

Université de Montréal

**Analyse du rôle de l'interaction de VirB6 avec VirB10 dans
le système de sécrétion de type IV**

par **MARY Charline**

Département de biochimie et médecine moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D.)

en **Biochimie et Médecine moléculaire**

Avril 2018

©, MARY Charline, 2018

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Analyse du rôle de l'interaction de VirB6 avec VirB10 dans le système de sécrétion de type IV

Présentée par :

Charline Mary

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Pascal Chartrand, président-rapporteur
Christian Baron, directeur de recherche
Nazzareno D'Avanzo, membre du jury
Laurent Terradot, examinateur externe
Mohamed Benderdour, représentant du doyen

Résumé

Les maladies infectieuses sont un problème majeur au niveau mondial. La propagation de ces maladies ainsi que les résistances aux traitements sont en partie dues au fait que plusieurs pathogènes bactériens utilisent des complexes multiprotéiques, tels que les systèmes de sécrétion de type IV (T4SSs), pour transférer des macromolécules directement dans d'autres cellules. Les T4SSs sont importants pour deux raisons fondamentales : l'échange génétique et le transfert d'effecteurs dans la cellule hôte. Ces fonctions permettent l'adaptation des pathogènes aux changements d'environnement et entraînent la perturbation des mécanismes de défense de l'hôte. Les T4SSs sont typiquement composés de 12 protéines (VirB1-VirB11, VirD4) qui peuvent être divisées en trois groupes, les composants du pilus, du pore central et les ATPases.

Mon sujet de doctorat est focalisé sur VirB6, une protéine membranaire essentielle du T4SS, et en particulier sur son interaction avec VirB10, afin d'établir son rôle dans la structure et la fonction des T4SSs. Grâce à notre première publication, suggérant une interaction entre ces protéines, nous avons pu émettre l'hypothèse principale : VirB6 interagit avec VirB10 dans le but de transférer les substrats dans la partie périplasmique du T4SS et de recruter le complexe VirB2/VirB5, permettant ainsi l'assemblage du pilus et le transfert du substrat.

Pour tester cette hypothèse, nous utilisons une approche en trois volets dans le but d'obtenir des informations sur ces interactions ainsi que leurs rôles fonctionnels. Premièrement, une mutagenèse dirigée a été réalisée sur VirB6, puis les conséquences pour l'interaction avec VirB10 ont été évaluées par une analyse de double hybride bactérien afin de connaître les résidus spécifiques impliqués dans l'interaction. Ensuite, une fois les résidus spécifiques identifiés, les effets sur la complémentation ont été testés en utilisant des essais *in vivo* avec les modèles des T4SSs d'*Agrobacterium tumefaciens* et de pKM101. Enfin, nous avons surexprimé et purifié VirB6 pour effectuer une caractérisation structurale *in vitro*, notamment par SAXS, microscopie électronique et diverses méthodes biochimiques.

Comprendre comment ces systèmes permettent aux bactéries d'envahir leurs hôtes et de survivre est essentiel au développement de nouveaux traitements antimicrobiens. Il est indispensable de comprendre les détails moléculaires des interactions protéine-protéine pour évaluer leurs dynamiques et leurs fonctions au sein de ces machineries. Une meilleure vue d'ensemble permettra une compréhension plus précise du mécanisme de ces systèmes facilitant ensuite la recherche d'inhibiteurs qui pourraient améliorer le traitement de maladies infectieuses.

Mots-clés : *Agrobacterium tumefaciens*, système de sécrétion de type IV, interaction protéine-protéine, protéines membranaires, VirB6, VirB10, fonctionnalité, virulence

Abstract

Infectious diseases are a major problem worldwide. Propagation and resistance to treatment are partly due to the fact that several bacterial pathogens use multiprotein complexes, such as type IV secretion systems (T4SSs), to deliver macromolecules directly to other cells. T4SSs are important for two fundamental reasons: the genetic exchange of plasmid DNA and the transfer of effectors in the target cell. These functions allow adaptation of pathogens to environmental changes and disruption of host defense mechanisms. T4SSs are typically composed of 12 proteins (VirB1-VirB11, VirD4) that can be divided into three groups, the pilus components, the central pore and the ATPases.

My Ph.D. research is focused on VirB6, an essential membrane protein of the T4SS, and in particular on its interaction with VirB10, to define its role for the structure and function of T4SS. In our first publication, we showed an interaction between these proteins leading to the main hypothesis: VirB6 interacts with VirB10 to deliver the substrates to the periplasmic components of the T4SS and to recruit VirB2/VirB5 complex, enabling pilus assembly and substrate transfer.

To test this hypothesis, we used a three-pronged approach to obtain information on these interactions and on their functions. Firstly, site-directed mutagenesis was performed on VirB6 and we then evaluated the consequences on the interaction with VirB10 using the bacterial two-hybrid assay to identify the specific residues involved in the interaction. Then the effects of changes of these residues on complementation were tested using *in vivo* assays with the *Agrobacterium tumefaciens* and pKM101 T4SSs. Finally, we overexpressed and purified VirB6 for *in vitro* structural characterization, including SAXS, electron microscopy and various biochemical methods.

Understanding how these systems allow bacteria to invade hosts and survive is critical for the development of new antimicrobial treatments. It is essential to understand the molecular details of protein-protein interactions to evaluate their dynamics and their functions within these machineries. Better mechanistic insights into these systems will enable targeted

inhibitor design that may lead to improved treatment of infectious diseases.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, type IV secretion system, protein-protein interaction, membranes proteins, VirB6, VirB10, functionality, virulence

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des abréviations	xiv
Remerciements	xviii
Chapitre I – Introduction	1
I.1 – Maladies infectieuses et résistance aux antimicrobiens	1
I.2 – Classifications des systèmes de sécrétion de type IV	3
I.2.1 – Classification type IVA, IVB, « autres » ou IVC	3
I.2.1.1 – Systèmes de sécrétion de type IVA	4
I.2.1.2 – Systèmes de sécrétion de type IVB	5
I.2.1.3 – Les « autres »	5
I.2.1.4 – Systèmes de sécrétion de type IVC	6
I.2.2 – Classification fonctionnelle	6
I.2.2.1 – Systèmes de conjugaison	6
I.2.2.2 – Systèmes de transport de protéines effectrices	7
I.2.2.3 – Systèmes de libération ou d’absorption de l’ADN	7
I.2.3 – Classification selon l’incompatibilité plasmidique.....	8
I.2.3.1 – T4SSs type F.....	8
I.2.3.2 – T4SSs type P.....	8
I.2.3.3 – T4SSs type I	9
I.3 – Bases moléculaires de l’infection par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	9
I.3.1 – Introduction à la biologie d’ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	9
I.3.2 – Mécanisme de reconnaissance des plantes blessées par les bactéries	10
I.3.3 – Organisation générale du plasmide Ti	12
I.3.3.1 – Région <i>rep</i>	14

I.3.3.2 – Régions <i>tra</i> et <i>trb</i>	14
I.3.3.3 – Région <i>vir</i>	15
I.3.3.4 – Région T	15
I.3.3.5 – Régions <i>acc</i> et <i>noc</i>	16
I.4 – Formation du complexe du T4SS et transfert de substrats	17
I.4.1 – Système de sécrétion de type IV.....	17
I.4.1.1 – Protéines VirB	17
I.4.1.1.1 – Composants énergétiques	18
I.4.1.1.2 – Transglycosilase lytique	21
I.4.1.1.3 – Composants du canal transmembranaire	22
I.4.1.1.4 – Composants du pilus	26
I.4.1.2 – Cascade d’assemblage pour la formation du T4SS	28
I.4.1.3 – Structure du T4SS.....	29
I.4.2 – Transfert du substrat (ADN et protéines effectrices).....	32
I.5 – Objectifs de la thèse	36
I.6 – Justification des méthodes utilisées.....	37
I.6.1 – Biologie moléculaire.....	37
I.6.1.1 – « Phage display ».....	37
I.6.1.2 – Double hybride bactérien	37
I.6.1.3 – Transfert d’énergie entre molécules fluorescentes	38
I.6.1.4 – Alanine « scanning »	38
I.6.1.5 – Extraction des complexes	39
I.6.1.6 – Isolation des pili	39
I.6.1.7 – Induction de tumeurs sur les plantes	39
I.6.1.8 – Chromatographie d’exclusion stérique.....	40
I.6.1.9 – « Crosslink ».....	40
I.6.2 – Biologie structurale.....	40
I.6.2.1 – Microscopie électronique à transmission	40
I.6.2.2 – Microscopie à fluorescence à super résolution.....	41
I.6.2.3 – Dichroïsme circulaire	41

Chapitre II – Premier article scientifique.....	42
II.1 – Introduction	44
II.2 – Results and Discussion.....	45
II.2.1 – Analysis of the topology of VirB6	45
II.2.2 – VirB10-interacting domains of VirB6 identified by phage display	46
II.2.3 – The VirB6 N-terminal domain interacts with VirB10 <i>in vivo</i>	47
II.2.4 – The VirB6 N-terminal domain interacts with VirB10 <i>in vitro</i>	48
II.2.5 – VirB6 peptides that interact with VirB10 or VirB8 do not disrupt the VirB8 and VirB10 interactions.....	48
II.3 – Materials and Methods.....	49
II.3.1 – Plasmid, strain constructions and mutagenesis	49
II.3.2 – Cultivation of bacteria.....	50
II.3.3 – Purification of fusion proteins.....	50
II.3.4 – Determination of the localization of the VirB6 C-terminus.....	50
II.3.5 – Phage display.....	51
II.3.6 – SDS/PAGE and Western blotting	51
II.3.7 – Bacterial two-hybrid assay (BTH)	52
II.3.8 – Protein labeling	52
II.3.9 – Fluorescence measurements.....	52
II.4 – Acknowledgements.....	53
II.5 – References	53
II.6 – Legends to figures	55
II.7 – Figures.....	58
II.8 – Supplementary informations	64

Chapitre III – Deuxième article scientifique	68
III.1 – Introduction	71
III.2 – Results.....	72
III.2.1 – Analysis with the bacterial two-hybrid system to identify residues of VirB6 involved in the VirB6/VirB10 interaction	72
III.2.2 – Effect of changes in the N-terminus of VirB6 on the stability of T4SS components	73
III.2.3 – VirB6 and its variants localize in the membrane and show polar localization ...	74
III.2.4 – Effect of changes in the N-terminus of VirB6 on the stability of T4SS membrane protein complexes	74
III.2.5 – Effect of changes in the N-terminus of VirB6 and TraD on T4SS functions	75
III.3 – Discussion	76
III.4 – Experimental procedures.....	79
III.4.1 – Plasmid construction and DNA modification procedure	79
III.4.2 – Bacterial two-hybrid assay (BTH)	79
III.4.3 – SDS/PAGE, native gel and western blot.....	80
III.4.4 – Bacterial growth and virulence gene induction	81
III.4.5 – Colloidal gold labeling assays	81
III.4.6 – Fluorescence assays	82
III.4.7 – Isolation of membranes and detergent extraction	82
III.4.8 – Isolation of T-pilus.....	83
III.4.9 – Virulence assays.....	83
III.4.10 – Conjugation assays.....	84
III.5 – Acknowledgements	84
III.6 – References	84
III.7 – Legends to figures.....	87
III.8 – Figures	91
III.9 – Supplementary informations.....	100

