informations, il sera probablement plus difficile de faire progresser le développement d'inhibiteurs et des futurs médicaments. C'était le cas pour les inhibiteurs du T3SS où il a fallu de nombreuses années pour identifier à la fois les cibles ainsi que les sites de liaisons des inhibiteurs (D. Wang et al., 2011; Zambelloni et al., 2015). Pour finir, la stratégie présentée dans ce chapitre peut être appliquée à une grande variété de facteurs de virulence et a le potentiel de contribuer au développement de médicaments qui réduisent le transfert de gènes de résistance aux antibiotiques et la virulence bactérienne.

## **5.4 Caractérisation structurale de la forme entière de TraE**

Dans le chapitre numéro 4 de cette thèse, pour pallier au peu d'information disponible sur les composants du T4SS liés à la membrane interne des bactéries, une caractérisation structurale de la forme entière de TraE et de TraE en complexe avec TraD, une protéine homologue de VirB6 provenant du pKM101, a été présentée. Jusqu'à présent, comme déjà discuté dans la partie 5.1 de ce chapitre, les protéines de type VirB8 étaient généralement considérées comme des facteurs d'assemblage et cette notion était basée sur le fait qu'elles interagissaient avec de nombreux autres composants des T4SSs, la plupart du temps de manière

relativement transitoire. Des travaux biochimiques montrant ces interactions ont été réalisés principalement avec les domaines purifiés, dans leurs formes périplasmiques, et aussi, dans leurs formes entières, par des études de BTH ou de double hybride chez la levure (Andrieux et al., 2011; A. Das & Y. H. Xie, 2000; Fercher et al., 2016; Paschos, Patey, Sivanesan, Gao, Bayliss, Waksman, O'Callaghan, et al., 2006; Sivanesan & Baron, 2011b; Villamil Giraldo et al., 2012; Yuan, Carle, Gao, Sivanesan, Aly, Hoppner, et al., 2005). Le fait que la structure quaternaire de TraE dans sa forme entière soit très différente de celle de la partie périplasmique souligne le rôle critique de l'hélice transmembranaire et du domaine cytoplasmique, retrouvés au niveau de la partie N-terminale de la protéine, pour à la fois l'assemblage et la fonction de la protéine. Jusqu'à présent, le rôle de ces parties de la protéine a attiré relativement peu d'attention et des études de BTH ont montré qu'elles contribuent à la dimérisation (Andrieux et al., 2011; Bourg et al., 2009; Patey et al., 2006a). Le fait que TraE purifiée dans sa forme entière forme un hexamère avec un possible pore au centre était inattendu et suggère que la protéine joue un rôle structural dans le T4SS (Fig. 3 et 4, Chapitre 4, p. 152-153). Cette notion est cohérente d'une part avec les observations précédemment décrites dans la littérature suggérant que la protéine se lie à l'ADN-T chez *Agrobacterium* et d'autre part par des données préliminaires de réticulation, que j'ai obtenu récemment, évoquant une interaction potentielle entre TraE et de l'ADN (Figure 40) (E. Cascales & P. J. Christie, 2004b). La localisation exacte des protéines de type VirB8 dans le complexe du T4SS est actuellement inconnue. Les dimensions du modèle SAXS combinées aux connaissances sur la localisation de TraE au niveau de la membrane interne, nous a permis un arrimage de ce modèle dans le T4SS<sub>3-10</sub> provenant du plasmide R388 au sommet de la partie appelée « arch » (Figure S5, Annexe 2, p. xiii) (Low et al., 2014b). Considérant les données disponibles sur les interactions des protéines VirB8 avec les homologues VirB4 et VirB6, cette localisation serait biologiquement significative et elle est cohérente avec le co-fractionnement entre VirB4, VirB6 et VirB8 précédemment observé (Yuan, Carle, Gao, Sivanesan, Aly, Hoppner, et al., 2005). Le complexe hexamérique de TraE pourrait se localiser au-dessus des protéines de type VirB4 qui se sont avérées être présentes dans deux copies d'hexamères (Figure S5A, Annexe 2, p. xiii) (Low et al., 2014b). Les observations des hexamères de VirB8 et l'arrimage de deux copies au-dessus des complexes VirB4 est également compatible avec la stœchiométrie déterminée expérimentalement d'environ 12,6 molécules de VirB8 dans le T4SS<sub>3-10</sub> (Low et al., 2014b). Des travaux antérieurs

chez *Agrobacterium* ont montré une réticulation de VirB8 à de l'ADN-T, ce qui suggère que VirB8 et VirB6 forment un sous-complexe fonctionnel qui constitue éventuellement le pore du T4SS (E. Cascales & P. J. Christie, 2004b). Dans notre étude, nous avons présenté des preuves directes de la formation d'un complexe entre les protéines de type VirB6 et VirB8 soutenant la notion qu'elles agissent ensemble dans la translocation du substrat. Le multimère formé par TraE est remarquablement similaire au complexe observé dans le cas de TraM, qui est son homologue chez le plasmide de conjugaison R64, et des complexes de dimensions similaires ont également été observés pour l'homologue DotI du T4BSS provenant de *L. pneumophila* (Kuroda et al., 2015). Les résultats de SAXS et de microscopie électronique ont démontré que TraE forme un hexamère avec un pore central et cette découverte a des implications importantes pour le mécanisme du T4SS. En outre, l'arrimage de la structure de TraE au centre de la structure du T3SS a montré que l'hexamère correspondrait aux mêmes dimensions que ces transporteurs macromoléculaires, même si les T3SSs ne sont pas directement liés du point de vue de l'évolution avec les T4SSs et qu'ils ne contiennent pas de protéine de type VirB8 (Figure S5B, Annexe 2, p. xiii) (Schraidt & Marlovits, 2011). Sur la base des données obtenues, un modèle décrivant l'assemblage des protéines VirB8/TraE a été proposé (Figure S6, Annexe 2, p. xiv). À propos de ce modèle, les protéines de type VirB8 s'intégreraient tout d'abord au niveau de la membrane interne en suivant la voie d'insertion des protéines standards puis subiraient une dimérisation. Les structures obtenues par cristallographie aux rayons X de VirB8 provenant de *B. suis*, d'*Agrobacterium* et de TraE provenant du pKM101 ont montré deux modes alternatifs de dimérisation (Bailey et al., 2006b; Terradot et al., 2005b). Ceux-ci pouvant refléter d'autres états conformationnels de la protéine qui s'assemble en un hexamère, exposant éventuellement différentes interfaces pour effectuer des interactions avec d'autres composants des T4SSs, par exemple avec les composants du pilus VirB2 et VirB5 et ce processus sera probablement coordonné par l'intermédiaire de son interaction avec VirB4 (Yuan, Carle, Gao, Sivanesan, Aly, Hoppner, et al., 2005). De plus, dans la littérature il est décrit que les interactions avec d'autres composants structuraux des T4SSs telles que VirB10 pourraient être liées avec les complexes formés par les protéines de type VirB8 au niveau du pore de translocation central pouvant être formé par les protéines de type VirB6 (E. Cascales & P. J. Christie, 2004b; A. Das & Y. H. Xie, 2000; Sivanesan et al., 2010; Villamil Giraldo et al., 2012). Dans notre étude, le complexe TraD-TraE/VirB6-VirB8 a été caractérisé avec des méthodes biochimiques et confirmé par

microscopie électronique confirmant la notion que ces protéines interagissent, cependant le complexe formé est plus petit que l'hexamère de TraE seul. Par conséquent, il a été évoqué que le complexe TraD-TraE représenterait probablement un état intermédiaire concernant l'assemblage de ces protéines au niveau du cœur central des T4SSs. Dans le futur, des études structurales à haute résolution, réalisées par cristallographie aux rayons X ou cryo-EM, des protéines de type VirB8 dans leurs formes entières, des complexes formés avec les protéines de type VirB6 et d'autres protéines des T4SSs seront nécessaires pour tester ce modèle et établir le rôle exact des protéines de type VirB8 et de leurs complexes formés avec VirB6 au niveau de l'assemblage et la fonction des T4SSs.

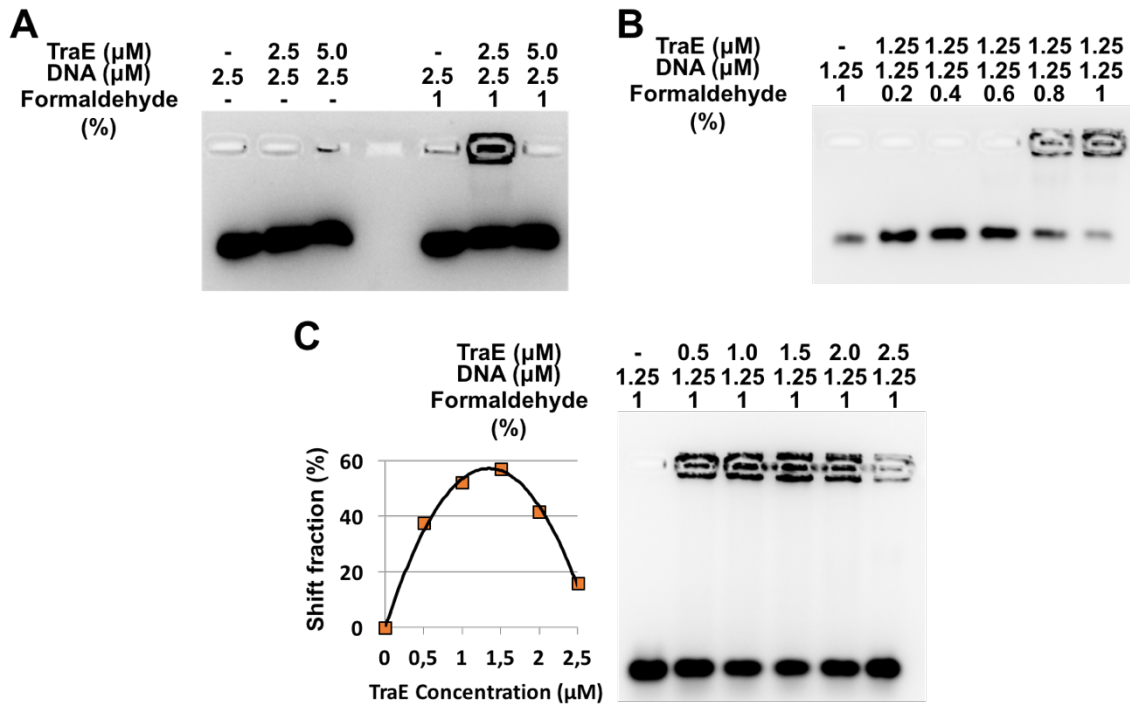


Figure 39. Analyse de la réticulation du complexe formé par TraE en pleine longueur avec de l'ADN double brin. (A) His<sub>6</sub>-TraE et l'ADN double brins, marqué en 5' à la fluorescéine, dans des ratios 1:1 et 2:1, ont été incubés sans ou avec 1% de formaldéhyde et les produits de réticulations ont été détectés après gel d'agarose et en suivant la fluorescence émise par la fluorescéine. (B) His<sub>6</sub>-TraE et l'ADN double brins, marqué en 5' à la fluorescéine, dans un ratio 1:1, ont été incubés avec différentes concentrations de formaldéhyde et les produits de réticulations ont été détectés après gel d'agarose et en suivant la fluorescence émise par la fluorescéine. (C) His<sub>6</sub>-TraE et l'ADN double brins, marqué en 5' à la fluorescéine, dans différents ratios, ont été incubés avec 1% de formaldéhyde et les produits de réticulations ont été détectés après gel d'agarose et en suivant la fluorescence émise par la fluorescéine. Sur la partie gauche de ce panel, il est représenté un graphique correspondant au pourcentage de l'intensité relative du produit du retard sur gel en fonction de la concentration de TraE.

## **Conclusion**

Le but général de ce projet de thèse était de réaliser une caractérisation biochimique, structurale ainsi que d'inhiber le T4SS en nous focalisant sur les protéines de type VirB8 et plus particulièrement sur la protéine TraE provenant du pKM101. Ces protéines de type VirB8, étant un des composants essentiels du cœur central des T4SSs, continuent d'attirer l'attention sur leur capacité à être impliquées dans une série d'interactions protéine-protéine transitoires contribuant à l'assemblage du T4SS. Notre étude a été focalisée sur une approche expérimentale pluridisciplinaire intégrant de la biologie structurale, de la biochimie et de la biologie chimique visant à comprendre les bases moléculaires des T4SSs. Il reste encore beaucoup à explorer, et espérons-le, les résultats apportés par notre étude seront pertinents concernant les recherches liées aux protéines de type VirB8 et plus généralement au T4SS.