Chapitre IV – Données supplémentaires	104
IV.1 – Introduction.....	104
IV.2 – Résultats et discussion	105
IV.2.1 – Expression, purification et caractérisation de VirB6b grâce aux détergents	105
IV.2.2 – Expression, purification et caractérisation de VirB6b grâce au plasmide d’expression SIMPLEx.....	108
IV.3 – Conclusion	113
IV.4 – Matériels et méthodes	114
IV.4.1 – Souches et plasmides	114
IV.4.2 – Dichroïsme circulaire.....	114
IV.4.3 – HisTag-VirB6b et MBP-VirB6b-ApoAI-HisTag expression et purification ...	114
IV.4.4 – Gels SDS-PAGE, gels natifs et immunobuvardages	115
IV.4.5 – « Crosslink ».....	116
IV.4.6 – Microscopie électronique à transmission.....	116
Chapitre V – Discussion	117
V.1 – Analyse des interactions et de la structure de VirB6	117
V.2 – Analyse du rôle fonctionnel des interactions de VirB6.....	120
V.3 – Modèle d’assemblage des différents complexes du T4SS	123
Chapitre VI – Conclusion.....	127
Bibliographie	128
Annexe I	i

Liste des tableaux

Chapitre II – Premier article scientifique

Table II.1 : Bacterial strains and plasmids 64

Table II.2 : Unique peptides isolated from the libraries Ph.D.-C7C or Ph.D.-12 66

Chapitre III – Deuxième article scientifique

Table III.1 : Bacterial strains and plasmids 100

Liste des figures

Chapitre I - Introduction

Figure I.1 : Représentation schématique des systèmes de sécrétion de type IVA, IVB et IVC.	4
Figure I.2 : Représentation schématique du système ChvE/VirA/VirG.....	12
Figure I.3 : Représentation schématique du plasmide Ti de la souche <i>A. tumefaciens</i> C58, pTiC58.	13
Figure I.4 : Représentations en ruban des structures cristallographiques des homologues de VirB11.....	20
Figure I.5 : Représentations en ruban de la structure cristallographique d'un homologue de VirD4.	21
Figure I.6 : Représentations en ruban de la structure cristallographique d'un homologue de VirB8.....	24
Figure I.7 : Représentations en ruban des structures cristallographiques des homologues de VirB7, VirB9 et VirB10.....	26
Figure I.8 : Représentation en ruban de la structure cristallographique d'un homologue de VirB5.....	28
Figure I.9 : Représentation de l'architecture du T4SS.	31
Figure I.10 : Représentation schématique du transfert du substrat dans le T4SS.	33
Figure I.11 : Représentation schématique des différentes étapes menant au passage du substrat et l'intégration du brin-T dans la cellule hôte.	35

Chapitre II – Premier article scientifique

Figure II.1 : Predicted topology of VirB6.	58
Figure II.2 : Localization of VirB6 C-terminus.	59
Figure II.3 : Identification of VirB10 binding peptides by phage display.	60
Figure II.4 : In vivo analysis of VirB6 and VirB10 interactions using bacterial two hybrid assay.	61
Figure II.5 : Fluorescence resonance energy transfer between VirB6-derived peptides and VirB10.	62
Figure II.6 : Fluorescence resonance energy transfer between VirB10, VirB8 and VirB6-derived peptides.	63

Chapitre III – Deuxième article scientifique

Figure III.1 : Results of bacterial two hybrid analysis to assess the interactions of VirB10b with variants of VirB6b(1-168).	91
Figure III.2 : Sequence alignment between VirB6b, VirB6a and TraD.	92
Figure III.3 : VirB proteins levels in strains C58 and CB1006 after complementation with VirB6a and its variants.	93
Figure III.4 : Immunogold labeling using VirB6-specific antisera to localize Virb6-WT and its variants in <i>A. tumefaciens</i>	94
Figure III.5 : Structural illumination microscopy of sfGFP-fused VirB6a and its variants.	95
Figure III.6 : Native gel electrophoresis to separate detergent-extracted VirB protein complexes.	96
Figure III.7 : Analysis of the formation of T-pili.	97
Figure III.8 : Virulence and conjugation assays.	98
Figure III.9 : Model for the role of the VirB6-VirB10 interaction for T4SS assembly.	99

Chapitre IV – Données supplémentaires

Figure IV.1 : Représentation des données obtenues par dichroïsme circulaire pour HisTag-VirB6b.....	106
Figure IV.2 : Données biochimiques préliminaires de purification de HisTag-VirB6b.	107
Figure IV.3 : Expérience de « crosslink » avec HisTag-VirB6b.....	108
Figure IV.4 : Représentation de l’enveloppe SAXS d’une protéine fusion MBP-protéine membranaire-ApoAI-HisTag.....	109
Figure IV.5 : Représentation des données obtenues par dichroïsme circulaire pour MBP-VirB6b-ApoAI-HisTag.....	110
Figure IV.6 : Données biochimiques préliminaires de purification de MBP-VirB6b-ApoAI-HisTag.....	111
Figure IV.7 : Expérience de « crosslink » avec MBP-VirB6b-ApoAI-HisTag.	112
Figure IV.8 : Visualisation de MBP-VirB6b-ApoAI-HisTag en microscopie électronique à transmission en coloration négative.....	113

Chapitre V – Discussion

Figure V.1 : Figure récapitulative des résultats obtenus pour le deuxième article scientifique.	121
---	-----

Liste des abréviations

Å	Ångström
AAA	« ATPases associated with diverse cellular activities »
AC	Adénylate cyclase
Acc	« Agrocinopine catabolism »
ADN	Acide désoxyribonucléique
AHL	N-acyl-homosérine lactone
AIA	Acide indole-3-acétique
AMP	Adénosine monophosphate
ApoAI	« Apolipoprotein A-I »
AS	Acétosyringone
ATP	Adénosine triphosphate
BTH	« Bacterial two hybrid »
Cag	« Cytotoxin associated gene »
CCD	« Charge Coupled Device »)
CD	« Circular dichroism »
CFU	« Colony-forming units »
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
Chv	« Chromosomal virulence »
Com	Competence
CTCF	« Corrected total cell fluorescence »
Cryo	Cryogénique
Da	Dalton
DDM	n-dodecyl β -D-maltoside
DM	Decyl- β -D-maltoside
DMNG	Decyl maltose neopentyl glycol
DMSO	Diméthylsulfoxyde
Dot/Icm	« Defective in organelle trafficking »/« Intracellular multiplication »
DSS	Disuccinimidyl subérate
Dtr	« DNA transfer and replication »

EDTA	Éthylène diamine tétra-acétique
FRET	« Fluorescence resonance energy transfer »
GFP	« Green fluorescence protein »
HisTag	« Histidine tag »
IAM	Indole-3-acétamide
ICE	« Integrative and conjugative elements »
ILA	Indole-3-lactate
IMP	« Inner membrane protein »
Inc	Incompatibilité
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
ITC	« Isothermal titration calorimetry »
LAC	Lactose
LB	« Lysogeny Broth »
LMNG	Lauryl maltose neopentyl glycol
MBP	« Maltose-binding protein »
MET	Microscopie électronique à transmission
Min	Minute
Mpf	« Mating pair formation »
MST	« Microscale thermophoresis »
NBS	« Nucleotide-binding site »
NFT2	« Nuclear transport factor 2 »
nm	Nanomètre
Noc	« Nopaline catabolism »
NTP	Nucléosides triphosphate
OC8HSL	3-oxo-octanoylhomosérine lactone
OGNG	Octyl glucose neopentyl glycol
OMS	Organisation mondiale de la santé
PDB	« Protein data based »
pH	Potentiel hydrogène
PVDF	« Polyvinylidene fluoride »
Rep	Réplication

RMN	Résonance magnétique nucléaire
SAXS	Small angle X-rays scattering
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
SEC-MALS	« Size exclusion chromatography - multi-angle light scattering »
sfGFP	« Superfolder green fluorescence protein »
SIM	« Structural illumination microscopy »
SIMPLEx	« Solubilization of IMPs with high levels of expression »
SMALP	« Styrene maleic acid lipo-particle »
SPII	Signal peptidase II
SPR	« Surface plasmon resonance »
T4CP	« Type IV coupling protein »
T4SS	« Type IV secretion system »
Ti	« Tumor-inducing »
TM	« Transmembrane »
Tra	Transfert
µm	Micromètre
TrIP	« Transfer DNA immunoprecipitation »
VBP	« VirD2-binding protein »
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VIP1	« VirE2-interacting protein 1 »
VIP2	« VirE2-interacting protein 2 »
Vir	Virulence

À ma famille et mes proches

*« La nature ne fait rien en vain »
Aristote*

Remerciements

Ce travail de doctorat a pu être réalisé en partie grâce au soutien d'un grand nombre de personnes dont la gentillesse, la bonne humeur et l'intérêt envers ma recherche m'ont permis de progresser lors de mon projet.

Tout d'abord je souhaite remercier mon directeur de thèse, Dr Christian Baron, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je lui suis reconnaissante d'avoir partagé avec moi son expertise et ses connaissances et je le remercie pour sa confiance, son accompagnement et son soutien tout au long de ce doctorat.

J'adresse également mes remerciements aux membres du jury qui auront pris le temps de soigneusement corriger et évaluer ma thèse.

Je remercie le Dr Nazzareno D'Avanzo et le Dr Jurgen Sygusch pour leurs disponibilités et leurs aides lors de mes comités. Je remercie le Dr Antonio Nanci pour l'accès à la plateforme de microscopie ainsi que pour son soutien scientifique.

Merci à tous les employés du Département de biochimie et médecine moléculaire, comme les personnes du laboratoire d'enseignement, les secrétaires, Monique, Ginette et Robert qui nous apportent une aide considérable tout au long de notre doctorat.

Je remercie grandement les membres de mon laboratoire, passés et présents, pour leur aide, leur soutien, discussions en tout genre et bonne humeur! Je pense notamment à Flore, Jon, Rodolfo, Bastien, Mahzad, Jaafar, Zakaria, Tarun et Ingrid. Un merci plus particulier à Benoit pour en plus sa patience, son écoute et ses excellents conseils.

Merci à mes amis Français et Canadiens, ceux rencontrés via l'université avec qui les discussions, sorties et soirées sont toujours excellentes, comme Alix, Dainelys, Doaa, Dominick, Emilie, Emma, Fadi, Heddy, Katia, Lian, Mathieu(s), Nizam et Sam, (+conjoints!).

Et bien sûr, ceux avec qui des liens plus particuliers ont été créés ; Benjamin, Perrine et Sophie, des amis de très longue date toujours présents malgré la distance, Camille et Hadrien (+Sarah!), merci pour tout le soutien, les gâteaux et la gentillesse, Flore et Pierre, merci pour les bons moments de détente et votre soutien, et Maxime, le Québécois Français roux, merci pour tout ton soutien, ta présence, ton écoute et tes mauvaises blagues (B).

Un grand merci à ma famille et notamment mes parents, mon frère, ma sœur, ma nièce et mes neveux. Merci de m'avoir toujours soutenue et encouragée pour tout ce que j'entreprenais. Merci d'être toujours présents malgré la distance. Merci pour votre confiance, votre tendresse et votre amour qui m'ont toujours portés.

Et enfin merci Aurélien. Merci pour tout ton soutien pendant les périodes plus dures et de doutes. Merci pour tes multiples encouragements, ton habilité à me faciliter la vie, ta bonne humeur et ton optimisme. Merci pour ta présence dans ma vie.

Chapitre I – Introduction

I.1 – Maladies infectieuses et résistance aux antimicrobiens

Les dernières années ont été marquées par l'apparition croissante de résistance aux antimicrobiens de la part de très nombreux agents pathogènes responsable de maladies infectieuses (1,2). Les maladies infectieuses ont la faculté de se propager, directement ou indirectement, d'une personne à une autre. Certaines sont transmises par le biais de morsure d'insectes ou d'animaux alors que d'autres peuvent être acquises par l'ingestion de nourriture ou d'eau contaminées, ou encore par l'exposition aux organismes dans l'environnement (3).

Les agents pathogènes en cause sont des microorganismes tels que les bactéries, les virus, les parasites ou les champignons. Ces pathogènes, soumis à la pression environnementale engendrée par les nombreux médicaments antimicrobiens utilisés en trop grande quantité (comme les antibiotiques, les antifongiques, les antiviraux, les antipaludiques et les anthelminthiques), ont dû alors s'adapter et ont développé de nombreuses résistances. Cette résistance aux antimicrobiens va poser plusieurs problèmes. Dans un premier temps, cela peut compromettre l'efficacité de la prévention et des traitements de maladies infectieuses. Sans la présence d'antibiotiques efficaces, la réussite d'interventions chirurgicales, les transplantations d'organes ou les chimiothérapies utilisées lors des cancers par exemples, pourraient être compromises (1). De plus, lors d'infections résistantes les frais des soins pour les patients atteints seront plus élevés que pour des infections non résistantes. En effet, ceci va être dû à une durée plus longue de la maladie, des examens supplémentaires et de la médication plus couteuse (1). La situation est très alarmante au vu des nombreuses résistances déjà très avancées dans certains cas comme la résistance du paludisme, du VIH, de la grippe, de la tuberculose ou de différentes bactéries comme *Klebsiella pneumoniae* ou encore *Escherichia coli*. Tout ceci est ainsi répertorié par l'organisation mondiale de la santé (OMS) (4).

Concernant plus particulièrement le cas des bactéries, suite à la découverte de la pénicilline et les recherches pour des applications thérapeutiques par Alexander Fleming, Howard Florey et Ernst Chain, et grâce à l'utilisation clinique de celle-ci et d'autres antibiotiques, il y a eu une

ère où la mortalité et la morbidité associées aux infections bactériennes avaient considérablement diminuées. Cependant de grosses inquiétudes ont récemment été émises quant à la résistance croissante aux antibiotiques et dans le même temps à la diminution de découvertes de nouvelles thérapies. Tout ceci menaçant alors de mettre fin à l'efficacité des antibiotiques cliniquement pertinents. La résistance aux antibiotiques est donc un problème international mettant en péril la santé mondiale, la sécurité alimentaire et le développement. L'OMS recommande alors plusieurs mesures pour réduire l'impact et limiter la propagation des résistances, et ceci à tous les niveaux de la société. Comme au niveau individuel en réduisant la consommation inutile d'antibiotiques, au niveau politique en contrôlant et réglementant les diverses utilisations, au niveau des professionnels de santé en faisant notamment de la prévention, au niveau agricole en s'adaptant pour donner le moins possible d'antibiotiques aux animaux et finalement au niveau des soins de santé comme l'investissement dans la recherche (2,4-6).

Les bactéries sont capables de s'adapter aux changements environnementaux grâce à différents mécanismes, comme les systèmes de sécrétion, leur permettant, entre autre, d'échanger du matériel génétique facilitant leur survie (7). Il existe différents types de systèmes de sécrétion dans différentes bactéries à Gram négatif et à Gram positif (7,8). Ces systèmes sont répartis dans différentes classes basées selon leur structure, leur fonction et leur spécificité. Dans notre cas, nous nous intéressons aux systèmes de sécrétion de type IV (« type IV secretion systems », T4SSs) retrouvés principalement chez les bactéries à Gram négatif, mais qui ont également été identifiés chez des bactéries à Gram positif (9). En février 2017, l'OMS a publié une liste de 12 bactéries pour lesquelles de nouveaux antibiotiques étaient impérativement nécessaires (10). La majorité d'entre elles possèdent un T4SS et neuf sont des bactéries à Gram négatif.

Contrairement aux bactéries à Gram positif qui ne possèdent qu'une membrane cytoplasmique, doublée d'une épaisse paroi de peptidoglycane, les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane cytoplasmique, une fine couche de peptidoglycane et une membrane externe. De par cet arrangement structural différent offrant une protection additionnelle naturelle, les bactéries à Gram négatif super résistantes sont plus inquiétantes du point de vue

de la santé humaine, cette barrière externe rend plus difficile la pénétration des composés et la plus grande prévalence de pompes à efflux participe également à la résistance (11,12). Ainsi, travailler directement sur les T4SSs présents chez ces bactéries à Gram négatif pour le développement d'inhibiteurs peut nous permettre d'atteindre les systèmes directement impliqués dans la résistance aux antibiotiques et tout ceci par d'autres moyens que les antibiotiques.

I.2 – Classifications des systèmes de sécrétion de type IV

Lors de ce doctorat nous nous intéressons à un système particulier faisant parti de la large famille des T4SSs. De manière générale, les T4SSs sont employés par le pathogène pour aider à la colonisation et sa propagation dans les cellules hôtes eucaryotes notamment grâce à la translocation d'ADN et de protéines effectrices. Les T4SSs sont également utilisés pour effectuer l'échange génétique avec d'autres bactéries, participant donc à la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques. Les T4SSs, traversant les enveloppes cellulaires, permettent alors la survie du pathogène selon les différents environnements (13,14). Grâce à leur grande polyvalence et au fait que nous les retrouvons dans de nombreuses espèces bactériennes, les T4SSs peuvent être classés en différents groupes ; selon le type IVA/IVB/« autres »/IVC, selon leur fonctionnalité ou encore selon l'incompatibilité plasmidique.

I.2.1 – Classification type IVA, IVB, « autres » ou IVC

Tout d'abord les T4SSs peuvent être classés de manière « grossière » comme type IVA (T4ASS) dépendamment si les composants structuraux ressemblent au complexe VirB/D4 du pathogène *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*), type IVB (T4BSS) si ceux-ci ressemblent au complexe Dot/Icm de *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*), les « autres » s'ils ne correspondent pas à l'une des deux classes précédentes ou type IVC récemment mise en place pour les T4SSs des bactéries à Gram positif (**Figure I.1**) (15-18).

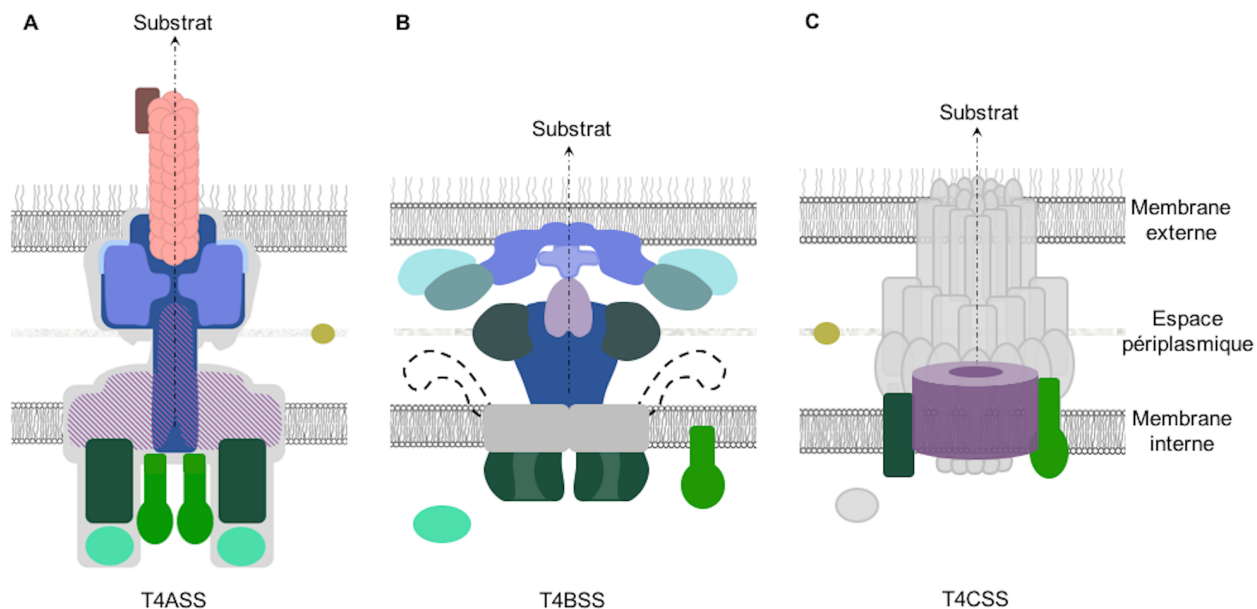


Figure I.1 : Représentation schématique des systèmes de sécrétion de type IVA, IVB et IVC.

Représentations schématiques du T4ASS et T4BSS réalisées selon les enveloppes obtenues en microscopie électronique, avec une structure traversant l'enveloppe ainsi qu'un pilus représenté en rose (19,20). Représentation schématique hypothétique du T4CSS inspirée de Zhang *et al.*, 2012 (18).

I.2.1.1 – Systèmes de sécrétion de type IVA

Le modèle T4ASS a été défini à l'origine pour *A. tumefaciens*, une bactérie infectant les plantes et responsable de la formation de galles de collet sur celles-ci (21-23). Les membres de ce groupe partageront donc des caractéristiques communes, par rapport à la composition de leur T4SS, avec *A. tumefaciens*. Les informations permettant la formation de ce système sont codées par plusieurs gènes présents sur un même plasmide, le plasmide Ti (« tumor-inducing ») dans le cas de *A. tumefaciens* (21). Ce plasmide comprend les gènes codant le complexe VirB/VirD4, composé de 11 protéines VirB (VirB1 à VirB11), une protéine de couplage (« type IV coupling protein », T4CP) et le complexe du relaxosome (complexe nucléoprotéique, VirD1, VirD2, VirC) (24,25). Tout ceci permet l'élaboration d'une structure traversant l'enveloppe ainsi qu'un pilus (**Figure I.1A**). L'ensemble permet alors l'attachement avec la cellule hôte et ensuite la sécrétion du substrat (ADN et protéines effectrices) (17,26).

La formation de ce système se fait en réponse à la perception d'un signal environnemental comme par exemple pour *A. tumefaciens* où le système à deux composants VirA/VirG régule l'expression des gènes de virulence en réponse aux signaux provenant de plusieurs classes moléculaires (phénol, pH et sucre) (21,26-28). Dans ce groupe nous retrouvons *A. tumefaciens*, *Brucella suis* (*B. suis*) et le plasmide pKM101 chez *Escherichia coli* (*E. coli*), trois modèles d'étude utilisés dans cette thèse.

I.2.1.2 – Systèmes de sécrétion de type IVB

Ce groupe de T4SSs ressemble au complexe Dot/Icm (« defective in organelle trafficking » / « intracellular multiplication ») de *L. pneumophila*, une bactérie intracellulaire facultative causant la légionellose, allant d'une forme bénigne, la fièvre de Pontiac, à une forme grave de pneumonie, la maladie du légionnaire (29). Ce complexe Dot/Icm est composé d'environ 27 protéines dont plus de 20 sont spécifiques à la machinerie IVB et seulement quelques-unes partagent quelques similarités avec celles du complexe VirB/D4 (20). Ce système permet le passage de plus de 300 protéines effectrices de *L. pneumophila* dans la cellule hôte (**Figure I.1B**) (30,31). Il est considéré comme un T4SS dû à ces différentes caractéristiques mais également de par sa ressemblance avec les systèmes conjugatifs des plasmides IncI. Pour *Legionella* et quelques autres exemples, les gènes codant pour le type IVB ont tendance à se rassembler dans plusieurs « clusters » de gènes conservés tous localisés dans un seul endroit sur le chromosome, alors que pour presque tous les autres IVB ces gènes sont codés par des plasmides (29). Dans ce groupe nous retrouvons notamment un pathogène zoonotique, *Coxiella burnetii*, et un pathogène arthropode, *Rickettsiella grylli*.