## Bibliographie :

- Abby, S. S., Cury, J., Guglielmini, J., Neron, B., Touchon, M., & Rocha, E. P. (2016). Identification of protein secretion systems in bacterial genomes. *Sci Rep*, 6, 23080. doi:10.1038/srep23080
- Abdallah, A. M., Bestebroer, J., Savage, N. D., de Punder, K., van Zon, M., Wilson, L., . . . Peters, P. J. (2011). Mycobacterial secretion systems ESX-1 and ESX-5 play distinct roles in host cell death and inflammasome activation. *J Immunol*, 187(9), 4744-4753. doi:10.4049/jimmunol.1101457
- Abrusci, P., McDowell, M. A., Lea, S. M., & Johnson, S. (2014). Building a secreting nanomachine: a structural overview of the T3SS. *Curr Opin Struct Biol*, 25, 111-117. doi:10.1016/j.sbi.2013.11.001
- Adams, P. D., Grosse-Kunstleve, R. W., Hung, L. W., Ioerger, T. R., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., . . . Terwilliger, T. C. (2002). PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 58(Pt 11), 1948-1954. doi:S0907444902016657 [pii]
- Adcox, H. E., Vasicek, E. M., Dwivedi, V., Hoang, K. V., Turner, J., & Gunn, J. S. (2016). Salmonella Extracellular Matrix Components Influence Biofilm Formation and Gallbladder Colonization. *Infect Immun*, 84(11), 3243-3251. doi:10.1128/IAI.00532-16
- Aguilar, J., Cameron, T. A., Zupan, J., & Zambryski, P. (2011). Membrane and core periplasmic *Agrobacterium tumefaciens* virulence Type IV secretion system components localize to multiple sites around the bacterial perimeter during lateral attachment to plant cells. *MBio*, 2(6), e00218-00211. doi:10.1128/mBio.00218-11  
e00218-11 [pii]  
mBio.00218-11 [pii]
- Aguilar, J., Zupan, J., Cameron, T. A., & Zambryski, P. C. (2010). *Agrobacterium* type IV secretion system and its substrates form helical arrays around the circumference of virulence-induced cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(8), 3758-3763. doi:0914940107 [pii]  
10.1073/pnas.0914940107
- Alvarez-Martinez, C. E., & Christie, P. J. (2009). Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev*, 73(4), 775-808. doi:10.1128/MMBR.00023-09
- Aly, K. A., & Baron, C. (2007). The VirB5 protein localizes to the T-pilus tips in *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiology*, 153(Pt 11), 3766-3775. doi:10.1099/mic.0.2007/010462-0
- Andrieux, L., Bourg, G., Pirone, A., O'Callaghan, D., & Patey, G. (2011). A single amino acid change in the transmembrane domain of the VirB8 protein affects dimerization, interaction with VirB10 and *Brucella suis* virulence. *FEBS Lett*, 585(15), 2431-2436. doi:10.1016/j.febslet.2011.07.004
- Arutyunov, D., & Frost, L. S. (2013). F conjugation: back to the beginning. *Plasmid*, 70(1), 18-32. doi:10.1016/j.plasmid.2013.03.010
- Atmakuri, K., Cascales, E., & Christie, P. J. (2004). Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Mol Microbiol*, 54(5), 1199-1211. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04345.x



- Atmakuri, K., Ding, Z., & Christie, P. J. (2003). VirE2, a type IV secretion substrate, interacts with the VirD4 transfer protein at cell poles of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Microbiol*, *49*(6), 1699-1713.
- Austin, J. W., Sanders, G., Kay, W. W., & Collinson, S. K. (1998). Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett*, *162*(2), 295-301.
- Bailey, S., Ward, D., Middleton, R., Grossmann, J. G., & Zambryski, P. (2006a). *Agrobacterium tumefaciens* VirB8 structure reveals potential protein-protein interactions sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, *103*, 2582-2587.
- Bailey, S., Ward, D., Middleton, R., Grossmann, J. G., & Zambryski, P. C. (2006b). *Agrobacterium tumefaciens* VirB8 structure reveals potential protein-protein interaction sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(8), 2582-2587. doi:10.1073/pnas.0511216103
- Balakrishnan, L., Hughes, C., & Koronakis, V. (2001). Substrate-triggered recruitment of the TolC channel-tunnel during type I export of hemolysin by *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, *313*(3), 501-510. doi:10.1006/jmbi.2001.5038
- Baron, C. (2005). From bioremediation to biowarfare: on the impact and mechanism of type IV secretion systems. *FEMS Microbiol Lett*, *253*(2), 163-170. doi:10.1016/j.femsle.2005.09.030
- Baron, C. (2006a). VirB8: A conserved type IV secretion system assembly factor and drug target. *Biochem. Cell Biol.*, *84*, 890-899.
- Baron, C. (2006b). VirB8: a conserved type IV secretion system assembly factor and drug target. *Biochem Cell Biol*, *84*(6), 890-899. doi:10.1139/o06-148
- Baron, C. (2010). Antivirulence drugs to target bacterial secretion systems. *Curr Opin Microbiol*, *13*(1), 100-105. doi:S1369-5274(09)00182-9 [pii] 10.1016/j.mib.2009.12.003
- Baron, C., Llosa, M., Zhou, S., & Zambryski, P. C. (1997). VirB1, a component of the T-complex transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*, is processed to a C-terminal secreted product, VirB1. *J Bacteriol*, *179*(4), 1203-1210.
- Baron, C., Thorstenson, Y. R., & Zambryski, P. C. (1997). The lipoprotein VirB7 interacts with VirB9 in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, *179*(4), 1211-1218.
- Bayer, M., Eferl, R., Zellnig, G., Teferle, K., Dijkstra, A., Koraimann, G., & Hogenauer, G. (1995). Gene 19 of plasmid R1 is required for both efficient conjugative DNA transfer and bacteriophage R17 infection. *J Bacteriol*, *177*(15), 4279-4288.
- Bayliss, R., Harris, R., Coutte, L., Monier, A., Fronzes, R., Christie, P. J., . . . Waksman, G. (2007). NMR structure of a complex between the VirB9/VirB7 interaction domains of the pKM101 type IV secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(5), 1673-1678. doi:10.1073/pnas.0609535104
- Beckham, K. S., Ciccarelli, L., Bunduc, C. M., Mertens, H. D., Ummels, R., Lugmayr, W., . . . Houben, E. N. (2017). Structure of the mycobacterial ESX-5 type VII secretion system membrane complex by single-particle analysis. *Nat Microbiol*, *2*, 17047. doi:10.1038/nmicrobiol.2017.47
- Berger, B. R., & Christie, P. J. (1993). The *Agrobacterium tumefaciens* virB4 gene product is an essential virulence protein requiring an intact nucleoside triphosphate-binding domain. *J Bacteriol*, *175*(6), 1723-1734.

- Berger, B. R., & Christie, P. J. (1994a). Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* *virB* operon: *virB2* through *virB11* are essential virulence genes. *J Bacteriol.*, *176*, 3646-3660.
- Berger, B. R., & Christie, P. J. (1994b). Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* *virB* operon: *virB2* through *virB11* are essential virulence genes. *J Bacteriol*, *176*(12), 3646-3660.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., . . . Allaoui, A. (2001). Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretion. *Mol Microbiol*, *39*(3), 652-663.
- Bourg, G., Sube, R., O'Callaghan, D., & Patey, G. (2009). Interactions between *Brucella suis* VirB8 and its homolog TraJ from the plasmid pSB102 underline the dynamic nature of type IV secretion systems. *J Bacteriol*, *191*(9), 2985-2992. doi:10.1128/JB.01426-08
- Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y., & Attree, I. (2009). Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics*, *10*, 104. doi:10.1186/1471-2164-10-104
- Brown, E. D., & Wright, G. D. (2016). Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*, *529*(7586), 336-343. doi:10.1038/nature17042
- Buhrdorf, R., Forster, C., Haas, R., & Fischer, W. (2003). Topological analysis of a putative *virB8* homologue essential for the *cag* type IV secretion system in *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol*, *293*(2-3), 213-217. doi:10.1078/1438-4221-00260
- Burkinshaw, B. J., & Strynadka, N. C. (2014). Assembly and structure of the T3SS. *Biochim Biophys Acta*, *1843*(8), 1649-1663. doi:10.1016/j.bbamer.2014.01.035
- Burns, D. L. (2003). Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol*, *6*(1), 29-34.
- Busch, A., & Waksman, G. (2012). Chaperone-usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *367*(1592), 1112-1122. doi:10.1098/rstb.2011.0206
- Buttner, D. (2012). Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, *76*(2), 262-310. doi:10.1128/MMBR.05017-11
- Cao, T. B., & Saier, M. H., Jr. (2001). Conjugal type IV macromolecular transfer systems of Gram-negative bacteria: organismal distribution, structural constraints and evolutionary conclusions. *Microbiology*, *147*(Pt 12), 3201-3214. doi:10.1099/00221287-147-12-3201
- Cascales, E., Atmakuri, K., Sarkar, M. K., & Christie, P. J. (2013). DNA substrate-induced activation of the *Agrobacterium* VirB/VirD4 type IV secretion system. *J Bacteriol*, *195*(11), 2691-2704. doi:10.1128/JB.00114-13
- Cascales, E., & Christie, P. J. (2003). The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol*, *1*(2), 137-149. doi:10.1038/nrmicro753
- Cascales, E., & Christie, P. J. (2004a). *Agrobacterium* VirB10, an ATP energy sensor required for type IV secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(49), 17228-17233. doi:10.1073/pnas.0405843101
- Cascales, E., & Christie, P. J. (2004b). Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science*, *304*(5674), 1170-1173. doi:10.1126/science.1095211

- Cascales, E., & Christie, P. J. (2004). Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science*, *304*, 1170-1173.
- Casu, B., Smart, J. P., Hancock, M. A., Smith, M., Sygusch, J., & Baron, C. (2016). Structural analysis and inhibition of TraE from the pKM101 type IV secretion system. *J Biol. Chem.*, *291*, 23817-23829.
- Chaillan-Huntington, C., Butler, P. J., Huntington, J. A., Akin, D., Feldherr, C., & Stewart, M. (2001). NTF2 monomer-dimer equilibrium. *J Mol Biol*, *314*(3), 465-477. doi:10.1006/jmbi.2001.5136
- Chandran Darbari, V., & Waksman, G. (2015). Structural Biology of Bacterial Type IV Secretion Systems. *Annu Rev Biochem*, *84*, 603-629. doi:10.1146/annurev-biochem-062911-102821
- Chandran, V., Fronzes, R., Duquerroy, S., Cronin, N., Navaza, J., & Waksman, G. (2009). Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature*, *462*(7276), 1011-1015. doi:10.1038/nature08588
- Chang, Y., Shaffer, C. L., Rettberg, L. A., Ghosal, D., & Jensen, G. J. (2017). In vivo structures of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. *bioRxiv 195685*. Retrieved from <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2017/09/28/195685.full.pdf>
- Choong, F. X., Back, M., Fahlen, S., Johansson, L. B., Melican, K., Rhen, M., . . . Richter-Dahlfors, A. (2016). Real-time optotracing of curli and cellulose in live *Salmonella* biofilms using luminescent oligothiophenes. *NPJ Biofilms Microbiomes*, *2*, 16024. doi:10.1038/npjbiofilms.2016.24
- Christie, P. J. (2001). Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol Microbiol*, *40*(2), 294-305.
- Christie, P. J. (2004). Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim Biophys Acta*, *1694*(1-3), 219-234. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.02.013
- Christie, P. J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S., & Cascales, E. (2005). Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol*, *59*, 451-485. doi:10.1146/annurev.micro.58.030603.123630
- Christie, P. J., & Cascales, E. (2005). Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review). *Mol Membr Biol*, *22*(1-2), 51-61.
- Christie, P. J., & Vogel, J. P. (2000). Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol*, *8*(8), 354-360.
- Christie, P. J., Whitaker, N., & Gonzalez-Rivera, C. (2014). Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochim Biophys Acta*, *1843*(8), 1578-1591. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.12.019
- Cianfanelli, F. R., Monlezun, L., & Coulthurst, S. J. (2016). Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. *Trends Microbiol*, *24*(1), 51-62. doi:10.1016/j.tim.2015.10.005
- Clarke, M., Maddera, L., Harris, R. L., & Silverman, P. M. (2008). F-pili dynamics by live-cell imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(46), 17978-17981. doi:10.1073/pnas.0806786105
- Clemens, D. L., Ge, P., Lee, B. Y., Horwitz, M. A., & Zhou, Z. H. (2015). Atomic structure of T6SS reveals interlaced array essential to function. *Cell*, *160*(5), 940-951. doi:10.1016/j.cell.2015.02.005
- Cornelis, G. R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol*, *4*(11), 811-825. doi:10.1038/nrmicro1526

- Cornelis, G. R., & Van Gijsegem, F. (2000). Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol*, *54*, 735-774. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.735
- Costa, T. R., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M., & Waksman, G. (2015). Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol*, *13*(6), 343-359. doi:10.1038/nrmicro3456
- Das, A., & Xie, Y.-H. (2000). The *Agrobacterium* T-DNA transport pore proteins VirB8, VirB9 and VirB10 interact with one another. *J. Bacteriol.*, *182*, 758-763.
- Das, A., & Xie, Y. H. (1998). Construction of transposon Tn3phoA: its application in defining the membrane topology of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer proteins. *Mol Microbiol*, *27*(2), 405-414.
- Das, A., & Xie, Y. H. (2000). The *Agrobacterium* T-DNA transport pore proteins VirB8, VirB9, and VirB10 interact with one another. *J Bacteriol*, *182*(3), 758-763.
- de la Cruz, F., Frost, L. S., Meyer, R. J., & Zechner, E. L. (2010). Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, *34*(1), 18-40. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00195.x
- Deng, W., Marshall, N. C., Rowland, J. L., McCoy, J. M., Worrall, L. J., Santos, A. S., . . . Finlay, B. B. (2017). Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nat Rev Microbiol*, *15*(6), 323-337. doi:10.1038/nrmicro.2017.20
- Desvaux, M., Hebraud, M., Talon, R., & Henderson, I. R. (2009). Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol*, *17*(4), 139-145. doi:10.1016/j.tim.2009.01.004
- Ding, Z., Zhao, Z., Jakubowski, S. J., Krishnamohan, A., Margolin, W., & Christie, P. J. (2002). A novel cytology-based, two-hybrid screen for bacteria applied to protein-protein interaction studies of a type IV secretion system. *J Bacteriol*, *184*(20), 5572-5582.
- Du, D., Wang, Z., James, N. R., Voss, J. E., Klimont, E., Ohene-Agyei, T., . . . Luisi, B. F. (2014). Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature*, *509*(7501), 512-515. doi:10.1038/nature13205
- Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lai, E. M., Lurz, R., Kado, C. I., & Lanka, E. (1999). Conjugative pili of IncP plasmids, and the Ti plasmid T pilus are composed of cyclic subunits. *J Biol Chem*, *274*(32), 22548-22555.
- Ellis, R. J. (2001). Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci*, *26*(10), 597-604.
- Fercher, C., Probst, I., Kohler, V., Goessweiner-Mohr, N., Arends, K., Grohmann, E., . . . Keller, W. (2016). VirB8-like protein TraH is crucial for DNA transfer in *Enterococcus faecalis*. *Sci Rep*, *6*, 24643. doi:10.1038/srep24643
- Fernandez, D., Dang, T. A., Spudich, G. M., Zhou, X. R., Berger, B. R., & Christie, P. J. (1996). 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*, *178*(11), 3156-3167.
- Fernandez, D., Spudich, G. M., Zhou, X. R., & Christie, P. J. (1996). The *Agrobacterium tumefaciens* VirB7 lipoprotein is required for stabilization of VirB proteins during assembly of the T-complex transport apparatus. *J Bacteriol*, *178*(11), 3168-3176.
- Fernandez-Leiro, R., & Scheres, S. H. (2016). Unravelling biological macromolecules with cryo-electron microscopy. *Nature*, *537*(7620), 339-346. doi:10.1038/nature19948
- Frick-Cheng, A. E., Pyburn, T. M., Voss, B. J., McDonald, W. H., Ohi, M. D., & Cover, T. L. (2016). Molecular and Structural Analysis of the *Helicobacter pylori* cag Type IV

- Secretion System Core Complex. *MBio*, 7(1), e02001-02015. doi:10.1128/mBio.02001-15
- Fronzes, R., Christie, P. J., & Waksman, G. (2009). The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol*, 7(10), 703-714. doi:10.1038/nrmicro2218
- Fronzes, R., Schafer, E., Wang, L., Saibil, H. R., Orlova, E. V., & Waksman, G. (2009). Structure of a type IV secretion system core complex. *Science*, 323(5911), 266-268. doi:10.1126/science.1166101
- Frost, L. S., & Koraimann, G. (2010). Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *Future Microbiol*, 5(7), 1057-1071. doi:10.2217/fmb.10.70
- Fullner, K. J., Lara, J. C., & Nester, E. W. (1996). Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science*, 273(5278), 1107-1109.
- Fullner, K. J., Stephens, K. M., & Nester, E. W. (1994). An essential virulence protein of *Agrobacterium tumefaciens*, VirB4, requires an intact mononucleotide binding domain to function in transfer of T-DNA. *Mol Gen Genet*, 245(6), 704-715.
- Galan, J. E., & Wolf-Watz, H. (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*, 444(7119), 567-573. doi:10.1038/nature05272
- Gerlach, R. G., & Hensel, M. (2007). Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol*, 297(6), 401-415. doi:10.1016/j.ijmm.2007.03.017
- Ghosal, D., Chang, Y. W., Jeong, K. C., Vogel, J. P., & Jensen, G. J. (2017). In situ structure of the *Legionella* Dot/Icm type IV secretion system by electron cryotomography. *EMBO Rep*, 18(5), 726-732. doi:10.15252/embr.201643598
- Gibson, D. L., White, A. P., Rajotte, C. M., & Kay, W. W. (2007). AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella enteritidis*. *Microbiology*, 153(Pt 4), 1131-1140. doi:10.1099/mic.0.2006/000935-0
- Gillespie, J. J., Phan, I. Q., Scheib, H., Subramanian, S., Edwards, T. E., Lehman, S. S., . . . Pulliainen, A. T. (2015). Structural Insight into How Bacteria Prevent Interference between Multiple Divergent Type IV Secretion Systems. *MBio*, 6(6), e01867-01815. doi:10.1128/mBio.01867-15
- Gillespie, J. J., Phan, I. Q., Scheib, H., Subramanian, S., Edwards, T. E., Lehman, S. S., . . . Pulliainen, A. T. (2015). Structural Insight into How Bacteria Prevent Interference between Multiple Divergent Type IV Secretion Systems. *MBio*, 6(6). doi:10.1128/mBio.01867-15
- Goessweiner-Mohr, N., Grumet, L., Arends, K., Pavkov-Keller, T., Gruber, C. C., Gruber, K., . . . Keller, W. (2013). The 2.5 Å structure of the enterococcus conjugation protein TraM resembles VirB8 type IV secretion proteins. *J Biol Chem*, 288(3), 2018-2028. doi:10.1074/jbc.M112.428847
- Gold, V. A., Duong, F., & Collinson, I. (2007). Structure and function of the bacterial Sec translocon. *Mol Membr Biol*, 24(5-6), 387-394. doi:10.1080/09687680701416570
- Gorasia, D. G., Veith, P. D., Chen, D., Seers, C. A., Mitchell, H. A., Chen, Y. Y., . . . Reynolds, E. C. (2015). *Porphyromonas gingivalis* Type IX Secretion Substrates Are Cleaved and Modified by a Sortase-Like Mechanism. *PLoS Pathog*, 11(9), e1005152. doi:10.1371/journal.ppat.1005152
- Gorasia, D. G., Veith, P. D., Hanssen, E. G., Glew, M. D., Sato, K., Yukitake, H., . . . Reynolds, E. C. (2016). Structural Insights into the PorK and PorN Components of the

- Porphyromonas gingivalis Type IX Secretion System. *PLoS Pathog*, 12(8), e1005820. doi:10.1371/journal.ppat.1005820
- Gordon, J. E., Costa, T. R. D., Patel, R. S., Gonzalez-Rivera, C., Sarkar, M. K., Orlova, E. V., . . . Christie, P. J. (2017). Use of chimeric type IV secretion systems to define contributions of outer membrane subassemblies for contact-dependent translocation. *Mol Microbiol*, 105(2), 273-293. doi:10.1111/mmi.13700
- Green, E. R., & Mecsas, J. (2016). Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol Spectr*, 4(1). doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015
- Guglielmini, J., Neron, B., Abby, S. S., Garcillan-Barcia, M. P., de la Cruz, F., & Rocha, E. P. (2014). Key components of the eight classes of type IV secretion systems involved in bacterial conjugation or protein secretion. *Nucleic Acids Res*, 42(9), 5715-5727. doi:10.1093/nar/gku194
- Hammer, N. D., McGuffie, B. A., Zhou, Y., Badtke, M. P., Reinke, A. A., Brannstrom, K., . . . Chapman, M. R. (2012). The C-terminal repeating units of CsgB direct bacterial functional amyloid nucleation. *J Mol Biol*, 422(3), 376-389. doi:10.1016/j.jmb.2012.05.043
- Hapfelmeier, S., Domke, N., Zambryski, P. C., & Baron, C. (2000). VirB6 is required for stabilization of VirB5 and VirB3 and formation of VirB7 homodimers in Agrobacterium tumefaciens. *J Bacteriol*, 182(16), 4505-4511.
- Heath, J. E., Seers, C. A., Veith, P. D., Butler, C. A., Nor Muhammad, N. A., Chen, Y. Y., . . . Reynolds, E. C. (2016). PG1058 Is a Novel Multidomain Protein Component of the Bacterial Type IX Secretion System. *PLoS One*, 11(10), e0164313. doi:10.1371/journal.pone.0164313
- Henderson, I. R., Cappello, R., & Nataro, J. P. (2000a). Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion. *Trends Microbiol*, 8(12), 529-532.
- Henderson, I. R., Cappello, R., & Nataro, J. P. (2000b). Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion: response. *Trends Microbiol*, 8(12), 534-535.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C., & Ala'Aldeen, D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(4), 692-744. doi:10.1128/MMBR.68.4.692-744.2004
- Hilleringmann, M., Pansegrau, W., Doyle, M., Kaufman, S., MacKichan, M. L., Gianfaldoni, C., . . . Covacci, A. (2006). Inhibitors of Helicobacter pylori ATPase CagA block CagA transport and cag virulence. *Microbiology*, 152(Pt 10), 2919-2930.
- Ho, B. T., Dong, T. G., & Mekalanos, J. J. (2014). A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell Host Microbe*, 15(1), 9-21. doi:10.1016/j.chom.2013.11.008
- Hohn, M., Tang, G., Goodyear, G., Baldwin, P. R., Huang, Z., Penczek, P. A., . . . Ludtke, S. J. (2007). SPARX, a new environment for Cryo-EM image processing. *J Struct Biol*, 157(1), 47-55. doi:10.1016/j.jsb.2006.07.003
- Holland, I. B. (2004). Translocation of bacterial proteins--an overview. *Biochim Biophys Acta*, 1694(1-3), 5-16. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.02.007
- Hoppner, C., Carle, A., Sivanesan, D., Hoeppner, S., & Baron, C. (2005). The putative lytic transglycosylase VirB1 from Brucella suis interacts with the type IV secretion system core components VirB8, VirB9 and VirB11. *Microbiology*, 151(Pt 11), 3469-3482. doi:10.1099/mic.0.28326-0
- Hoppner, C., Liu, Z., Domke, N., Binns, A. N., & Baron, C. (2004). VirB1 orthologs from Brucella suis and pKM101 complement defects of the lytic transglycosylase required for

- efficient type IV secretion from *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 186(5), 1415-1422.
- Hospenthal, M. K., Costa, T. R. D., & Waksman, G. (2017). A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 15(6), 365-379. doi:10.1038/nrmicro.2017.40
- Houben, E. N., Korotkov, K. V., & Bitter, W. (2014). Take five - Type VII secretion systems of Mycobacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1843(8), 1707-1716. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.11.003
- Jackson, M. (2014). The mycobacterial cell envelope-lipids. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4(10). doi:10.1101/cshperspect.a021105
- Jakubowski, S. J., Cascales, E., Krishnamoorthy, V., & Christie, P. J. (2005). *Agrobacterium tumefaciens* VirB9, an outer-membrane-associated component of a type IV secretion system, regulates substrate selection and T-pilus biogenesis. *J Bacteriol*, 187(10), 3486-3495. doi:10.1128/JB.187.10.3486-3495.2005
- Jakubowski, S. J., Kerr, J. E., Garza, I., Krishnamoorthy, V., Bayliss, R., Waksman, G., & Christie, P. J. (2009). *Agrobacterium* VirB10 domain requirements for type IV secretion and T pilus biogenesis. *Mol Microbiol*, 71(3), 779-794. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06565.x
- Jakubowski, S. J., Krishnamoorthy, V., Cascales, E., & Christie, P. J. (2004). *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 domains direct the ordered export of a DNA substrate through a type IV secretion System. *J. Mol. Biol.*, 341, 961-977.
- Jakubowski, S. J., Krishnamoorthy, V., Cascales, E., & Christie, P. J. (2004). *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 domains direct the ordered export of a DNA substrate through a type IV secretion System. *J Mol Biol*, 341(4), 961-977. doi:10.1016/j.jmb.2004.06.052
- Jones, A. L., Shirasu, K., & Kado, C. I. (1994). The product of the virB4 gene of *Agrobacterium tumefaciens* promotes accumulation of VirB3 protein. *J Bacteriol*, 176(17), 5255-5261.
- Jose, J., Jahng, F., & Meyer, T. F. (1995). Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol Microbiol*, 18(2), 378-380.
- Judd, P. K., Kumar, R. B., & Das, A. (2005). Spatial location and requirements for the assembly of the *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(32), 11498-11503. doi:10.1073/pnas.0505290102
- Judd, P. K., Kumar, R. B., & Das, A. (2005). The type IV secretion apparatus protein VirB6 of *Agrobacterium tumefaciens* localizes to a cell pole. *Mol. Microbiol.*, 55, 115-124.
- Kanonenberg, K., Schwarz, C. K., & Schmitt, L. (2013). Type I secretion systems - a story of appendices. *Res Microbiol*, 164(6), 596-604. doi:10.1016/j.resmic.2013.03.011
- Karimova, G., Dautin, N., & Ladant, D. (2005). Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J. Bacteriol.*, 187, 2233-2243.
- Kayama, S., Shigemoto, N., Kuwahara, R., Oshima, K., Hirakawa, H., Hisatsune, J., . . . Sugai, M. (2015). Complete nucleotide sequence of the IncN plasmid encoding IMP-6 and CTX-M-2 from emerging carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(2), 1356-1359. doi:10.1128/AAC.04759-14
- Kerr, J. E., & Christie, P. J. (2010). Evidence for VirB4-mediated dislocation of membrane-integrated VirB2 pilin during biogenesis of the *Agrobacterium* VirB/VirD4 type IV secretion system. *J Bacteriol*, 192(19), 4923-4934. doi:10.1128/JB.00557-10

- Kloppmann, E., Punta, M., & Rost, B. (2012). Structural genomics plucks high-hanging membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 22(3), 326-332. doi:10.1016/j.sbi.2012.05.002
- Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J., & Svergun, D. I. (2003). PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography*, 36, 1277-1282. doi:10.1107/S0021889803012779
- Koraimann, G. (2003). Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cell Mol Life Sci*, 60(11), 2371-2388. doi:10.1007/s00018-003-3056-1
- Korotkov, K. V., Sandkvist, M., & Hol, W. G. (2012). The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol*, 10(5), 336-351. doi:10.1038/nrmicro2762
- Kube, S., Kapitein, N., Zimniak, T., Herzog, F., Mogk, A., & Wendler, P. (2014). Structure of the VipA/B type VI secretion complex suggests a contraction-state-specific recycling mechanism. *Cell Rep*, 8(1), 20-30. doi:10.1016/j.celrep.2014.05.034
- Kubori, T., Koike, M., Bui, X. T., Higaki, S., Aizawa, S., & Nagai, H. (2014). Native structure of a type IV secretion system core complex essential for Legionella pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(32), 11804-11809. doi:10.1073/pnas.1404506111
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., . . . Aizawa, S. I. (1998). Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. *Science*, 280(5363), 602-605.
- Kudryashev, M., Wang, R. Y., Brackmann, M., Scherer, S., Maier, T., Baker, D., . . . Basler, M. (2015). Structure of the type VI secretion system contractile sheath. *Cell*, 160(5), 952-962. doi:10.1016/j.cell.2015.01.037
- Kuldau, G. A., De Vos, G., Owen, J., McCaffrey, G., & Zambryski, P. (1990). The virB operon of *Agrobacterium tumefaciens* pTiC58 encodes 11 open reading frames. *Mol Gen Genet*, 221(2), 256-266.
- Kumar, R. B., & Das, A. (2001a). Functional analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA transport pore protein VirB8. *J Bacteriol*, 183(12), 3636-3641. doi:10.1128/JB.183.12.3636-3641.2001
- Kumar, R. B., & Das, A. (2001b). Functional analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA transport pore protein VirB8. *J. Bacteriol.*, 183, 3636-3641.
- Kumar, R. B., Xie, Y.-H., & Das, A. (2000a). Subcellular localization of the *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA transport pore proteins: VirB8 is essential for assembly of the transport pore. *Mol. Microbiol.*, 36, 608-617.
- Kumar, R. B., Xie, Y. H., & Das, A. (2000b). Subcellular localization of the *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA transport pore proteins: VirB8 is essential for the assembly of the transport pore. *Mol Microbiol*, 36(3), 608-617.
- Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., . . . Woodford, N. (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*, 10(9), 597-602. doi:10.1016/S1473-3099(10)70143-2
- Kuroda, T., Kubori, T., Thanh Bui, X., Hyakutake, A., Uchida, Y., Imada, K., & Nagai, H. (2015). Molecular and structural analysis of Legionella DotI gives insights into an inner membrane complex essential for type IV secretion. *Sci Rep*, 5, 10912. doi:10.1038/srep10912