I.2.1.3 – Les « autres »

Nous retrouvons dans ce groupe les T4SSs qui ne correspondent ni aux systèmes du type IVA ni à ceux du type IVB. Ce groupe contient par exemple la lignée de T4SSs récemment identifiée sur l'îlot génomique ICEHin1056, élément responsable de la résistance aux antibiotiques chez *Haemophilus influenza*, et ce T4SS serait responsable de la dissémination de cet îlot (32-34).

I.2.1.4 – Systèmes de sécrétion de type IVC

Ce type de T4SSs a récemment été mis en évidence dans les espèces bactériennes à Gram positif dont le système a une organisation différente des types IVA et IVB. En effet, VirB1, VirB4, VirB6 et VirD4 semblent être les composants clés minimaux de ce type de systèmes de sécrétion parfois aussi appelé T4SSs « minimisés » ou « minimaux » (**Figure I.1C**) (18,35).

I.2.2 – Classification fonctionnelle

La classification précédente permet une classification structurale des T4SSs, ainsi des T4SSs avec une fonctionnalité différente peuvent se retrouver dans le même groupe. C'est pourquoi nous pouvons également classer les T4SSs de manière fonctionnelle afin de les définir d'une façon alternative.

I.2.2.1 – Systèmes de conjugaison

Ces systèmes sont les plus communs des T4SSs. Ils permettent le transfert d'ADN d'une cellule bactérienne à une autre par un processus appelé la conjugaison. Le processus de conjugaison contribue grandement à la plasticité du génome bactérien, en véhiculant notamment les gènes de résistance aux antibiotiques, favorisant alors la survie du pathogène ainsi que l'infection. Ces T4SSs sont codés soit par des plasmides conjugatifs, soit par des transposons conjugatifs plus couramment appelés des éléments intégratifs et conjugatifs (« integrative and conjugative elements », ICE) (36,37). Les plasmides conjugatifs sont autotransférables et codent les protéines permettant leur propre transfert d'une cellule donneuse à une receveuse (36,38). Ainsi ils possèdent toute la machinerie nécessaire qui comprend entre autre les gènes des composants du relaxosome, celui pour la T4CP et les gènes codant pour la machinerie du T4SS (38). Ces plasmides se maintiennent alors dans la cellule par réplication. Ceci diffère donc des ICEs qui s'intègrent dans un réplicon de leur hôte pour assurer leur transfert vertical. Ainsi les ICEs sont des éléments intégrés à des endroits spécifiques du chromosome qui peuvent catalyser leur propre excision en un intermédiaire circulaire, par l'action d'un complexe recombinase/excisionase (37). Les ICEs contiennent une région centrale avec des gènes codant pour les protéines du T4SS permettant le transfert dans la cellule hôte, et également une intégrase permettant la réintégration de l'ICE dans la

nouvelle cellule hôte si celle-ci n'est pas réalisée par recombinaison homologe (39,40). Ceux-ci sont transportés de la même manière que les plasmides conjugatifs impliquant également le relaxosome et la T4CP. Nous retrouvons dans ce groupe de T4SSs le système VirB/D4 d'*A. tumefaciens* dont cette fonction sera centrale pour nos études et dont nous décrirons le principe plus précisément par la suite.

I.2.2.2 – Systèmes de transport de protéines effectrices

Cette sous famille est la seconde plus large des T4SSs connus. Dans ce groupe les T4SSs permettent de délivrer des protéines effectrices ou d'autres macromolécules directement dans le cytosol de la cellule hôte eucaryote, leur permettant la colonisation et la survie en modulant différents processus physiologiques durant l'infection. Ces T4SSs sont de plus en plus étudiés dû à leur rôle dans de nombreuses infections par des bactéries pathogènes, ces protéines effectrices étant critiques pour la virulence. Comme pour le groupe précédent, il y a un contact direct de ces T4SSs avec la cellule eucaryote afin de délivrer les substrats. Et contrairement au groupe précédent, ces systèmes n'utilisent pas de relaxase pour la préparation du substrat au transport, mais ils utilisent une T4CP pour le recrutement et le ciblage des protéines effectrices (41-43). Nous retrouvons dans ce groupe *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) qui permet le passage de l'oncoprotéine CagA, *B. suis* et *Bordetella pertussis* (44).

I.2.2.3 – Systèmes de libération ou d'absorption de l'ADN

Ces systèmes constituent un petit groupe de la famille des T4SSs connus. Ils permettent le passage d'ADN vers ou à partir du milieu extracellulaire sans contact avec une autre cellule. Comme pour les systèmes de conjugaison, ces systèmes favorisent l'échange génétique et donc une survie accrue lors de l'infection. Ce groupe de T4SSs comprend le système de libération d'ADN chez *Neisseria gonorrhoeae* et deux systèmes d'importation d'ADN, le système Cjp/VirB de *Campylobacter jejuni* et le système ComB d'*H. pylori* (45). Plusieurs autres bactéries réalisent un processus d'importation d'ADN exogène de l'environnement et de son insertion dans leurs chromosomes. Cependant, cette importation est souvent corrélée avec la présence d'un pilus de type IV (machinerie reliée au système de sécrétion de type II) (46,47). Ce groupe de T4SSs ne comprend pas de relaxosome ou de T4CP (25,46).

I.2.3 – Classification selon l’incompatibilité plasmidique

Cette classification était la première existante et permet de répartir les T4SSs selon la classe d’incompatibilité (Inc) de leur plasmide. L’incompatibilité plasmidique signifie que des plasmides appartenant à la même classe d’incompatibilité ne pourront pas coexister dans la même bactérie (48). Ce groupe est composé de 3 principaux types, les T4SSs de type F, de type P et de type I. Les types F et P peuvent être regroupés dans le type IVA et le type I dans le type IVB (33). Avec l’augmentation des données sur les T4SSs, il a été montré que de nombreux T4SSs n’étaient pas codés par des plasmides. Ainsi, même si cette classification par plasmide n’est plus suffisante nous la décrivons, celle-ci restant très utile pour comprendre nos systèmes d’étude bactériens.

I.2.3.1 – T4SSs type F

Ce type est basé sur le système décrit pour le plasmide F, nous y retrouvons alors les plasmides des groupes IncF, IncH, IncT et IncJ (49). Les T4SSs de ce type ne semblent être impliqués que dans le transfert d’ADN, il est fort probable que la relaxase accrochée à ceux-ci soit également transférée, mais mis à part celle-ci il ne semble pas y avoir de protéines passant par ce système (49). Pour ce transfert, qui peut se faire en milieu solide ou liquide, ces T4SSs élaborent un long pilus (de 2 à 20 μm), qui est flexible et rétractable et qui a un diamètre d’environ 8 nm avec un lumen central de 2 nm (50-52). L’exemple le plus connu de ces T4SSs type F est celui codé par la région *tra* du plasmide F de *E. coli* (49,53).

I.2.3.2 – T4SSs type P

Ce type est basé sur le système décrit pour le plasmide RP4, nous y retrouvons les plasmides des groupes IncP, IncN et IncW. Contrairement au type précédent, celui-ci semble sécréter une large gamme de facteurs de virulence dans la cellule hôte receveuse, comme des protéines ou des complexes nucléoprotéiques, et ce transfert serait plus efficace en milieu solide que liquide (49,52). Les pili de ce type apparaissent courts (moins de 1 μm), rigides et ont un diamètre mesurant entre 8 et 12 nm (49,54). Plusieurs exemples sont bien connus parmi ce groupe, comme le plasmide Ti de *A. tumefaciens*, le pKM101 (IncN) ou R388 (IncW) de *E. coli*.

I.2.3.3 – T4SSs type I

Ce type est basé sur le système décrit pour le plasmide R64 (IncI1). Il est souvent associé au type IVB dû au fait qu'un nombre significatif de protéines du complexe Dot/Icm sont homologues aux composants du système du plasmide IncI. Ils sont eux aussi responsables de la sécrétion de facteurs de virulence, protéines ou complexes nucléoprotéiques (49). Cependant, les plasmides IncI sont capables de faire deux types de pili, un pilus court, rigide et épais (similaire au pilus type P) qui sera utilisé en milieu solide ou liquide, et un pilus long, mince et flexible utilisé dans des milieux liquides (52).

I.3 – Bases moléculaires de l'infection par *Agrobacterium tumefaciens*

Lors de ce doctorat *A. tumefaciens* a été le modèle d'étude principal pour les tests *in vivo*. De manière générale le système VirB/VirD4 de *A. tumefaciens* est le mieux caractérisé et constitue l'archétype des T4SSs, ceci en fait alors un bon modèle d'étude pour l'obtention d'informations sur les interactions hôte/bactérie, la communication bactérienne et bien évidemment les mécanismes de virulence (55). Cet organisme est également un outil important de biotechnologie dû à sa capacité à introduire ses propres gènes dans le chromosome de la plante et ainsi à reprogrammer certains processus cellulaires, celui-ci est très utilisé pour modifier génétiquement des plantes et autres organismes (56,57). Ainsi nous développerons dans cette partie toutes les caractéristiques importantes et nécessaires à la compréhension de son fonctionnement.

I.3.1 – Introduction à la biologie d'*Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens, ou selon la nomenclature scientifique officielle *Rhizobium radiobacter*, est une bactérie retrouvée dans les sols, et plus particulièrement les sols rhizosphériques, c'est-à-dire dans les environs des racines des plantes. Ces bactéries à Gram négatifs phytopathogènes sont des bacilles d'environ 1 à 3 µm de longueur et de 0,6 à 1 µm de largeur, et en milieu solide elles vont former des colonies convexes, circulaires de couleur blanche. Leur croissance se fait à une température optimale entre 20°C et 28°C et dans des conditions aérobies. Elles seront toutefois capables de croître dans les tissus de la plante sous des conditions réduites en

oxygène. Leur présence dans la rhizosphère est corrélée avec le fait qu'elles vont principalement débiter l'infection à la base des plantes et notamment celles des dicotylédones (ou eudicotylédones) lorsqu'elles sont blessées. En effet, lors d'une blessure la plante va relâcher un large nombre de composés chimiques comme des sucres, des acides aminés et des composés phénoliques qui vont être détectés par *A. tumefaciens* qui sera attirée par chimiotaxie, ceci sera amélioré dans un environnement faible en niveaux de phosphore et un pH acide (21,58,59). Ces chimioattractants vont donc attirer la bactérie qui va se déplacer grâce à ses flagelles, ceux-ci étant arrangés circonférentiellement, en « touffe » d'environ six, près d'une extrémité plutôt que dans la partie centrale de la bactérie et tournant unidirectionnellement dans le sens des aiguilles d'une montre (58,60,61). Tous ces signaux, et notamment trois principaux ; les phénoliques (comme par exemple l'acétosyringone (AS)), les monosaccharides et le pH acide (~ 5,5), vont également permettre d'activer un ensemble de gènes, les gènes de virulence (*vir*), présents sur le plasmide Ti (62,63). *A. tumefaciens* transfère alors une partie de ce plasmide Ti, un fragment d'ADN oncogène, dans le génome de la plante et est donc responsable de la maladie appelée galle du collet. Cette maladie correspond à la formation de tumeur due à la multiplication anormale de cellules végétales créant un environnement où le pathogène se multiplie en parasitant des ressources de la plante.