- Lai, E. M., Chesnokova, O., Banta, L. M., & Kado, C. I. (2000). Genetic and environmental factors affecting T-pilin export and T-pilus biogenesis in relation to flagellation of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, *182*(13), 3705-3716.
- Lai, E. M., Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lanka, E., & Kado, C. I. (2002). Biogenesis of T pili in *Agrobacterium tumefaciens* requires precise VirB2 propilin cleavage and cyclization. *J Bacteriol*, *184*(1), 327-330.
- Laneelle, M. A., Tropis, M., & Daffe, M. (2013). Current knowledge on mycolic acids in *Corynebacterium glutamicum* and their relevance for biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol*, *97*(23), 9923-9930. doi:10.1007/s00253-013-5265-3
- Lang, S., Kirchberger, P. C., Gruber, C. J., Redzej, A., Raffl, S., Zellnig, G., . . . Zechner, E. L. (2011). An activation domain of plasmid R1 TraI protein delineates stages of gene transfer initiation. *Mol Microbiol*, *82*(5), 1071-1085. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07872.x
- Lang, S., & Zechner, E. L. (2012). General requirements for protein secretion by the F-like conjugation system R1. *Plasmid*, *67*(2), 128-138. doi:10.1016/j.plasmid.2011.12.014
- Langer, P. J., & Walker, G. C. (1981). Restriction endonuclease cleavage map of pKM101: relationship to parental plasmid R46. *Mol Gen Genet*, *182*(2), 268-272.
- Lasica, A. M., Ksiazek, M., Madej, M., & Potempa, J. (2017). The Type IX Secretion System (T9SS): Highlights and Recent Insights into Its Structure and Function. *Front Cell Infect Microbiol*, *7*, 215. doi:10.3389/fcimb.2017.00215
- Lasker, K., Topf, M., Sali, A., & Wolfson, H. J. (2009). Inferential optimization for simultaneous fitting of multiple components into a CryoEM map of their assembly. *J Mol Biol*, *388*(1), 180-194. doi:10.1016/j.jmb.2009.02.031
- Leclerque, A., & Kleespies, R. G. (2008). Type IV secretion system components as phylogenetic markers of entomopathogenic bacteria of the genus *Rickettsiella*. *FEMS Microbiol Lett*, *279*(2), 167-173. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.01025.x
- Leo, J. C., Grin, I., & Linke, D. (2012). Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *367*(1592), 1088-1101. doi:10.1098/rstb.2011.0208
- Leyton, D. L., Rossiter, A. E., & Henderson, I. R. (2012). From self sufficiency to dependence: mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis. *Nat Rev Microbiol*, *10*(3), 213-225. doi:10.1038/nrmicro2733
- Lillington, J., Geibel, S., & Waksman, G. (2014). Biogenesis and adhesion of type 1 and P pili. *Biochim Biophys Acta*, *1840*(9), 2783-2793. doi:10.1016/j.bbagen.2014.04.021
- Lillington, J., Geibel, S., & Waksman, G. (2015). Reprint of "Biogenesis and adhesion of type 1 and P pili". *Biochim Biophys Acta*, *1850*(3), 554-564. doi:10.1016/j.bbagen.2014.07.009
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., . . . Shen, J. (2015). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7
- Lopez-Garcia, P., & Moreira, D. (2008). Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology. *Res Microbiol*, *159*(1), 67-73. doi:10.1016/j.resmic.2007.11.019
- Low, H. H., Gubellini, F., Rivera-Calzada, A., Braun, N., Connery, S., Dujeancourt, A., . . . Waksman, G. (2014a). Structure of a type IV secretion system. *Nature*, *508*(7497), 550-553. doi:10.1038/nature13081

- Low, H. H., Gubellini, F., Rivera-Calzada, A., Braun, N., Connery, S., Dujancourt, A., . . . Waksman, G. (2014b). Structure of a type IV secretion system. *Nature*, *508*(7497), 550-553. doi:10.1038/nature13081
- Lycklama, A. N. J. A., & Driessen, A. J. (2012). The bacterial Sec-translocase: structure and mechanism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *367*(1592), 1016-1028. doi:10.1098/rstb.2011.0201
- Ma, L. S., Lin, J. S., & Lai, E. M. (2009). 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*, *191*(13), 4316-4329. doi:10.1128/JB.00029-09
- Marlovits, T. C., & Stebbins, C. E. (2010). Type III secretion systems shape up as they ship out. *Curr Opin Microbiol*, *13*(1), 47-52. doi:10.1016/j.mib.2009.11.001
- Marrakchi, H., Laneelle, M. A., & Daffe, M. (2014). Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chem Biol*, *21*(1), 67-85. doi:10.1016/j.chembiol.2013.11.011
- Mashalidis, E. H., Sledz, P., Lang, S., & Abell, C. (2013). A three-stage biophysical screening cascade for fragment-based drug discovery. *Nat Protoc*, *8*(11), 2309-2324. doi:10.1038/nprot.2013.130
- McBride, M. J., & Zhu, Y. (2013). Gliding motility and Por secretion system genes are widespread among members of the phylum bacteroidetes. *J Bacteriol*, *195*(2), 270-278. doi:10.1128/JB.01962-12
- McCann, J., Springar, N. E., Kobori, J., & Ames, B. N. (1975). Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *79*, 979-983.
- Middleton, R., Sjolander, K., Krishnamurthy, N., Foley, J., & Zambryski, P. (2005). 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*, *102*(5), 1685-1690. doi:10.1073/pnas.0409399102
- Mortelmans, K. E., & Stocker, B. A. (1979). Segregation of the mutator property of plasmid R46 from its ultraviolet-protecting property. *Mol Gen Genet*, *167*(3), 317-327.
- Mota, L. J., & Cornelis, G. R. (2005). The bacterial injection kit: type III secretion systems. *Ann Med*, *37*(4), 234-249. doi:10.1080/07853890510037329
- Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C. A., . . . Mekalanos, J. J. (2006). A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*, *312*(5779), 1526-1530. doi:10.1126/science.1128393
- Mudrak, B., & Kuehn, M. J. (2010). Specificity of the type II secretion systems of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* for heat-labile enterotoxin and cholera toxin. *J Bacteriol*, *192*(7), 1902-1911. doi:10.1128/JB.01542-09
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., & Yamaguchi, A. (2002). Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature*, *419*(6907), 587-593. doi:10.1038/nature01050
- Myszka, D. G. (1999). Improving biosensor analysis. *J Mol Recognit*, *12*(5), 279-284. doi:10.1002/(SICI)1099-1352(199909/10)12:5<279::AID-JMR473>3.0.CO;2-3
- Nagai, H., & Kubori, T. (2011). Type IVB Secretion Systems of *Legionella* and Other Gram-Negative Bacteria. *Front Microbiol*, *2*, 136. doi:10.3389/fmicb.2011.00136

- Nakashima, R., Sakurai, K., Yamasaki, S., Nishino, K., & Yamaguchi, A. (2011). Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. *Nature*, *480*(7378), 565-569. doi:10.1038/nature10641
- Nans, A., Kudryashev, M., Saibil, H. R., & Hayward, R. D. (2015). Structure of a bacterial type III secretion system in contact with a host membrane in situ. *Nat Commun*, *6*, 10114. doi:10.1038/ncomms10114
- Natale, P., Bruser, T., & Driessen, A. J. (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, *1778*(9), 1735-1756. doi:10.1016/j.bbamem.2007.07.015
- Ndongo, S., Mbengue, M., Dia, D., Seck, S. M., Ka, M. M., & Moreira Diop, T. (2008). [Autoimmune cholangitis or seronegative biliary cirrhosis: report of one case]. *Dakar Med*, *53*(2), 127-130.
- Nielsen, S. S., Toft, K. N., Snakenborg, D., Jeppesen, M. G., Jacobsen, J. K., Vestergaard, B., . . . Arleth, L. (2009). BioXTAS RAW, a software program for high-throughput automated small-angle X-ray scattering data reduction and preliminary analysis. *Journal of Applied Crystallography*, *42*, 959-964. doi:Doi 10.1107/S0021889809023863
- Nivaskumar, M., & Francetic, O. (2014). Type II secretion system: a magic beanstalk or a protein escalator. *Biochim Biophys Acta*, *1843*(8), 1568-1577. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.12.020
- O'Callaghan, D., Cazevieille, C., Allardet-Servent, A., Boschioli, M. L., Bourg, G., Foulongne, V., . . . Ramuz, M. (1999). 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*, *33*(6), 1210-1220.
- Overington, J. P., Al-Lazikani, B., & Hopkins, A. L. (2006). How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov*, *5*(12), 993-996. doi:10.1038/nrd2199
- Palmer, T., & Berks, B. C. (2012). The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat Rev Microbiol*, *10*(7), 483-496. doi:10.1038/nrmicro2814
- Paschos, A., den Hartigh, A., Smith, M. A., Atluri, V. L., Sivanesan, D., Tsolis, R. M., & Baron, C. (2011). An In Vivo High-Throughput Screening Approach Targeting the Type IV Secretion System Component VirB8 Identified Inhibitors of *Brucella abortus* 2308 Proliferation. *Infect Immun*, *79*(3), 1033-1043. doi:IAI.00993-10 [pii] 10.1128/IAI.00993-10
- Paschos, A., Patey, G., Sivanesan, D., Gao, C., Bayliss, R., Waksman, G., . . . Baron, C. (2006). Dimerization and interactions of *Brucella suis* VirB8 with VirB4 and VirB10 are required for its biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(19), 7252-7257. doi:10.1073/pnas.0600862103
- Paschos, A., Patey, G., Sivanesan, D., Gao, C., Bayliss, R., Waksman, G., . . . Baron, C. (2006). Dimerization and interactions of *Brucella suis* VirB8 with VirB4 and VirB10 are required for its biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *103*, 7252-7257.
- Patey, G., Qi, Z., Bourg, G., Baron, C., & O'Callaghan, D. (2006a). Swapping of periplasmic domains between *Brucella suis* VirB8 and a pSB102 VirB8 homologue allows heterologous complementation. *Infect Immun*, *74*(8), 4945-4949. doi:10.1128/IAI.00584-06
- Patey, G., Qi, Z., Bourg, G., Baron, C., & O'Callaghan, D. (2006b). Swapping of periplasmic domains between *Brucella suis* VirB8 and pSB102 VirB8 homologue allows heterologous complementation. *Infect. Immun.*, *74*(4945-4949).

- Petoukhov, M. V., Konarev, P. V., Kikhney, A. G., & Svergun, D. I. (2007). ATSAS 2.1 - towards automated and web-supported small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography*, *40*, S223-S228. doi:10.1107/S0021889807002853
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, *25*(13), 1605-1612. doi:10.1002/jcc.20084
- Piddock, L. J. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol*, *4*(8), 629-636. doi:10.1038/nrmicro1464
- Pierce, B. G., Wiehe, K., Hwang, H., Kim, B. H., Vreven, T., & Weng, Z. (2014). ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers. *Bioinformatics*, *30*(12), 1771-1773. doi:10.1093/bioinformatics/btu097
- Pohlman, R. F., Genetti, H. D., & Winans, S. C. (1994). Common ancestry between IncN conjugal transfer genes and macromolecular export systems of plant and animal pathogens. *Mol. Microbiol.*, *14*, 655-668.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K., & Meyer, T. F. (1987). Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature*, *325*(6103), 458-462. doi:10.1038/325458a0
- Porter, C. J., Bantwal, R., Bannam, T. L., Rosado, C. J., Pearce, M. C., Adams, V., . . . Rood, J. I. (2012). The conjugation protein TcpC from *Clostridium perfringens* is structurally related to the type IV secretion system protein VirB8 from Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol*, *83*(2), 275-288. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07930.x
- Pratt, L. A., & Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol*, *30*(2), 285-293.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Revel, A. T., Sturtevant, D., & Mekalanos, J. J. (2007). Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(39), 15508-15513. doi:10.1073/pnas.0706532104
- Rabel, C., Grahn, A. M., Lurz, R., & Lanka, E. (2003). The VirB4 family of proposed traffic nucleoside triphosphatases: common motifs in plasmid RP4 TrbE are essential for conjugation and phage adsorption. *J Bacteriol*, *185*(3), 1045-1058.
- Rambow-Larsen, A. A., Petersen, E. M., Gourley, C. R., & Splitter, G. A. (2009). *Brucella* regulators: self-control in a hostile environment. *Trends Microbiol*, *17*(8), 371-377. doi:10.1016/j.tim.2009.05.006
- Randall, L. L., & Hardy, S. J. (1984). Export of protein in bacteria. *Microbiol Rev*, *48*(4), 290-298.
- Rashkova, S., Spudich, G. M., & Christie, P. J. (1997). Characterization of membrane and protein interaction determinants of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB11 ATPase. *J Bacteriol*, *179*(3), 583-591.
- Redzej, A., Ukleja, M., Connery, S., Trokter, M., Felisberto-Rodrigues, C., Cryar, A., . . . Waksman, G. (2017). Structure of a VirD4 coupling protein bound to a VirB type IV secretion machinery. *EMBO J*, *36*(20), 3080-3095. doi:10.15252/embj.201796629
- Redzej, A., Waksman, G., & Orlova, E. V. (2015). Structural studies of T4S systems by electron microscopy. *AIMS Biophysics*, *2*(2), 184-199. doi:10.3934/biophy.2015.2.184
- Rego, A. T., Chandran, V., & Waksman, G. (2010). Two-step and one-step secretion mechanisms in Gram-negative bacteria: contrasting the type IV secretion system and the

- chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Biochem J*, 425(3), 475-488. doi:10.1042/BJ20091518
- Reichow, S. L., Korotkov, K. V., Hol, W. G., & Gonen, T. (2010). Structure of the cholera toxin secretion channel in its closed state. *Nat Struct Mol Biol*, 17(10), 1226-1232. doi:10.1038/nsmb.1910
- Rivera-Calzada, A., Fronzes, R., Savva, C. G., Chandran, V., Lian, P. W., Laeremans, T., . . . Orlova, E. V. (2013). Structure of a bacterial type IV secretion core complex at subnanometre resolution. *EMBO J*, 32(8), 1195-1204. doi:10.1038/emboj.2013.58
- Roman-Hernandez, G., Peterson, J. H., & Bernstein, H. D. (2014). Reconstitution of bacterial autotransporter assembly using purified components. *Elife*, 3, e04234. doi:10.7554/eLife.04234
- Ruer, S., Pinotsis, N., Steadman, D., Waksman, G., & Remaut, H. (2015). Virulence-targeted Antibacterials: Concept, Promise, and Susceptibility to Resistance Mechanisms. *Chem Biol Drug Des*, 86(4), 379-399. doi:10.1111/cbdd.12517
- Russell, A. B., Hood, R. D., Bui, N. K., LeRoux, M., Vollmer, W., & Mougous, J. D. (2011). Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*, 475(7356), 343-347. doi:10.1038/nature10244
- Russell, A. B., Peterson, S. B., & Mougous, J. D. (2014). Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nat Rev Microbiol*, 12(2), 137-148. doi:10.1038/nrmicro3185
- Sagulenko, E., Sagulenko, V., Chen, J., & Christie, P. J. (2001). Role of *Agrobacterium* VirB11 ATPase in T-pilus assembly and substrate selection. *J Bacteriol*, 183(20), 5813-5825. doi:10.1128/JB.183.20.5813-5825.2001
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (Eds.). (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd ed. ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Samuels, A. L., Lanka, E., & Davies, J. E. (2000). Conjugative junctions in RP4-mediated mating of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 182(10), 2709-2715.
- Sandkvist, M., Michel, L. O., Hough, L. P., Morales, V. M., Bagdasarian, M., Koomey, M., . . . Bagdasarian, M. (1997). General secretion pathway (eps) genes required for toxin secretion and outer membrane biogenesis in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, 179(22), 6994-7003.
- Sato, K., Naito, M., Yukitake, H., Hirakawa, H., Shoji, M., McBride, M. J., . . . Nakayama, K. (2010). A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(1), 276-281. doi:10.1073/pnas.0912010107
- Sato, K., Yukitake, H., Narita, Y., Shoji, M., Naito, M., & Nakayama, K. (2013). Identification of *Porphyromonas gingivalis* proteins secreted by the Por secretion system. *FEMS Microbiol Lett*, 338(1), 68-76. doi:10.1111/1574-6968.12028
- Schmidt-Eisenlohr, H., Domke, N., Angerer, C., Wanner, G., Zambryski, P. C., & Baron, C. (1999). Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 181(24), 7485-7492.
- Schmidt-Eisenlohr, H., Domke, N., & Baron, C. (1999). TraC of IncN plasmid pKM101 associates with membranes and extracellular high-molecular-weight structures in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 181(18), 5563-5571.
- Schraidt, O., & Marlovits, T. C. (2011). Three-dimensional model of *Salmonella*'s needle complex at subnanometer resolution. *Science*, 331(6021), 1192-1195. doi:10.1126/science.1199358

- Segal, G., Purcell, M., & Shuman, H. A. (1998). 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*, *95*(4), 1669-1674.
- Seubert, A., Hiestand, R., de la Cruz, F., & Dehio, C. (2003). A bacterial conjugation machinery recruited for pathogenesis. *Mol Microbiol*, *49*(5), 1253-1266.
- Sharifahmadian, M., Arya, T., Bessette, B., Lecoq, L., Ruediger, E., Omichinski, J. G., & Baron, C. (2017). Monomer-to-dimer transition of *Brucella suis* type IV secretion system component VirB8 induces conformational changes. *FEBS J*, *284*(8), 1218-1232. doi:10.1111/febs.14049
- Sharifahmadian, M., Nlend, I. U., Lecoq, L., Omichinski, J. G., & Baron, C. (2017). The type IV secretion system core component VirB8 interacts via the beta1-strand with VirB10. *FEBS Lett*, *591*(16), 2491-2500. doi:10.1002/1873-3468.12770
- Shrivastava, A., Johnston, J. J., van Baaren, J. M., & McBride, M. J. (2013). *Flavobacterium johnsoniae* GldK, GldL, GldM, and SprA are required for secretion of the cell surface gliding motility adhesins SprB and RemA. *J Bacteriol*, *195*(14), 3201-3212. doi:10.1128/JB.00333-13
- Silvestre, H. L., Blundell, T. L., Abell, C., & Ciulli, A. (2013). Integrated biophysical approach to fragment screening and validation for fragment-based lead discovery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(32), 12984-12989. doi:10.1073/pnas.1304045110
- Simeone, R., Bottai, D., & Brosch, R. (2009). ESX/type VII secretion systems and their role in host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol*, *12*(1), 4-10. doi:10.1016/j.mib.2008.11.003
- Sivanesan, D., & Baron, C. (2011a). The dimer interface of *Agrobacterium tumefaciens* VirB8 is important for type IV secretion system function, stability and for association of VirB2 with the core complex. *J. Bacteriol.*, *193*, 2097-2106.
- Sivanesan, D., & Baron, C. (2011b). 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*, *193*(9), 2097-2106. doi:10.1128/JB.00907-10
- Sivanesan, D., Hancock, M. A., Villamil Giraldo, A. M., & Baron, C. (2010). Quantitative analysis of VirB8-VirB9-VirB10 interactions provides a dynamic model of type IV secretion system core complex assembly. *Biochemistry*, *49*(21), 4483-4493. doi:10.1021/bi902201y
- Smith, M. A., Coincon, M., Paschos, A., Jolicoeur, B., Lavallee, P., Sygusch, J., & Baron, C. (2012). Identification of the Binding Site of *Brucella* VirB8 Interaction Inhibitors. *Chem Biol*, *19*(8), 1041-1048. doi:S1074-5521(12)00230-X [pii] 10.1016/j.chembiol.2012.07.007
- Stanley, S. A., Raghavan, S., Hwang, W. W., & Cox, J. S. (2003). Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(22), 13001-13006. doi:10.1073/pnas.2235593100
- Surana, N. K., Cutter, D., Barenkamp, S. J., & St Geme, J. W., 3rd. (2004). The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter contains an unusually short trimeric translocator domain. *J Biol Chem*, *279*(15), 14679-14685. doi:10.1074/jbc.M311496200
- Sutherland, M. C., Binder, K. A., Cualing, P. Y., & Vogel, J. P. (2013). Reassessing the role of DotF in the *Legionella pneumophila* type IV secretion system. *PLoS One*, *8*(6), e65529. doi:10.1371/journal.pone.0065529

- Svergun, D. I. (1992). Determination of the Regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria. *Journal of Applied Crystallography*, *25*, 495-503. doi:10.1107/S0021889892001663
- Svergun, D. I., Petoukhov, M. V., & Koch, M. H. J. (2001). Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys J*, *80*(6), 2946-2953.
- Tang, G., Peng, L., Baldwin, P. R., Mann, D. S., Jiang, W., Rees, I., & Ludtke, S. J. (2007). EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *J Struct Biol*, *157*(1), 38-46. doi:10.1016/j.jsb.2006.05.009
- Tato, I., Zunzunegui, S., de la Cruz, F., & Cabezon, E. (2005). TrwB, the coupling protein involved in DNA transport during bacterial conjugation, is a DNA-dependent ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(23), 8156-8161. doi:10.1073/pnas.0503402102
- Terradot, L., Bayliss, R., Oomen, C., Leonard, G., Baron, C., & Waksman, G. (2005a). Crystal Structures of the periplasmic domains of two core subunits of the bacterial type IV secretion system, VirB8 from *Brucella suis* and ComB10 from *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *102*, 4596-4601.
- Terradot, L., Bayliss, R., Oomen, C., Leonard, G. A., Baron, C., & Waksman, G. (2005b). 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*, *102*(12), 4596-4601. doi:10.1073/pnas.0408927102
- Thanassi, D. G., Bliska, J. B., & Christie, P. J. (2012). Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev*, *36*(6), 1046-1082. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00342.x
- Thomas, S., Holland, I. B., & Schmitt, L. (2014). The Type 1 secretion pathway - the hemolysin system and beyond. *Biochim Biophys Acta*, *1843*(8), 1629-1641. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.09.017
- Trocker, M., Felisberto-Rodrigues, C., Christie, P. J., & Waksman, G. (2014a). Recent advances in the structural and molecular biology of type IV secretion systems. *Curr Opin Struct Biol*, *27*, 16-23. doi:10.1016/j.sbi.2014.02.006
- Trocker, M., Felisberto-Rodrigues, C., Christie, P. J., & Waksman, G. (2014b). Recent advances in the structural and molecular biology of type IV secretion systems. *Curr Opin Struct Biol*, *27C*, 16-23. doi:10.1016/j.sbi.2014.02.006
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010a). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.*, *31*, 455-461.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010b). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*, *31*(2), 455-461. doi:10.1002/jcc.21334
- Valdes, R., Jr., & Ackers, G. K. (1979). Study of protein subunit association equilibria by elution gel chromatography. *Methods Enzymol*, *61*, 125-142.
- van Ulsen, P., Rahman, S., Jong, W. S., Daleke-Schermerhorn, M. H., & Luirink, J. (2014). Type V secretion: from biogenesis to biotechnology. *Biochim Biophys Acta*, *1843*(8), 1592-1611. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.11.006
- Veith, P. D., Glew, M. D., Gorasia, D. G., & Reynolds, E. C. (2017). Type IX secretion: the generation of bacterial cell surface coatings involved in virulence, gliding motility and the degradation of complex biopolymers. *Mol Microbiol*, *106*(1), 35-53. doi:10.1111/mmi.13752

- Veith, P. D., Nor Muhammad, N. A., Dashper, S. G., Likic, V. A., Gorasia, D. G., Chen, D., . . . Reynolds, E. C. (2013). Protein substrates of a novel secretion system are numerous in the Bacteroidetes phylum and have in common a cleavable C-terminal secretion signal, extensive post-translational modification, and cell-surface attachment. *J Proteome Res*, *12*(10), 4449-4461. doi:10.1021/pr400487b
- Villamil Giraldo, A. M., Mary, C., Sivanesan, D., & Baron, C. (2015). VirB6 and VirB10 from the Brucella type IV secretion system interact via the N-terminal periplasmic domain of VirB6. *FEBS Lett*, *589*(15), 1883-1889. doi:10.1016/j.febslet.2015.05.051
- Villamil Giraldo, A. M., Sivanesan, D., Carle, A., Paschos, A., Smith, M. A., Plesa, M., . . . Baron, C. (2012). Type IV secretion system core component VirB8 from Brucella binds to the globular domain of VirB5 and to a periplasmic domain of VirB6. *Biochemistry*, *51*(18), 3881-3890. doi:10.1021/bi300298v
- Vincent, C. D., Friedman, J. R., Jeong, K. C., Buford, E. C., Miller, J. L., & Vogel, J. P. (2006). Identification of the core transmembrane complex of the Legionella Dot/Icm type IV secretion system. *Mol Microbiol*, *62*(5), 1278-1291. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05446.x
- Vincent, M. S., Canestrari, M. J., Leone, P., Stathopoulos, J., Ize, B., Zoued, A., . . . Cascales, E. (2017). Characterization of the Porphyromonas gingivalis Type IX Secretion Trans-envelope PorKLMNP Core Complex. *J Biol Chem*, *292*(8), 3252-3261. doi:10.1074/jbc.M116.765081
- Vogel, J. P., Andrews, H. L., Wong, S. K., & Isberg, R. R. (1998). Conjugative transfer by the virulence system of Legionella pneumophila. *Science*, *279*(5352), 873-876.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M. L., Lazdunski, A., Wu, L. F., & Filloux, A. (2001). Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J*, *20*(23), 6735-6741. doi:10.1093/emboj/20.23.6735
- Wallden, K., Rivera-Calzada, A., & Waksman, G. (2010). Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cell Microbiol*, *12*(9), 1203-1212. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01499.x
- Wallden, K., Williams, R., Yan, J., Lian, P. W., Wang, L., Thalassinou, K., . . . Waksman, G. (2012). 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*, *109*(28), 11348-11353. doi:10.1073/pnas.1201428109
- Wang, D., Zetterstrom, C. E., Gabrielsen, M., Beckham, K. S., Tree, J. J., Macdonald, S. E., . . . Roe, A. J. (2011). Identification of bacterial target proteins for the salicylidene acylhydrazide class of virulence-blocking compounds. *J Biol Chem*, *286*(34), 29922-29931. doi:10.1074/jbc.M111.233858
- Wang, Z., Fan, G., Hryc, C. F., Blaza, J. N., Serysheva, II, Schmid, M. F., . . . Du, D. (2017). An allosteric transport mechanism for the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Elife*, *6*. doi:10.7554/eLife.24905
- Ward, D. V., Draper, O., Zupan, J. R., & Zambryski, P. C. (2002). Peptide linkage mapping of the Agrobacterium tumefaciens vir-encoded type IV secretion system reveals protein subassemblies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(17), 11493-11500. doi:10.1073/pnas.172390299
- Winans, S. C., Burns, D. L., & Christie, P. J. (1996). Adaption of a conjugal system for the export of pathogenic macromolecules. *Trends Microbiol.*, *4*, 64-68.