I.3.2 – Mécanisme de reconnaissance des plantes blessées par les bactéries

Les signaux sont perçus par trois protéines, ChvE, une protéine périplasmique liant les sucres et codée par le chromosome bactérien, et le système à deux composants VirA/VirG codé par le plasmide Ti, l'ensemble permettant alors l'activation transcriptionnelle des gènes de virulence du plasmide Ti (64-66). Les composés phénoliques sont requis pour l'induction de l'expression des gènes *vir*, les autres signaux (comme les sucres) vont sensibiliser la bactérie aux composés phénoliques. Ainsi, en l'absence de la protéine ChvE, *A. tumefaciens* est significativement moins virulente (67). La protéine ChvE, en plus de jouer un rôle dans la chimiotaxie vis à vis de sucres spécifiques et dans leur absorption, interagit avec VirA (68). VirA est une protéine histidine kinase ancrée à la membrane grâce à deux domaines transmembranaires fonctionnant en un homodimère. Son interaction avec ChvE se fait via son domaine périplasmique, ce domaine agit comme un répresseur de fonction et la liaison de

ChvE sensibilise VirA aux composés phénoliques, lorsqu'un sucre est présent, grâce à un changement de conformation supprimant cette répression (**Figure I.2**) (64,69). Il a également été montré que ce domaine périplasmique est impliqué dans la détection du pH, ainsi l'information de la présence de sucre et de pH acide est nécessaire pour une activité maximale (63,70). VirA possède en plus une large région C-terminale divisée en différents domaines ; un domaine « linker » interagissant directement avec les composés phénoliques permettant ainsi la perception et la transduction du signal, une région kinase conservée, homologue de la famille des protéines histidine kinase, et un domaine receveur, homologue à celui de VirG et d'autres régulateurs de réponses, qui aurait un rôle de modulateur négatif du domaine kinase et donc un rôle d'inhibiteur de l'expression des gènes *vir* (62,71,72). Ainsi, VirA s'auto-phosphoryle sur l'histidine 474 et phosphoryle par la suite le régulateur de réponse VirG en transférant le phosphate sur l'acide aspartique 52 de ce dernier (**Figure I.2**) (69,73,74). VirG est une protéine cytosolique qui fonctionne comme un régulateur de réponse en se fixant à une séquence spécifique d'ADN. En effet, elle possède deux domaines fonctionnels, un domaine receveur/régulateur, qui contient le résidu acide aspartique impliqué dans son activation par VirA, et un domaine effecteur à son C-terminal, qui est un domaine de liaison à l'ADN hélice-tour-hélice se liant spécifiquement à la séquence régulatrice des gènes *vir* (73-75). Ainsi, la sensibilisation de VirA par ChvE ainsi que la présence de composés phénoliques et un pH acide permet l'autophosphorylation de VirA puis la phosphorylation de VirG induisant sa liaison sur la boîte *vir*, située en amont de chacun des promoteurs, tout ceci participant alors à l'induction des autres gènes *vir* (**Figure I.2**) (73,76).

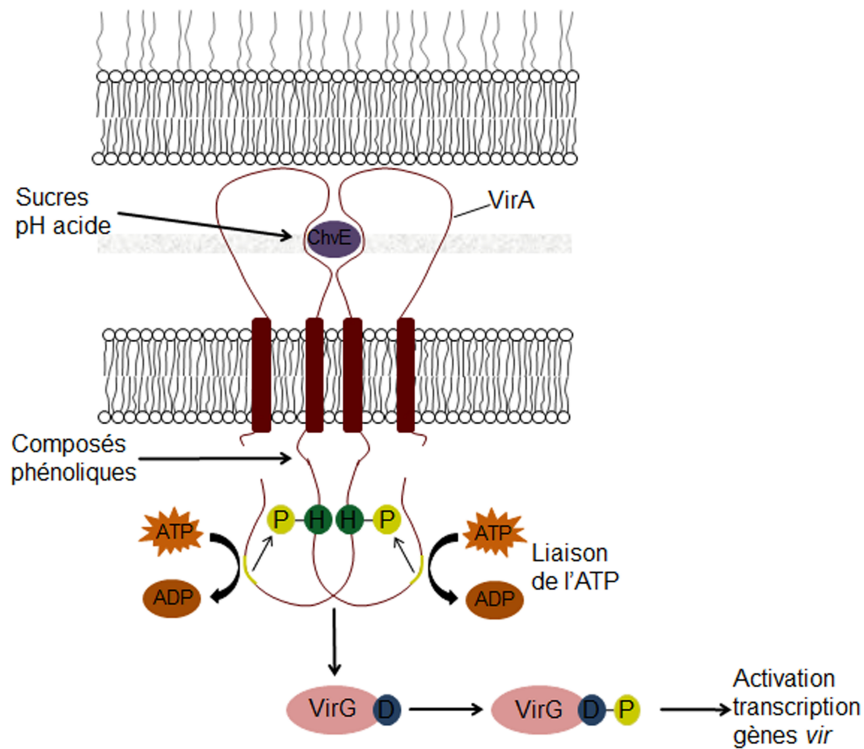


Figure I.2 : Représentation schématique du système ChvE/VirA/VirG.

Figure inspirée de McCullen and Binns, 2006 (62).

I.3.3 – Organisation générale du plasmide Ti

Dans cette thèse nous travaillons avec la souche C58 de *A. tumefaciens*, son génome consiste en un chromosome circulaire (avec une origine de répllication type *oriC*), et trois autres réplicons (avec cette fois-ci une origine de répllication type *repABC*) ; un chromosome linéaire, le plasmide pAtC58 et le plasmide pTiC58 (77-79). Les gènes *vir* sont retrouvés sur le plasmide Ti. Ainsi en plus de l'importance de ce plasmide pour la détection des signaux relâchés par la plante ou par les bactéries voisines celui-ci est important pour différentes fonctions telles que sa répllication et son maintien, le transfert conjugatif, la virulence et l'utilisation d'opines (dérivés d'acides aminés utilisés comme nutriments par le phytopathogène) (28). Ces plasmides sont considérés comme des mosaïques évolutives et ont longtemps étaient classifiés selon le type d'opines dont ils permettent le catabolisme, les deux principaux étant les types octopine et nopaline. Dans notre cas le pTiC58 est un plasmide de

type nopaline d'environ 200 kb, qui contient cinq principales régions ; la région *rep* qui est requise pour la réplique du plasmide Ti, deux régions permettant l'élaboration de systèmes pour le transfert d'ADN (régions *tra/trb* et région *vir*), la région T correspondant à l'ADN qui est transféré aux cellules de la plante et la région des gènes permettant l'importation et le catabolisme des opines (*acc* et *noc*) (**Figure I.3**) (21,28). La fonction principale de ce plasmide est due aux deux systèmes permettant le transfert d'ADN. Le système Tra/Trb effectue le transfert conjugatif du plasmide Ti (pTiC58) et le système VirB effectue le transfert du brin-T (ADN oncogène) ainsi que de plusieurs protéines effectrices (80,81).

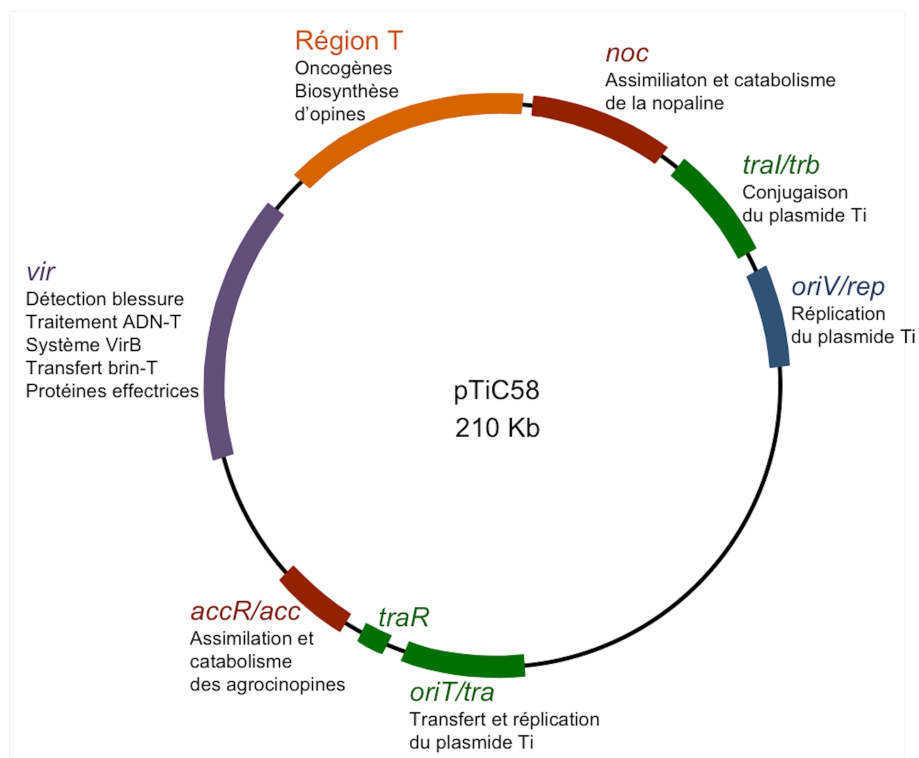


Figure I.3 : Représentation schématique du plasmide Ti de la souche *A. tumefaciens* C58, pTiC58.

Figure inspirée de Piper *et al.*, 1999 (82).

I.3.3.1 – Région *rep*

Le plasmide pTiC58 fait partie de la famille des réplicons *repABC* (83). Ainsi, RepA, RepB et les sites de partitionnements sont requis pour un héritage stable du plasmide, ils dirigent le partitionnement permettant donc à chaque cellule fille d'hériter d'au moins une copie du plasmide pendant la division cellulaire (84). RepC est une protéine initiatrice de la réplication, et avec l'origine de réplication, elle est suffisante et critique pour la réplication (84).

I.3.3.2 – Régions *tra* et *trb*

Les régions *tra* et *trb* codent pour le système Tra/Trb effectuant la conjugaison. Cependant, la conjugaison nécessite également la présence d'autoinducteurs d'*Agrobacterium*, et plus précisément d'un dérivé du N-acyl-homosérine lactone (AHL), le 3-oxo-octanoylhomosérine lactone (OC8HSL), et d'une troisième région codant pour TraR, un récepteur d'AHL (85,86). Le système Tra/Trb est codé par des gènes organisés en deux « clusters ». Le « cluster » contenant la région *tra* est composé de deux opérons (*traAFB* et *traCDG*) exprimés de manière divergente à partir d'une région promotrice intergénique centrale contenant le site *oriT*, et il code le système Dtr (« DNA transfer and replication ») qui permet le transfert répliatif (87,88). L'opéron *trb* présent sur le deuxième « cluster » code le système Mpf (« mating pair formation ») et est donc impliqué dans la synthèse de la machinerie de transfert et de pili conjugatifs, il code également pour une AHL synthase, TraI (78,88,89). Finalement, le gène *traR*, régulé par les opines qui induisent la conjugaison, code pour la protéine TraR qui est activée et stabilisée en formant un complexe avec les molécules AHL lorsqu'elles atteignent une concentration seuil correspondant à une densité de population critique. Tout cela va alors permettre l'activation transcriptionnelle de l'opéron *rep* ainsi que des opérons *tra* et *trb*, permettant alors la réplication et la conjugaison du plasmide Ti. Ainsi le système TraI-TraR est considéré comme un système de détection du quorum (« quorum sensing »), un processus de communication intercellulaire (78,90).