- Winans, S. C., & Walker, G. C. (1985). Conjugal transfer system of the N incompatibility plasmid pKM101. *J. Bacteriol.*, *161*, 402-410.
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *74*(11), 5088-5090.
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*(12), 4576-4579.
- Wright, K. J., Seed, P. C., & Hultgren, S. J. (2007). Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cell Microbiol*, *9*(9), 2230-2241. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00952.x
- Yan, Z., Yin, M., Xu, D., Zhu, Y., & Li, X. (2017). Structural insights into the secretin translocation channel in the type II secretion system. *Nat Struct Mol Biol*, *24*(2), 177-183. doi:10.1038/nsmb.3350
- Yanisch-Perron, C., Viera, J., & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC18 vectors. *Gene*, *33*, 103-119.
- Yuan, Q., Carle, A., Gao, C., Sivanesan, D., Aly, K., Höppner, C., . . . Baron, C. (2005). Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *J. Biol. Chem.*, *280*, 26349-26359.
- Yuan, Q., Carle, A., Gao, C., Sivanesan, D., Aly, K. A., Hoppner, C., . . . Baron, C. (2005). Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *J Biol Chem*, *280*(28), 26349-26359. doi:10.1074/jbc.M502347200
- Zambelloni, R., Marquez, R., & Roe, A. J. (2015). Development of antivirulence compounds: a biochemical review. *Chem Biol Drug Des*, *85*(1), 43-55. doi:10.1111/cbdd.12430
- Zamboni, D. S., McGrath, S., Rabinovitch, M., & Roy, C. R. (2003). *Coxiella burnetii* express type IV secretion system proteins that function similarly to components of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system. *Mol Microbiol*, *49*(4), 965-976.
- Zinoni, F., Heider, J., & Bock, A. (1990). Features of the formate dehydrogenase mRNA necessary for decoding of the UGA codon as selenocysteine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*(12), 4660-4664.
- Zoltner, M., Fyfe, P. K., Palmer, T., & Hunter, W. N. (2013). Characterization of *Staphylococcus aureus* EssB, an integral membrane component of the Type VII secretion system: atomic resolution crystal structure of the cytoplasmic segment. *Biochem J*, *449*(2), 469-477. doi:10.1042/BJ20121209
- Zupan, J., Hackworth, C. A., Aguilar, J., Ward, D., & Zambryski, P. (2007). VirB1\* promotes T-pilus formation in the vir-Type IV secretion system of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, *189*(18), 6551-6563. doi:10.1128/JB.00480-07
- Zupan, J., Muth, T. R., Draper, O., & Zambryski, P. (2000). The transfer of DNA from *agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J*, *23*(1), 11-28.
- Zusman, T., Yerushalmi, G., & Segal, G. (2003). Functional similarities between the icm/dot pathogenesis systems of *Coxiella burnetii* and *Legionella pneumophila*. *Infect Immun*, *71*(7), 3714-3723.

## **Annexe 1 : Matériel supplémentaire du chapitre 3**

**Title:** Fragment-based screening identifies novel targets for inhibitors of conjugative transfer of antimicrobial resistance by plasmid pKM101

**Authors:** Bastien Casu, Tarun Arya, Benoit Bessette, Christian Baron\*

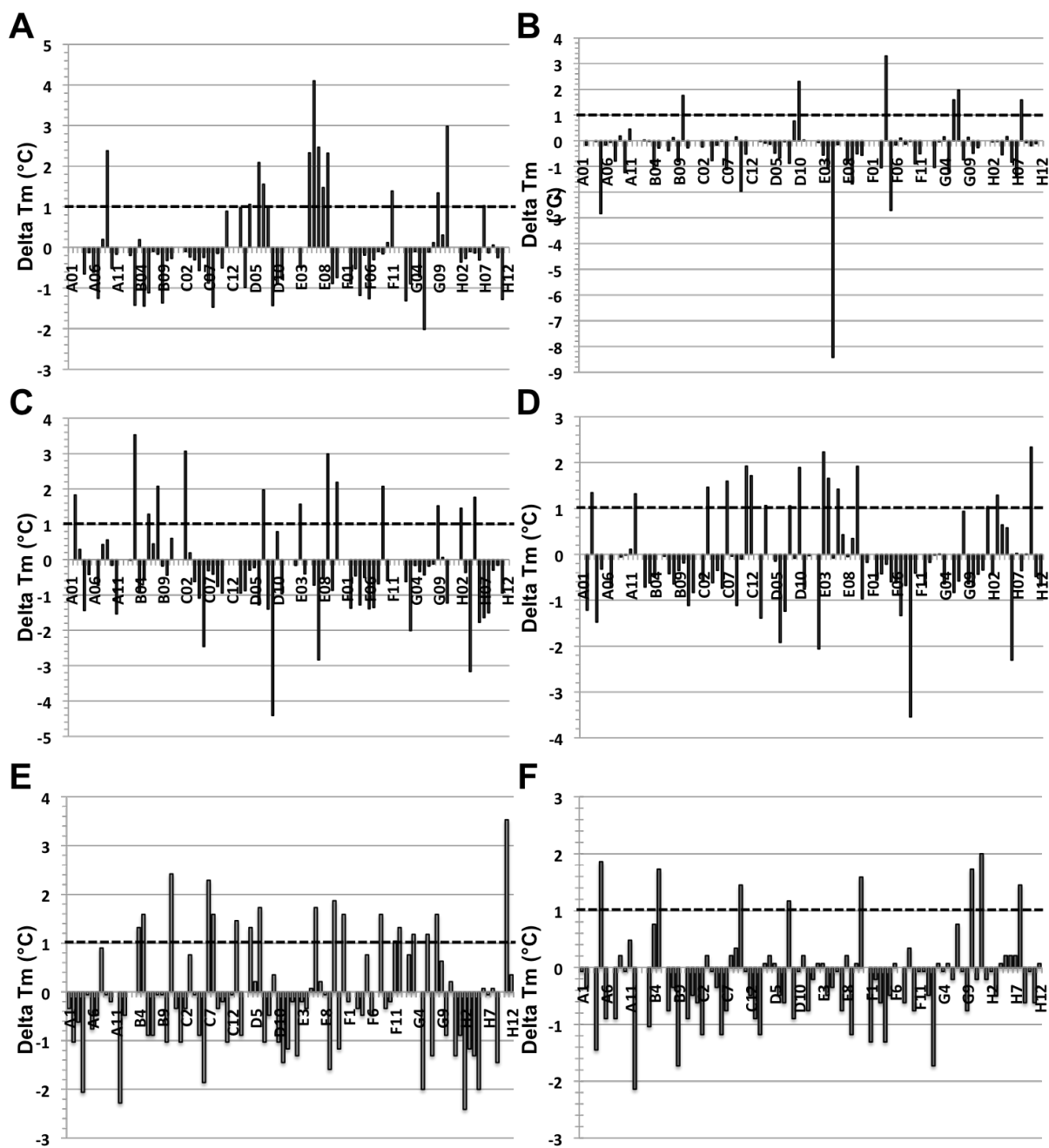
**Affiliation:** Department of Biochemistry and Molecular Medicine,  
Faculty of Medicine,  
Université de Montréal, 2900 Boulevard Édouard-Montpetit, Montréal,  
QC, H3T 1J4, Canada

**\*Corresponding Author:** Christian Baron

Université de Montréal, 2900 Boulevard Édouard-Montpetit,  
Montréal, QC, H3T 1J4, Canada

E-mail: christian.baron@umontreal.ca

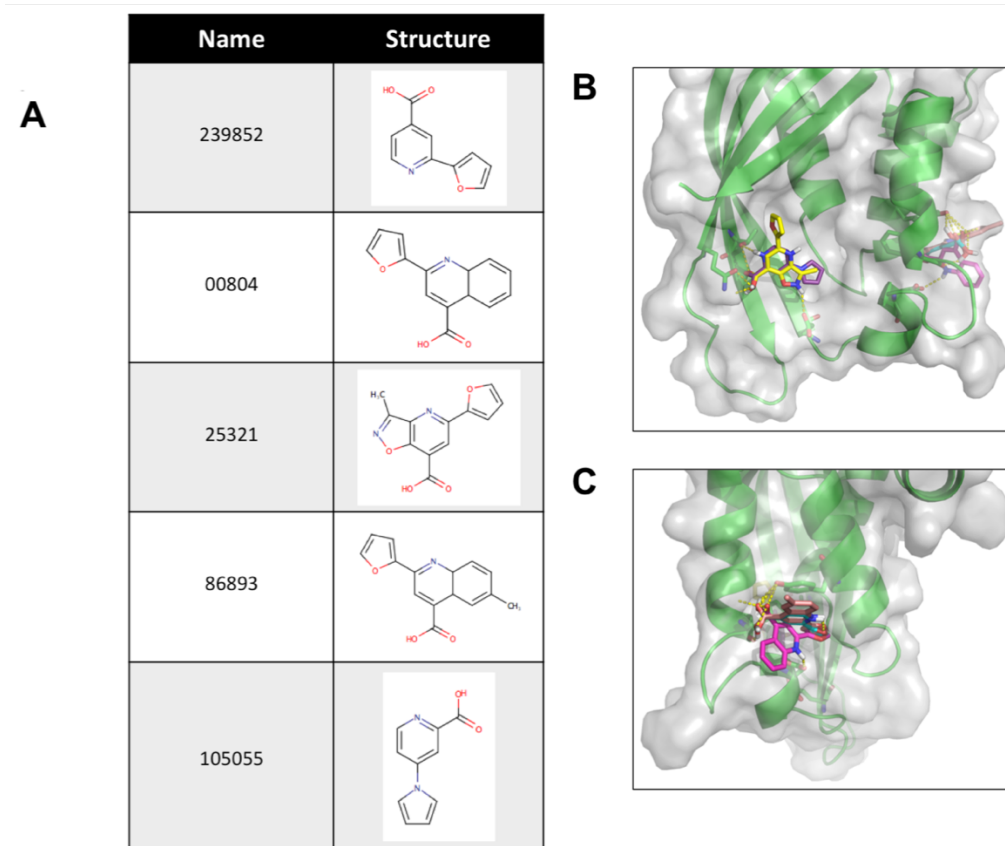
Phone: (514) 343-6300



**Supplementary Figure 1.1. Fragment screening using DSF.** (A-F) Effects of 505 fragments (5 mM final concentration) on TraE melting temperatures ( $T_m$ ). Differences of  $T_m$  between fragments and a DMSO control are shown ( $\Delta T_m$ ). Positive shifts higher than 1°C (two times higher than the standard deviation of the DMSO control) were considered as indications for binding (black dashed line).

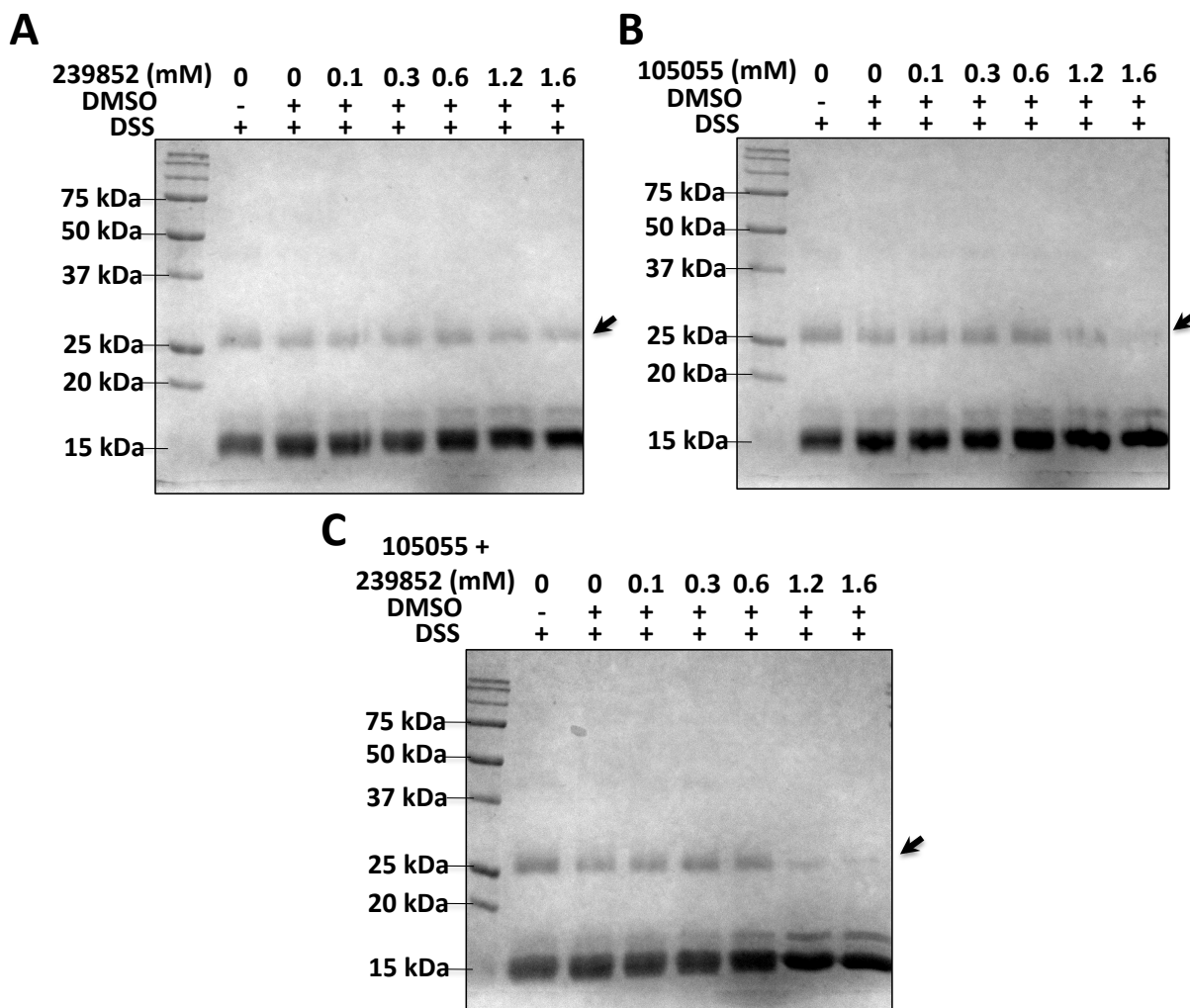
Name	Structure	Name	Structure	Name	Structure	Name	Structure
1E5		2F4		3E9		4E3	
1E6		2F5		4C7		4E4	
1G11		3B8		4C12		4E10	
2E5		3C2		4D10		4H10	

Supplementary Figure 1.2. Chemical formulas of binding fragments.