I.3.3.3 – Région *vir*

Les gènes de la région *vir* codent pour des protéines qui reconnaissent les signaux émis par la plante (VirA/VirG), et qui traitent et transfèrent l'ADN-T via le T4SS. La région *vir* contient huit opérons ; *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF* (récemment mis en évidence pour les souches nopaline), *virG* et *virH*, dont six (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE* et *virG*) semblent essentiels pour la pathogénicité (28,91). Le système VirB est codé par les gènes *virB* présents dans l'opéron *virB* qui contient 11 gènes (*virB1* à *virB11*) codant pour des protéines du T4SS et dont nous reviendrons plus en détail par la suite (26). Les protéines VirC1 et VirC2 codées par l'opéron *virC* ont un rôle dans l'exportation du brin-T en stimulant l'assemblage du complexe du relaxosome et en initiant le traitement de l'ADN-T (28,92). L'opéron *virD* comprend cinq gènes codant pour les protéines VirD1 à VirD5. VirD1 possède une activité topoisomérase suggérant qu'elle prépare l'ADN pour un clivage spécifique des bords de l'ADN-T par VirD2 (93). VirD2 est une relaxase qui reste liée de manière covalente au 5' du brin-T après le clivage (94). Les gènes *virD3* et *virD5* codent pour des protéines qui ne sont pas essentielles au traitement ou au transfert de l'ADN-T (95,96). VirD5 est une protéine de virulence qui, par différentes interactions avec des facteurs présents dans la cellule hôte, aide à maximiser l'efficacité de l'infection (96). *virD4*, quant à lui, code pour la protéine de couplage VirD4 qui permet le recrutement du substrat pour le passage au T4SS (97). L'opéron *virE* comprend trois gènes, *virE1* à *virE3*. VirE1 fonctionne comme une chaperonne de VirE2 en empêchant son agrégation et sa liaison au brin-T dans la bactérie et VirE2 se lie et enveloppe le brin-T dans la cellule hôte, le protégeant alors de la dégradation (98,99). VirE3, quant à elle, est transportée dans le noyau où par l'interaction avec un facteur de transcription (pBrp) elle permet l'expression de gènes responsables du développement de tumeur chez certaines plantes hôtes (100).

I.3.3.4 – Région T

Tout ceci participe au transfert du brin-T et cet ADN code pour la réalisation de deux fonctions importantes. La première est l'expression d'oncogènes nécessaires au développement de galles (production d'hormones végétales, auxine et cytokinine) et la deuxième est la production d'opines résultant en une source d'azote et de carbone pour *A.*

tumefaciens. Dans la plupart des cas, les gènes du brin-T se présentent dans l'ordre *acs-5-iaaH-iaaM-ipt-6a-6b*. Pour le plasmide pTiC58, il y a en plus le gène *nos* du côté droit et une large extension au bord gauche avec les gènes *a-b-c-c'-d-e-f* qui sont peu caractérisés (101,102). Les oncogènes correspondent aux gènes *5, iaaH, iaaM, ipt et 6b*. Le gène *5* code pour une enzyme qui catalyse la synthèse de l'indole-3-lactate (ILA), un analogue de l'auxine, à partir du tryptophane (103). Les gènes *iaaM* et *iaaH* codent respectivement pour la tryptophane monooxygénase et l'indole-3-acétamide hydrolase, la première réalise la conversion du tryptophane en l'indole-3-acétamide (IAM) et la seconde la conversion du IAM en l'acide indole-3-acétique (AIA), une auxine (102). Le gène *ipt* code pour l'isopentényl transférase, une protéine qui catalyse la condensation de l'adénosine monophosphate (AMP) et de l'isopentényl-pyrophosphate en isopentényl-AMP, une étape limitante de la biosynthèse de la zéatine (type de cytokinine) (28,104). Le gène *6b* est capable d'induire de petites tumeurs sur certaines plantes, et ceci indépendamment de la présence des autres oncogènes, et augmenterait la sensibilité des cellules de la plante aux phytohormones (28). Il y a ensuite les gènes qui codent pour des enzymes de la biosynthèse d'opines comme le gène *acs* qui code pour l'agrocinopine synthase et le gène *nos* qui code pour la nopaline synthase (105). Puis le gène *6a* qui est impliqué dans la sécrétion d'opines (106). Ainsi le transfert et l'expression des oncogènes permet la prolifération des cellules végétales transformées, ce qui se traduit par une synthèse accrue des opines. L'environnement de la tumeur est alors un environnement riche, favorable à la croissance et à la propagation de l'infection par *A. tumefaciens*.

I.3.3.5 – Régions *acc* et *noc*

Les opines sont des dérivés d'acides aminés rarement rencontrés dans les tissus sains. Elles sont produites par les cellules végétales suite à l'insertion du brin-T et sont utilisées comme nutriments par le phytopathogène. Elles vont également participer à la réplication et la dissémination du plasmide Ti vers des bactéries non pathogènes. Dans le cas du pTiC58, les opines retrouvées sont les agrocinopines qui sont des dérivés de sucres phosphodiester et la nopaline qui est le résultat de la condensation de l'arginine et de l' α -cétoglutarate (107,108). Ainsi, sur ce plasmide Ti il y a aussi les gènes codant pour le catabolisme de ces molécules, les gènes *acc* codant pour la voie d'assimilation des agrocinopines, et les gènes *noc* codant

pour celle de la nopaline. L'opéron *acc* est induit par les agrocinopines ainsi que par une limitation de phosphate et il est régulé par AccR, un régulateur transcriptionnel négatif de la famille FucR (82,109,110). La région *acc* est alors constituée du gène de régulation *accR*, ainsi que des gènes permettant l'assimilation et le catabolisme de l'agrocinopine, codant donc pour un système de transport type ABC ainsi que deux enzymes, agrocinopine phosphodiesterase et arabinose phosphate phosphatase (109,111). De plus, AccR régule le transfert conjugatif du plasmide Ti. En réponse à la présence d'agrocinopines, AccR lève la répression exercée sur l'opéron contenant le gène *traR*, TraR active alors la transcription de l'opéron *rep* ainsi que celle des opérons *tra* et *trb* (82). Les gènes *noc* sont quant à eux induits par la nopaline et sont régulés par NocR, un régulateur transcriptionnel de la famille des LysR (112). Cette région *noc* code pour plusieurs protéines permettant l'importation et la dégradation de la nopaline en proline (en passant notamment par l'arginine et l'ornithine), comme les enzymes : nopaline oxydase, arginase et ornithine cyclodéaminase (108,113,114).

I.4 – Formation du complexe du T4SS et transfert de substrats

Notre travail se focalise sur le T4SS qui est codé par les gènes *virB* présents sur la région *vir* du plasmide Ti. Les 11 protéines VirB, ainsi que la protéine de couplage VirD4 s'assemblent en un complexe macromoléculaire, le T4SS VirB/D4, permettant de traverser la membrane interne, le périplasma et la membrane externe. Dans le cas de *A. tumefaciens* cet assemblage permet le passage de substrats, comme le brin-T et des protéines effectrices, permettant alors l'infection et fournissant des nutriments aux bactéries.

I.4.1 – Système de sécrétion de type IV

I.4.1.1 – Protéines VirB

Chaque protéine VirB effectue un rôle structural et/ou dans le passage du substrat. Nous pouvons les regrouper selon leur position et fonction dans le T4SS. Ainsi nous aurons les protéines assurant l'apport énergétique, une transglycosylase lytique, les protéines du canal transmembranaire et les protéines formant le pilus.

I.4.1.1.1 – Composants énergétiques

L'énergie nécessaire à la formation du pilus ainsi que le transport du substrat est fournie par trois ATPases, VirB4, VirB11 et VirD4. VirD4 joue le rôle de protéine de couplage responsable du recrutement du substrat au canal du T4SS, alors que VirB4 et VirB11 sont quant à elles nécessaires pour la biogenèse du pilus et la translocation du substrat (115). De plus, grâce à différents essais tels que le double hybride bactérien (« bacterial two hybrid », BTH), la co-immunoprécipitation et la chromatographie d'affinité, il a été montré que ces trois protéines interagiraient et agiraient alors ensemble pour la biogenèse du pilus et le transport du substrat (115,116).

VirB4 et ses homologues sont les protéines les plus larges (>70 kDa) et les plus conservées du T4SSs (37). Elles sont généralement associées à la membrane interne et peuvent être caractérisées par deux domaines distincts importants (117). Le domaine C-terminal est très conservé entre les différentes espèces et est responsable de l'activité ATPase grâce aux motifs de liaison aux nucléosides triphosphate (NTP) Walker A et B (118-120). Et le domaine N-terminal, moins conservé, qui selon les espèces contiendrait un ou plusieurs domaines transmembranaires (121). Plusieurs états d'oligomérisation de VirB4 et ses homologues ont été rapportés ; monomérique, dimérique et hexamérique, avec la forme hexamérique apparaissant comme l'état catalytique actif (120-123). La structure de TrwK (homologue de VirB4 du plasmide R388) a par ailleurs pu être résolue par microscopie électronique, révélant un anneau hexamérique avec une structure en forme de tonneau (124). De manière globale, VirB4, et plus particulièrement le domaine de liaison aux NTP, est essentielle pour l'exportation du brin-T et la virulence (125-128). Et plus récemment il a été montré qu'elle aurait un rôle dans la biogénèse du pilus en fonctionnant comme un moteur de dislocation (d'extraction) pour extraire les pilines (protéines du pilus) de la membrane interne permettant ainsi la polymérisation du pilus (129).

VirB11 et ses homologues sont des protéines localisées du côté cytoplasmique de la membrane interne qui font partis de la superfamille des AAA+ ATPases « de trafic » en régulant l'assemblage du pilus et les étapes de transport du substrat (116). En effet, VirB11 modulerait l'activité de VirB4 lors de son rôle dans la biogénèse du pilus par l'extraction des pilines et suite à son interaction avec le substrat, elle permettrait le passage de celui-ci, ainsi que la diffusion de l'information à d'autres protéines VirB, comme notamment l'activation de VirB10 (97,129-131). Les membres de cette famille sont des hexamères structurellement dynamiques qui subissent des changements conformationnels majeurs lors de la liaison de l'ATP. Ils sont caractérisés par la présence d'un domaine N-terminal, d'un domaine C-terminal catalytique, les deux reliés par un « linker » flexible de différentes tailles selon les espèces. Ainsi, la liaison et la libération des nucléotides ont un impact sur la rigidité de la structure globale, avec notamment le domaine N-terminal pouvant pivoter par rapport au domaine C-terminal, étape essentielle à la catalyse de l'ATP (132-135). Les structures cristallographiques ayant été résolues pour VirB11 de *B. suis* (BsB11) et HP0525 (*H. pylori*) des informations plus spécifiques au niveau structural ont pu être obtenues (**Figure I.4**). Ainsi, la structure du monomère chez ces deux homologues diffère par un large domaine « swap » présent pour BsB11 (**Figure I.4A**). Ce domaine « swap » provient de l'insertion de séquences supplémentaires dans le « linker » entre les deux domaines. Pour BsB11, ceci modifie l'interface entre les différentes sous-unités dans l'hexamère et mène à la formation d'un site de liaison aux nucléotides (« nucleotide-binding site », NBS) entre le domaine N-terminal d'un monomère et le domaine C-terminal d'un autre, ayant comme conséquence la nécessité d'oligomérisation pour une activité ATPase (134). Le NBS de HP0525 va quant à lui se faire entre le domaine N-terminal et le domaine C-terminal d'un même monomère (**Figure I.4B**). Cependant, malgré cette différence, l'assemblage hexamérique conserve la même structure globale qui est en forme d'anneau (**Figure I.4**) (134,135).