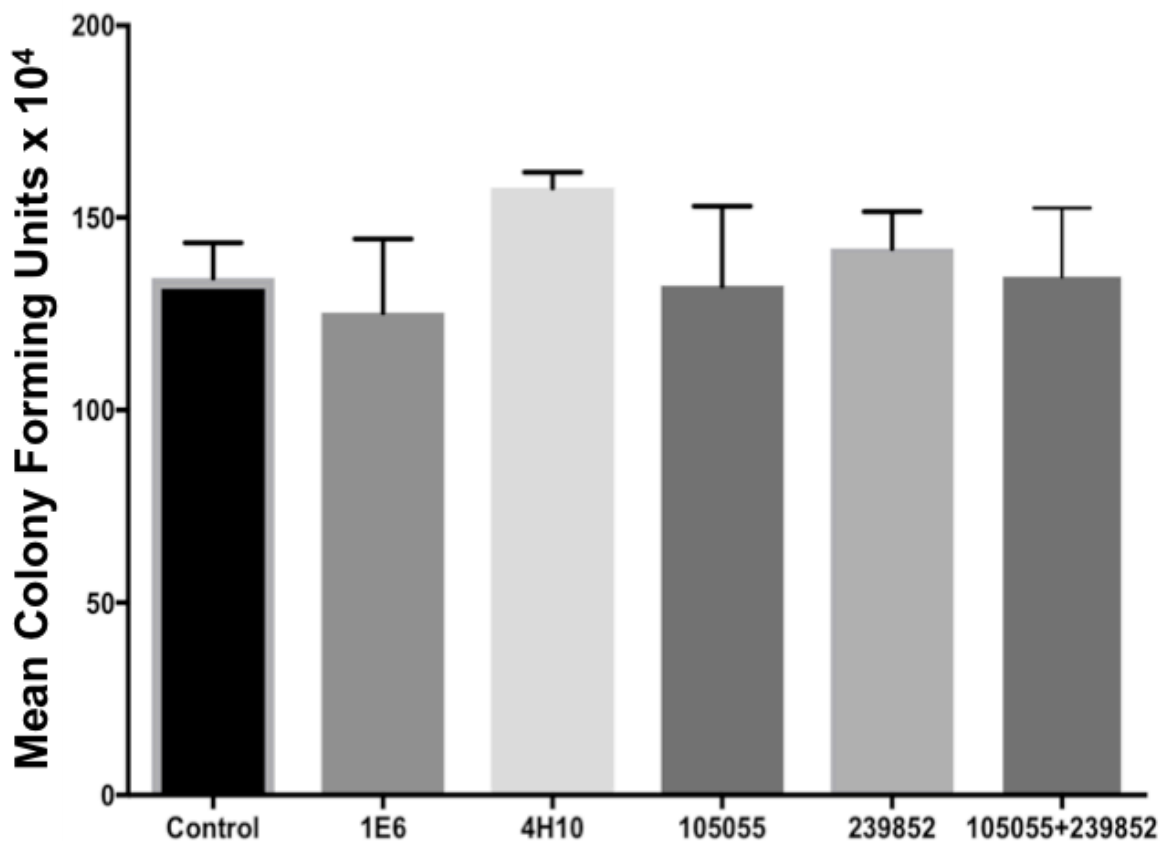


Supplementary Figure 1.3. Docking of small molecules derived from fragments 1E6 and

**4H10.** (A) Chemical formulas of small molecules derived from fragments 1E6 and 4H10. (B-C) Predicted binding of small molecules on TraE after docking with AutoDockVina software.



**Supplementary Figure 1.4. Quantification of the formation of DSS-dependent cross-linking products of TraE.** SDS-PAGE showing the cross-linking products of TraE (indicated by arrow) in the absence and in the presence (0 - 1.6 mM) of (A) 239852, (B) 105055, and (C) combination of 105055 and 239852.



**Supplementary Figure 1.5. *In vivo* characterization of fragments and small molecules effects on transfer of the unrelated plasmid RP4.** Conjugation assays between plasmid RP4-carrying donor strain FM433 and plasmid-free recipient WL400 were conducted in the presence of 50  $\mu$ M TraE- binding fragment and small molecules. The numbers of colony-forming units compared with a control experiment in the absence of the small molecules are shown; data represent averages and S.E. (error bars) of three biological replicate cultures.

**Supplementary Table 1.1. Library of fragments** ([https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41598-017-14953-1/MediaObjects/41598\\_2017\\_14953\\_MOESM1\\_ESM.pdf](https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41598-017-14953-1/MediaObjects/41598_2017_14953_MOESM1_ESM.pdf))

<b>Data Collection</b>	<b>TraE-1E6 complex</b>	<b>TraE-4H10 complex</b>	<b>TraE-105055 complex</b>	<b>TraE-239852 complex</b>
Wavelength (Å)	0.977	0.977	0.977	0.977
Resolution range (Å)	38.77 - 2.55	41.16 - 2.79	39.48 - 2.52	41.65 - 2.619
Space group	C 2 2 21	C 2 2 21	C 2 2 21	C 2 2 21
Unit cell parameters a (Å), b (Å), c (Å), $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	111.318, 123.766, 108.076	111.799, 124.116, 109.993	112.911, 125.535, 110.453	112.39, 124.089, 109.914
Total reflections	151 997	40 920	144 542	138 072
Unique reflections	38 437	15 838	26 767	23 012
Multiplicity	6.1	2.6	5.4	6.0
Completeness (%)	96.39	81.59	99.98	99.42
Mean I/sigma(I)	2.5	4.09	5.36	5.91
Wilson B-factor	41.88	67.50	57.14	44.50
R-work	0.2247	0.2980	0.2998	0.2167
R-free	0.2806	0.3569	0.3562	0.2740
Number of non-hydrogen atoms	4 688	4 660	4 621	4 654
Macromolecules	4 569	4 628	4 597	4 493
Ligands	16	10	14	14
Water	103	22	10	147
Protein residues	559	567	563	557
RMS bonds (Å)	0.008	0.006	0.004	0.006
RMS angles (°)	0.78	0.76	0.68	0.95
Ramachandran favored (%)	94.74	95.92	95.14	97.06
Ramachandran allowed (%)	5.08	3.72	4.68	2.75
Ramachandran outliers (%)	0.18	0.35	0.18	0.18
Clashscore	3.88	7.22	26.75	12.59
Average B-factor (Å <sup>2</sup> )	61.90	65.80	75.00	54.90
<b>PDB number</b>	<b>5WIC</b>	<b>5WII</b>	<b>5WIO</b>	<b>5WIP</b>

**Supplementary Table 1.2. Data collection and refinement statistics for TraE in complex with fragments, 1E6 and 4H10, and small molecules, 105055 and 23985**

## Annexe 2 : Matériel supplémentaire du chapitre 4

**Title:** The VirB8 homolog TraE from plasmid pKM101 forms a hexameric ring structure and interacts with the VirB6 homolog TraD

**Authors:** Bastien Casu<sup>1</sup>, Charline Mary<sup>1</sup>, Aleksandr Sverzhinsky<sup>1</sup>, Aurélien Fouillen<sup>1,2</sup>, Antonio Nanci<sup>1,2</sup> and Christian Baron<sup>1\*</sup>

**Table S2.1. Bacterial strains and plasmids.**

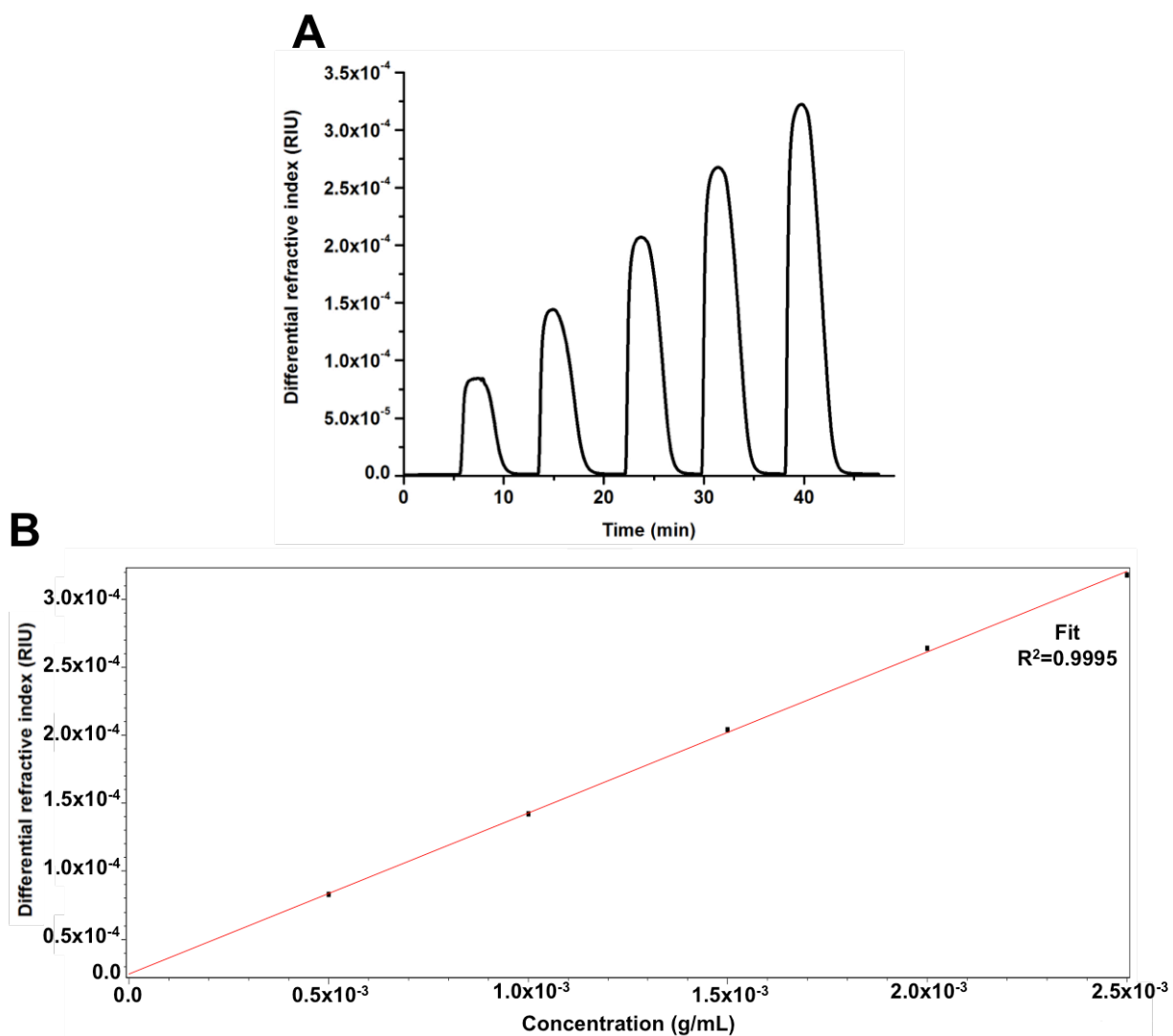
Strain	Genotype or Description	Source or Reference
DH5 $\alpha$	<i>F-</i> $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> ( <i>rK-</i> , <i>mK+</i> ) <i>phoA supE44</i> $\lambda$ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
XL-1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> ( <i>F'</i> <i>proAB lacIqZ</i> $\Delta$ M15 <i>Tn10</i> ( <i>Tetr</i> ))	Agilent Technologies
BL21(DE3)star	<i>F-</i> <i>ompT hsdSB</i> ( <i>rB-</i> , <i>mB-</i> ) <i>gal dcm rne131</i> ( <i>DE3</i> )	Invitrogen
<b>Plasmids</b>		
pHT	kan <sup>r</sup> pET24d derivative T7 expression vector with N-terminal 6xHis-tag and TEV protease cleavage site	(Smith et al., 2012)
pHTVirB8b	kan <sup>r</sup> T7 promoter vector for the expression of 6xHis-	



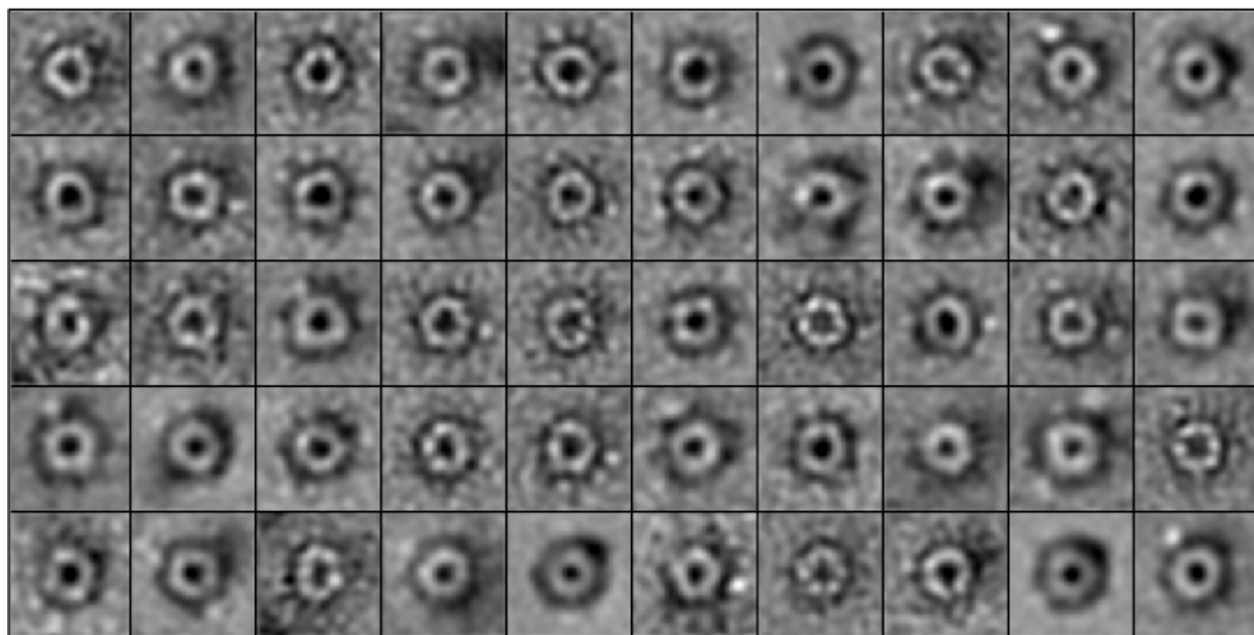
	tagged full-length domain of <i>B. suis</i> VirB8	This Work
pHTTraE	kan <sup>r</sup> T7 promoter vector for the expression of 6xHis-tagged full-length domain of <i>pKM101</i> TraE	This Work
pHTCagV	kan <sup>r</sup> T7 promoter vector for the expression of 6xHis-tagged full-length domain of <i>H. pylori</i> CagV	This Work
pHTTraD	kan <sup>r</sup> T7 promoter vector for the expression of 6xHis-tagged TraD from pKM101	This Work
pETDuetTraDTraE	amp <sup>r</sup> T7 promoter vector for the expression of 6xHis-tagged TraD from pKM101 expressed from into the MCSG1 site and full-length TraE from pKM101 expressed from the MCSG2 site	This Work