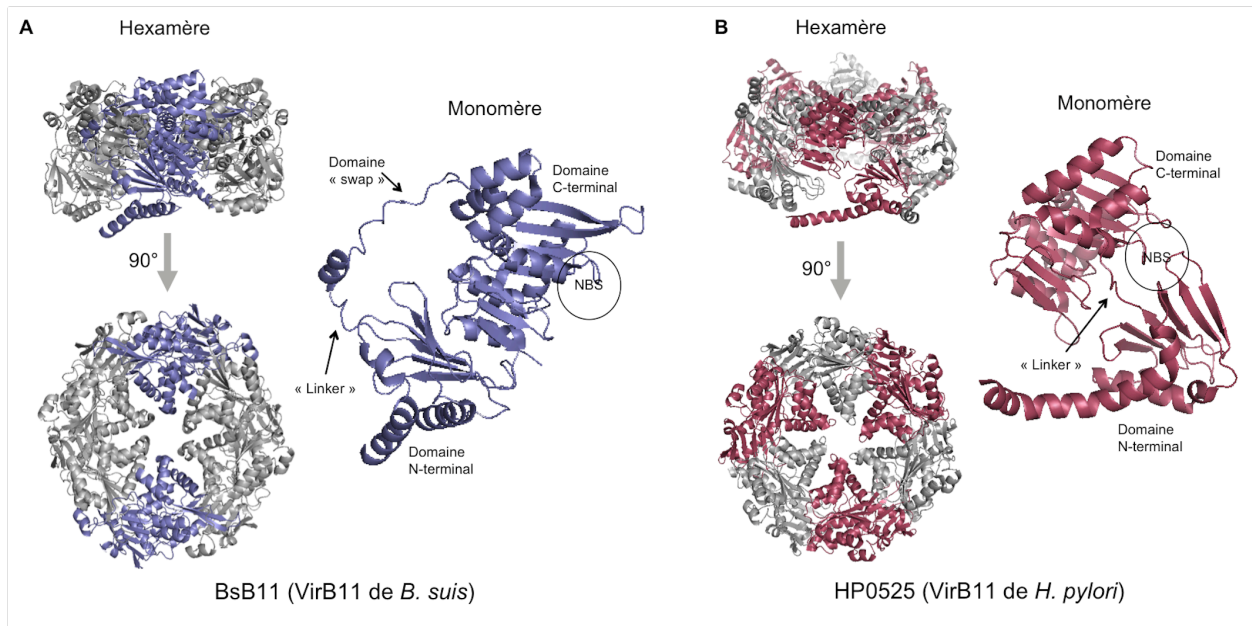


Figure I.4 : Représentations en ruban des structures cristallographiques des homologues de VirB11.

A) Hexamère et monomère de BsB11 et B) Hexamère et monomère de HP0525.

Figure réalisée à partir de la PDB : 2GZA pour BsB11 et de la PDB : 1G6O pour HP0525 (134,135).

VirD4 et les protéines de cette famille sont les protéines de couplage du T4SS (T4CP), elles vont permettre le passage du substrat en recrutant le complexe du relaxosome et le mener au T4SS, régulant alors la communication entre le substrat et le T4SS (136,137). Ces protéines sont donc essentielles pour la translocation du substrat, mais contrairement à VirB4 et VirB11 elles ne sont pas nécessaires pour la biogénèse du pilus (97,138). De plus, conjointement avec VirB11, VirD4 participe également au changement conformationnel de VirB10 (130,139,140). Par conséquent, cette interaction avec le complexe des protéines VirB ainsi qu'avec le substrat montre bien la fonction de couplage et l'importance de VirD4. Les protéines de cette famille sont de larges protéines membranaires constituées d'une large région C-terminale cytoplasmique, comprenant le domaine de liaison aux nucléotides, et d'une petite région N-terminale associée à la membrane (**Figure I.5**) (37). La protéine la plus caractérisée de cette famille est TrwB (homologue de VirD4 du plasmide R388) et pour cette protéine un équilibre monomère-hexamère a été suggéré (26,141-143). Lors de différentes études sur celle-ci il a été

montré que le domaine transmembranaire est important pour la stabilité de la structure de la protéine ainsi que pour réguler la liaison des nucléotides (142,144,145). Une caractérisation plus précise a été faite sans le domaine N-terminal montrant alors une oligomérisation et une activité ATPase dépendante et spécifique de l'ADN G-quadruplexe (143,145,146). Tout ceci renforçant alors l'idée qu'elle fonctionnerait comme une pompe à ADN, cette activité est également stimulée par TrwA (protéine de liaison à l'*oriT*) (143,146,147).

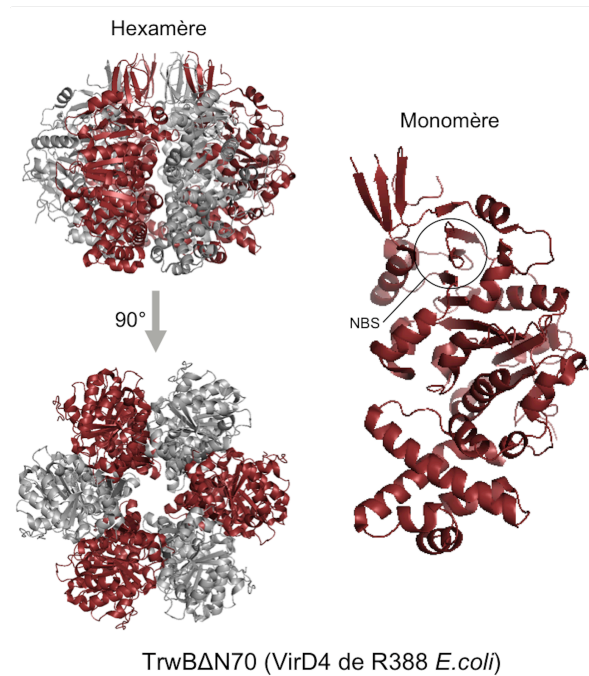


Figure I.5 : Représentations en ruban de la structure cristallographique d'un homologue de VirD4.

Trw Δ N70 signifie que le domaine transmembranaire N-terminal est absent.

Figure réalisée à partir de la PDB : 1GL7 (148).

I.4.1.1.2 – Transglycosilase lytique

Dans l'espace périplasmique des bactéries à Gram négatif se trouve une couche de peptidoglycane, structure pouvant gêner l'assemblage du T4SS. VirB1 va alors intervenir pour faciliter l'assemblage du système et aurait ainsi une fonction périplasmique. Différentes études de « crosslink », de co-immunoprécipitation ou par double hybride bactérien ont montré des interactions entre VirB1 et VirB8 ainsi qu'avec VirB4, VirB9, VirB10 et VirB11 suggérant

que ces protéines cibleraient l'activité de VirB1 au site d'assemblage du T4SS dans le périplasme (149,150). VirB1 a deux principales fonctions, la première est réalisée grâce à sa partie N-terminale et son activité de transglycosylase lytique permettant de lyser suffisamment et localement la couche de peptidoglycane pour permettre l'insertion du T4SS (149,151). La seconde est réalisée grâce à sa région C-terminale qui est clivée, donnant alors le domaine C-terminal VirB1*. VirB1* est sécrétée en dehors de la cellule et aurait un rôle dans la formation du pilus et/ou dans le contact avec la cellule receveuse (149,151). Malgré ce rôle, VirB1 n'est pas essentielle à la sécrétion puisque la délétion des autres *virB* abolit le transfert du substrat tandis que la délétion de *virB1* réduit la virulence, mais ne l'abolit pas (152). Pour obtenir une virulence de type sauvage les deux régions de VirB1 sont nécessaires, en effet la complémentation de la délétion du gène *virB1* avec l'une ou l'autre restaure partiellement la virulence, les deux ayant alors une fonction indépendante sur celle-ci (153).

I.4.1.1.3 – Composants du canal transmembranaire

Le canal transmembranaire est la caractéristique structurale principale du système et peut être divisé en deux parties majeures, le complexe de la membrane interne (VirB3, VirB6 et VirB8) et celui de la membrane externe (VirB7, VirB9 et VirB10).

VirB3 et les protéines de cette famille sont pour la plupart de petites protéines caractérisées par leurs N- et C-terminaux cytoplasmiques et par une large région hydrophobe qui traverse la membrane interne grâce à deux domaines transmembranaires (154). Ce sont des protéines très peu caractérisées et leur fonction n'est pas encore connue. Cependant, plusieurs interactions ont déjà été montrées comme avec VirB4, VirB7 et VirB8 et l'interaction de ces trois protéines avec VirB3 stabilise cette dernière ; VirB6 serait également requise pour sa stabilisation (154,155). Comme cette stabilisation requiert VirB4-VirB7-VirB8 ensemble il a été suggéré que ces protéines seraient déjà en complexe lors de l'interaction et que leur effet de stabilisation sur VirB3 serait nécessaire pour la biogénèse du pilus (154). Selon certaines études, VirB3 interagirait avec VirB2 et VirB5, ce qui renforce alors l'idée que VirB3 participerait à la biogénèse du pilus (128,154).

VirB6 est la protéine centrale de ce doctorat. Les protéines de cette famille sont très hydrophobes, polytopiques qui vont donc traverser la membrane interne plusieurs fois. Ainsi, d'après différentes études biochimiques et *in silico*, VirB6 d'*A. tumefaciens* et ComB6 (homologue chez *H. pylori*) posséderaient potentiellement 5 domaines transmembranaires et une grande boucle périplasmique, tandis que VirB6 de *B. suis*, posséderait 7 domaines transmembranaires, mais également une large boucle périplasmique (156-158). L'arrangement serait conservé entre les différentes protéines de cette famille avec un N-terminal périplasmique et un C-terminal cytoplasmique (156-158). VirB6 est essentielle à la virulence et semble être un point central pour l'assemblage et la fonctionnalité du T4SS (152). En effet, elle aurait un effet sur la multimérisation de VirB7 et VirB9, ainsi qu'un effet de stabilisation sur VirB3 et VirB5, d'où un potentiel effet sur l'assemblage d'une machine de sécrétion fonctionnelle ainsi que le pilus-T (155,159). Ses domaines transmembranaires semblent également être des éléments clés pour l'assemblage du T4SS (pouvant faire partie d'une « plateforme ») et seraient requis pour le transfert du substrat (156). De plus, VirB6 est essentielle au transfert du substrat de par sa large boucle périplasmique qui est requise pour l'interaction avec celui-ci, et lors de délétions de plusieurs résidus sur le N-terminal ou le C-terminal, le transfert du substrat de VirB6 à VirB2 et VirB9 est bloqué (156). Il a également été montré que cette boucle périplasmique serait le site d'interaction entre VirB6 et VirB8, confirmant ainsi les premières études montrant que VirB6 et VirB8 agiraient de concert pour le transfert du substrat (97,156,160).

VirB8 et ses homologues sont des protéines bitopiques avec un petit domaine N-terminal cytoplasmique, une hélice transmembranaire et un large domaine C-terminal périplasmique. Des structures cristallines du domaine périplasmique ont été obtenues pour VirB8 de *A. tumefaciens* ainsi que pour plusieurs homologues, comme VirB8 de *B. suis* et TraE (homologue du pKM101), et ont montré un repliement similaire, comprenant cinq hélices α d'un côté et quatre feuillets β de l'autre (**Figure I.6**) (161-163). Ce repliement apparaît ressembler à celui des protéines de la famille des facteurs de transport nucléaire 2 (« nuclear transport factor 2 », NFT2). Ces protéines interviennent dans de nombreuses interactions souvent transitoires avec d'autres composants du T4SS. Ainsi grâce à différentes études biochimiques elles sont connues pour avoir des interactions avec VirB1, VirB4, VirB5, VirB6,

VirB9, VirB10, VirB11 et également avec elles-mêmes (128,150,160,163,164). Dans un premier temps il a été observé que la dimérisation de VirB8 est importante dans un contexte biologique naturel et plus tard il a été montré que l'interface de dimérisation est requise pour la fonction du T4SS et la stabilité de nombreuses protéines VirB (165,166). Il a également été démontré que certaines VirB sont localisées aux pôles uniquement si VirB8 est présente, suggérant alors que VirB8 aide à cibler ces protéines aux pôles de la cellule (167). Tous ces résultats ont donc suggéré que VirB8 fonctionnerait comme un facteur de nucléation en permettant l'assemblage et la localisation polaire du complexe T4SS (167). VirB8 entre également en contact avec le substrat contribuant à son transfert à travers la paroi bactérienne (97).