**Table S2.2. SAXS data collection and scattering-derived parameters.**

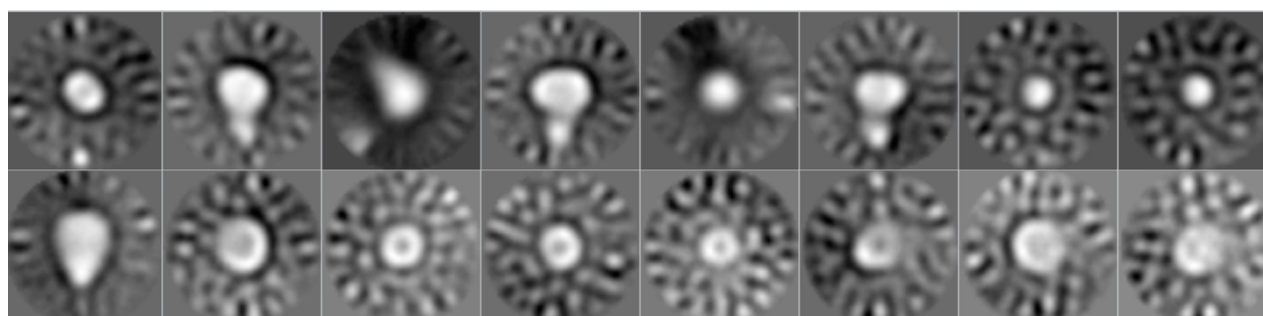
<b>Sample</b>	<b>TraE</b>
<b><i>Data collection parameters</i></b>	
Beamline	G1
Beam geometry ( $\mu\text{m}$ )	250 x 250
Wavelength ( $\text{\AA}$ )	1.245
$q$ range ( $\text{\AA}^{-1}$ )	0.008 - 0.8
Exposure time per frame (s) <sup>a</sup>	2
Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	23
<b><i>Structural parameters</i></b>	
$I(0)$ (from Guinier) ( $\pm\text{SE}$ )	$0.94\text{E-}02 \pm 0.28\text{E-}04$
$R_g$ ( $\text{\AA}$ ) (from Guinier) ( $\pm\text{SE}$ )	$44.35 \pm 0.12$
$D_{\text{max}}$ ( $\text{\AA}$ ) ( $\pm 10\%$ [estimated range])	$137 \pm 14$
$\chi^2$ (SASREF)	1.16
Porod volume [from $P(r)$ ] ( $\text{nm}^3$ )	360
<b><i>Software employed</i></b>	
Primary data reduction	RAW
Data processing	PRIMUS
Modeling	GASBOR



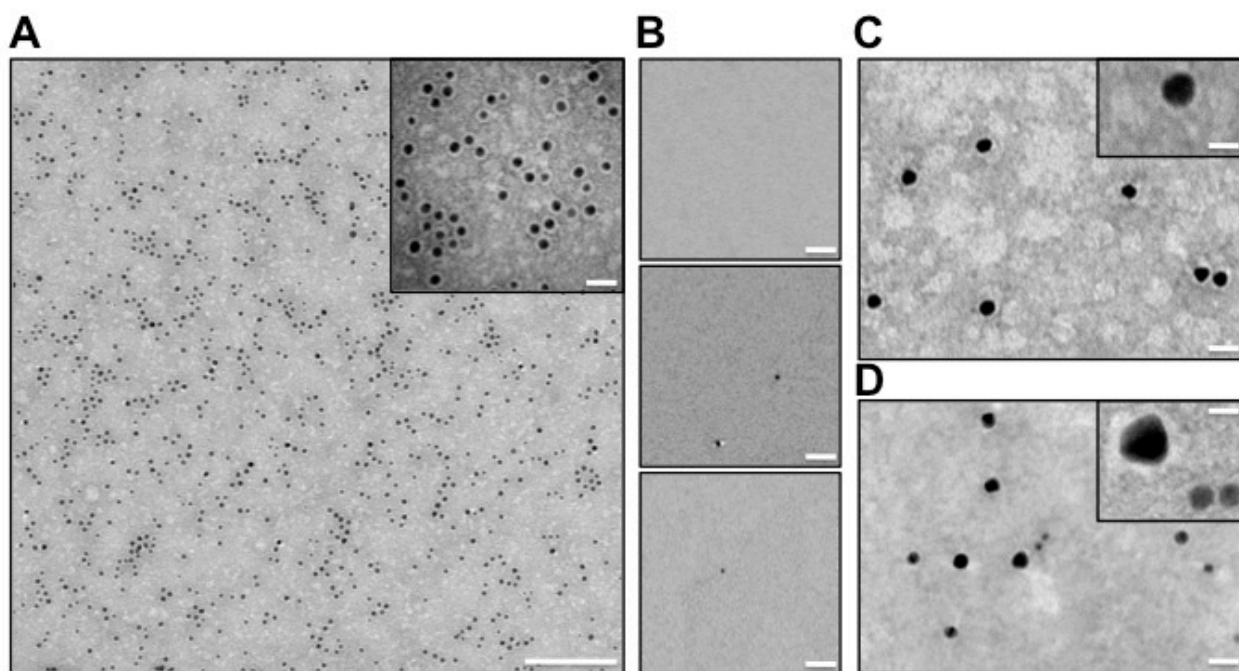
**Fig. S2.1. Refractive index increment of OGNG.** Determination from injected aliquots of OGNG at known concentrations, followed by data processing with experimental methods developed by Astra 6.1 software (Wyatt technology, USA); (a) raw data and (b) data fit, respectively.



**Fig. S2.2. Negative-stain EM 2D class averages of TraE.** 2D class averages resulting from multi-reference alignment of 1061 particles. Out of 64 classes, only the 49 classes shown were populated with particles.

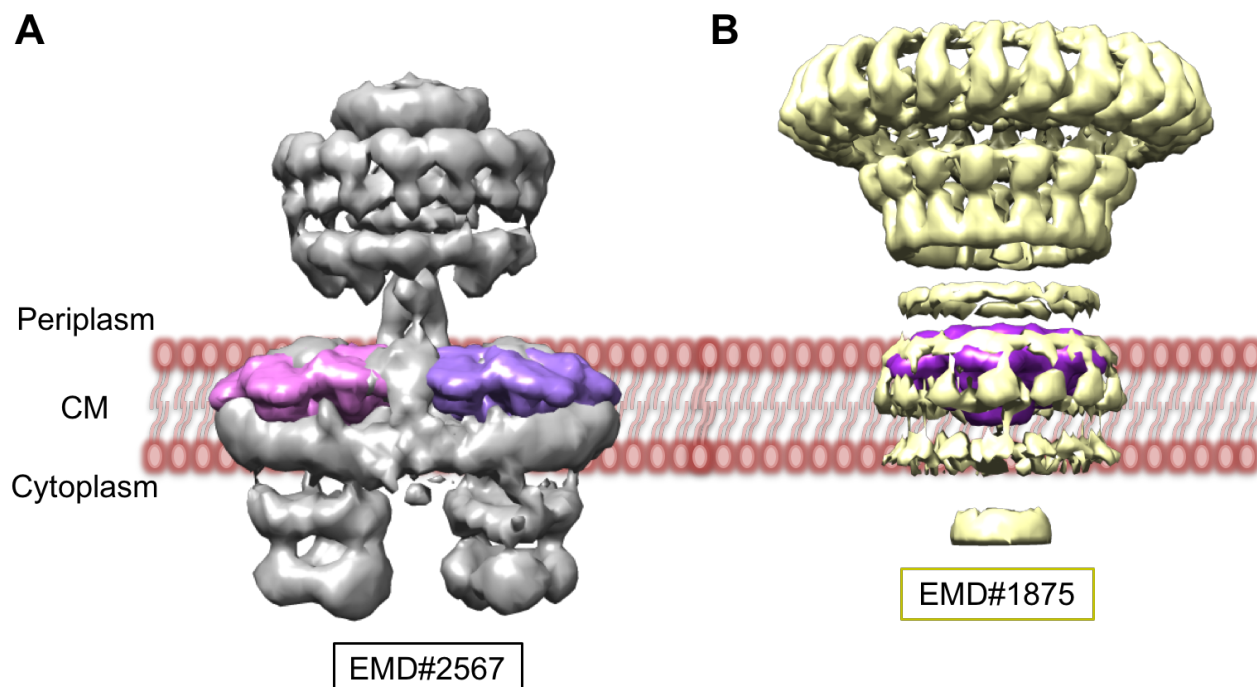


**Fig. S2.3. Negative-stain EM 2D class averages of the TraD-TraE complex.** 2D class averages resulting from multi-reference alignment of 84,236 particles. 16 classes are represented.

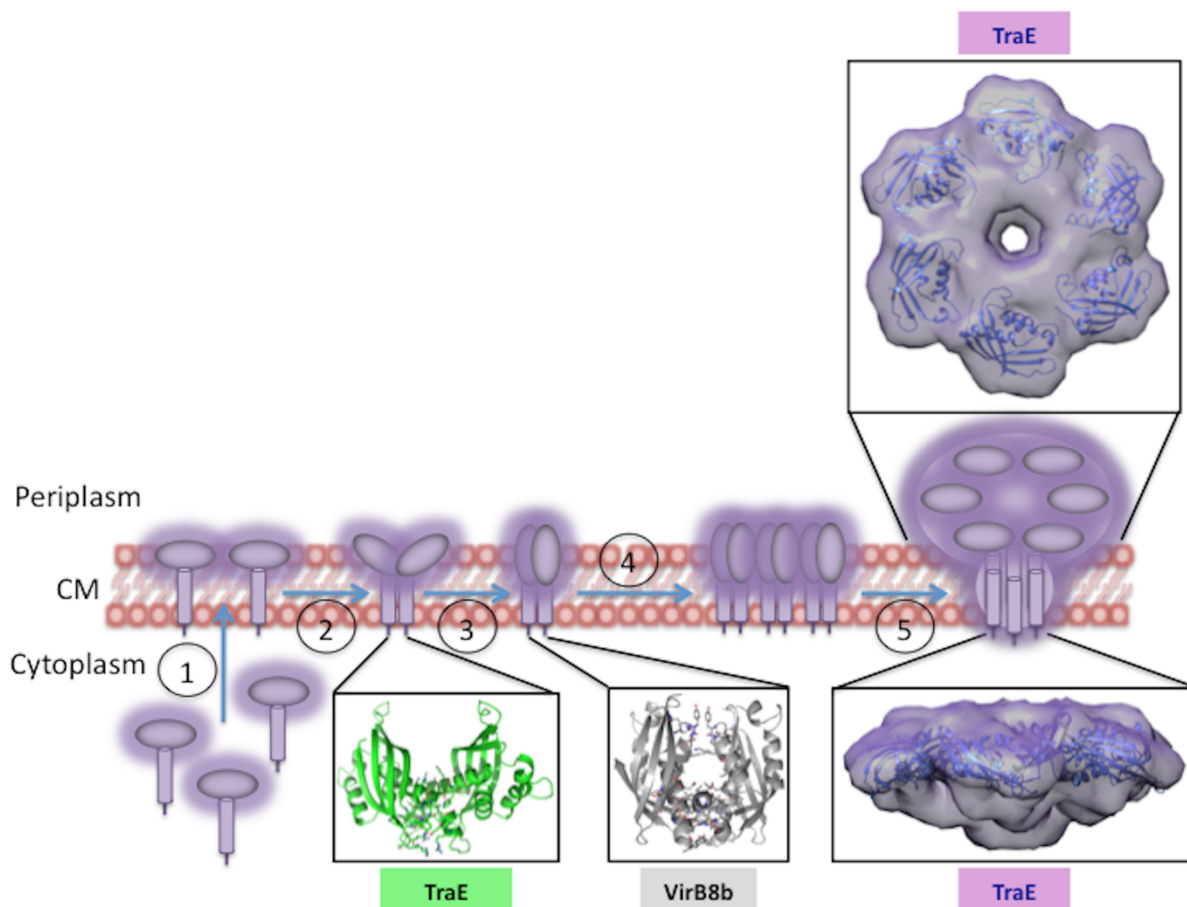


**Fig. S2.4. Negative-stain EM gold bead labeling of the TraD-TraE complex.** (a) Typical negative stain micrograph of the His<sub>6</sub>-TraD-TraE complex showing uniform white protein particles and black gold beads. His<sub>6</sub> tags at the N-terminus of TraD were specifically labeled with 5 nm Ni-NTA nanogold beads on the grid, followed by negative staining with 1.5% uranyl formate; scale bar 500 Å; inset on the top right corner corresponds to an image collected at ~1,000,000 x; scale bar 15 Å. (b) Negative controls for non-specific labeling with 5 nm Ni-NTA nanogold beads: buffer (top), bovine serum albumin (center) and ovalbumin (bottom); scale bar 150 Å. (c) Detection of TraE with TraE-specific rabbit antiserum (dilution 1:4000) and 10 nm nanogold beads-coupled protein A on the grid, followed by negative staining with 1.5% uranyl formate; scale bar 30 Å. Inset of the top right corner, image collected at ~1,000,000 x; scale bar 10 Å. (d) Double labeling of His<sub>6</sub>-tags at the N-terminus of TraD with 5 nm Ni-NTA nanogold beads and of TraE with TraE-specific antiserum (dilution 1:4000) with 10 nm nanogold beads-

coupled protein A on the grid, followed by negative staining with 1.5% uranyl formate; scale bar 30 Å. Inset on the top right corner, image collected at ~1,000,000 x; scale bar 7.5 Å.



**Fig. S2.5. Superposition of the TraE structure on T4SS and T3SS complex structures.** (a) T4SS<sub>3-10</sub>-EM structure (EMD#2567, grey) (Low et al., 2014a) superposed with two TraE envelopes (SASDB#75, pink and purple). (b) T3SS-EM structure (EMD#1875, yellow) (Schraidt & Marlovits, 2011) superposed with one TraE envelope (purple).



**Fig. S2.6. Model of the assembly of VirB8-like proteins.** Monomers pass through the cytoplasmic membrane (CM) using the standard secretion pathway. The proteins first form a dimer with an open-shape periplasmic domain as seen in the X-ray structure of TraE (PDB#5197) (Casu et al., 2016). The periplasmic domain of TraE then undergoes a conformational change leading to a closed conformation as observed in the X-ray structure of VirB8b (PDB#4AKZ) (Terradot et al., 2005a) and dimers then multimerize to form an hexameric complex (SASDB#75).