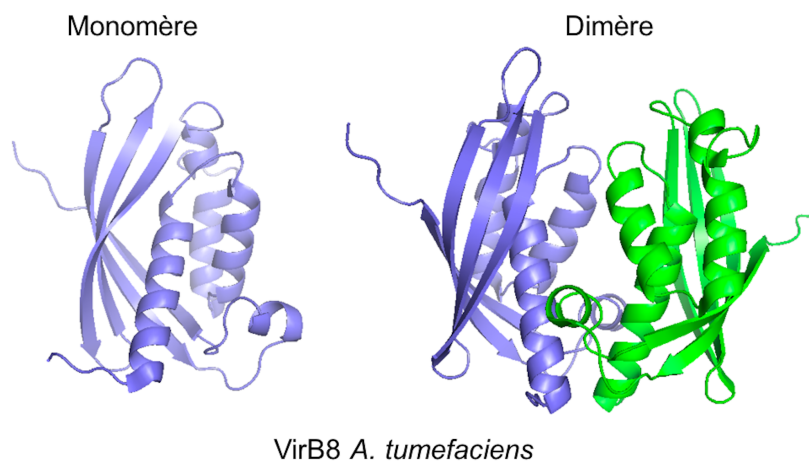


Figure I.6 : Représentations en ruban de la structure cristallographique d'un homologue de VirB8.

Figure réalisée à partir de la PDB : 2CC3 (161).

VirB7 est une petite lipoprotéine monotopique qui cible et maintient l'intégrité du complexe « core » (complexe entre VirB7, VirB9 et VirB10) de la membrane externe en stabilisant les autres protéines VirB, de par ces différentes caractéristiques une analogie a été faite avec les pilotines (168,169). La prénylation (ou lipidation ou isoprénylation) de VirB7 serait requise pour cibler le complexe « core » à la membrane externe (170). Quant à l'effet de stabilisation sur les autres composants du T4SS, il serait supporté par l'homodimérisation de VirB7, mais également par son hétérodimérisation avec VirB9 (168,169,171). Ainsi VirB7 va se stabiliser et interagir et stabiliser VirB9 grâce à des dimérisations fortes via des ponts disulfides (171-173). Structuralement, VirB7 possède un N-terminal contenant une séquence consensus pour

un site de clivage par la signal peptidase II (SPII) et une séquence de modification lipidique. Ainsi, le N-terminal modifié par un lipide sur une cystéine va s'ancrer dans la partie interne la membrane externe, le reste de la protéine restera périplasmique (168,169).

Les protéines VirB9 sont des protéines hydrophiles localisées à la membrane externe dans le périplasma. Grâce à différentes expériences mutationnelles ainsi que des analyses informatiques, il a été montré que VirB9 est composée de trois différents domaines fonctionnels. Le domaine N-terminal permettrait une sélection spécifique du substrat tandis que le domaine central ainsi que le domaine C-terminal seraient quant à eux nécessaires pour la stabilité (174). VirB9 interagit avec VirB7 et VirB10 et son interaction avec VirB7 se fait par son domaine C-terminal (174,175). Ainsi cette portion C-terminal de VirB9 adopte un repliement en sandwich β formé par deux feuillets β autour duquel VirB7 s'enroule (**Figure I.7**) (175,176).

VirB10 est un autre composant essentiel du T4SS requis pour la structure et la translocation du substrat (97). Les protéines de cette famille sont ancrées à la fois à la membrane interne et la membrane externe et traversent l'espace périplasmique, ce qui en fait des protéines d'échafaudage structurel (139,177). Ce rôle est également supporté par le fait que ces protéines sont considérées comme des capteurs d'énergie. En effet, lors de l'utilisation de l'ATP par les composants énergétiques ces protéines vont capter l'énergie et subir un changement conformationnel (139,177). Ce changement conformationnel est requis pour la formation stable du complexe VirB7-VirB9-VirB10 en forme d'anneau (139,170,178). Selon différentes études de cristallographie et microscopie électronique des homologues de VirB10, ces protéines consistent en une petite région N-terminale cytoplasmique, une hélice α transmembranaire pour la membrane interne, une région périplasmique avec un domaine riche en proline et un domaine C-terminal en tonneau β surmonté par une structure en « antenne » (**Figure I.7**) (162,177,178). Ainsi VirB10 est une protéine centrale et essentielle au T4SS en fonctionnant de manière dynamique en transmettant le signal de la membrane interne au reste du complexe et également en interagissant avec elle-même et plusieurs composants du T4SS comme VirB1, VirB4, VirB6, VirB8, VirB9, VirB11 et VirD4, tout ceci permettant un assemblage stable et fonctionnel (150,157,164,179).

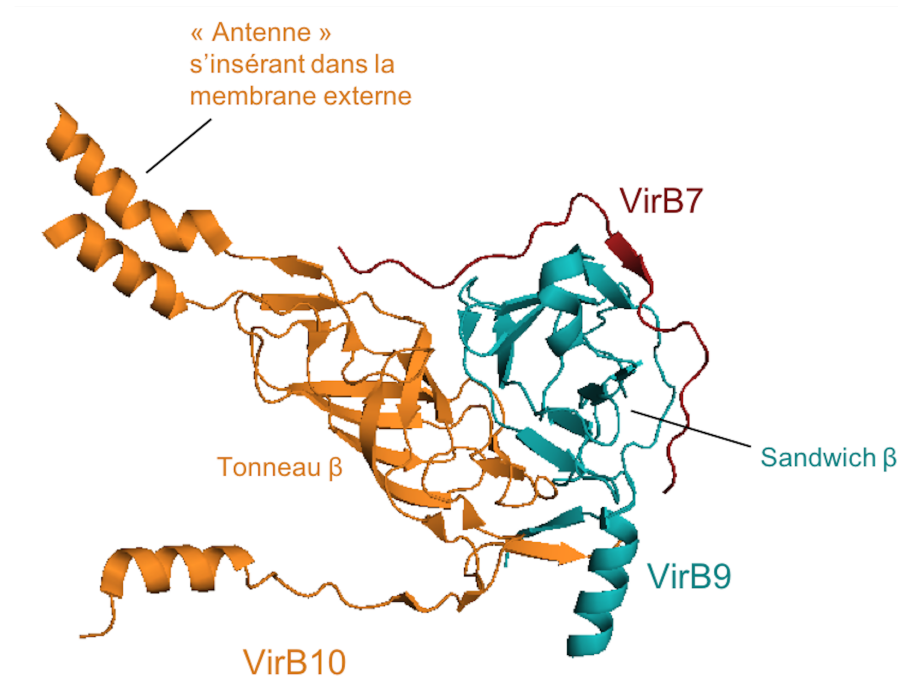


Figure I.7 : Représentations en ruban des structures cristallographiques des homologues de VirB7, VirB9 et VirB10.

Figure réalisée à partir de la PDB : 3JQO (178).

I.4.1.1.4 – Composants du pilus

Ces protéines vont permettre l'élaboration d'une structure tubulaire extracellulaire, le pilus, permettant le passage de l'ADN ou de protéines effectrices dans la cellule receveuse. Cette structure est composée de deux protéines ou pilines, VirB2, composant majeur, et VirB5, composant mineur.

VirB2 et les protéines de cette famille sont des petites protéines hydrophobes (généralement vers 12 kDa) avec une longue (environ 5 kDa) séquence signal N-terminale. Elles sont synthétisées sous forme de propilines (molécules précurseurs) et une fois dans la membrane interne la séquence signal va être clivée par une signal peptidase (180). Dans certains cas, et notamment celui de *A. tumefaciens*, le N-terminal de la protéine nouvellement clivée va se lier de manière covalente au C-terminal donnant alors une piline cyclique mature (181,182). VirB2 mature de *A. tumefaciens* a deux régions hydrophobes comprenant des domaines

transmembranaires (domaines II et IV), une boucle hydrophile cytoplasmique intermédiaire (domaine III) et des extrémités hydrophiles N et C-terminales qui sont donc jointes et forment alors une boucle périplasmique (domaine I) (129). Les régions hydrophobes permettraient les interactions entre les pilines et favoriseraient alors leur oligomérisation entraînant l'assemblage du pilus (129). Tout ceci, en plus des expériences de transfert d'immunoprécipitation d'ADN (« transfer DNA immunoprecipitation », TrIP), montre l'importance de ces protéines dans le transfert du substrat (97).

VirB5 est le composant mineur du pilus et nécessite la présence de VirB6 pour sa stabilité (155). En plus de posséder un peptide signal en N-terminal permettant de cibler la protéine dans l'espace périplasmique, l'étude cristallographique de TraC (homologue de VirB5 du pKM101) a révélé une structure allongée principalement hélicoïdale. Ainsi trois longues hélices α forment le squelette de la structure et celui-ci supporte un appendice constitué de quatre petites hélices α , ces deux parties étant reliées par une hélice 3_{10} (**Figure I.8**) (183). La localisation de VirB5 n'est pas encore précisément connue, elle a été retrouvée dans la membrane, à la surface de la membrane, au périplasme et au pilus ; le pilus semble être sa localisation finale tandis que les autres lieux où VirB5 est détectée pourraient être des étapes lors de son transit (184). Il a été proposé par différentes études que VirB5 pourrait jouer le rôle d'une adhésine en se localisant au bout du pilus et en permettant la reconnaissance de la cellule hôte (184,185). VirB5 aurait également un rôle dans l'élongation du pilus en étant notamment nécessaire pour l'incorporation de VirB2 dans le pilus (138).

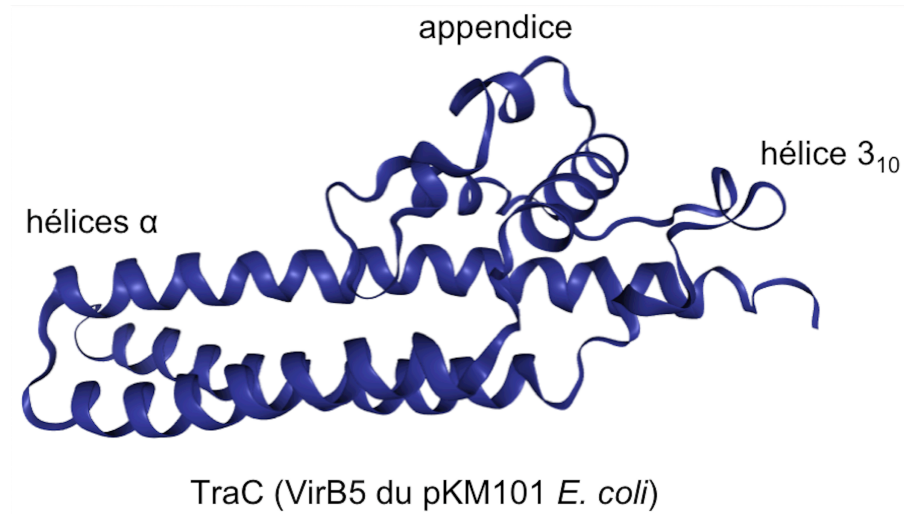


Figure I.8 : Représentation en ruban de la structure cristallographique d'un homologue de VirB5.

Figure réalisée à partir de la PDB : 1R8I (183).

I.4.1.2 – Cascade d'assemblage pour la formation du T4SS

Dans cette partie nous allons décrire les étapes séquentielles de l'assemblage des protéines VirB ainsi que l'assemblage de celles-ci entre elles. Les interactions protéine-protéine seraient essentielles pour le ciblage au pôle où se ferait l'assemblage. En effet VirB3, VirB4, VirB8 et VirB11 sont capables d'aller de manière indépendante au pôle. Tandis que VirB1, VirB6, VirB7, VirB9 et VirB10 se localisent au pôle de manière dépendante à d'autres VirB (167). Cependant une étude contredit la localisation dépendante de VirB6 au pôle (156). De par son activité transglycosylase et son interaction avec VirB8, VirB1 serait recrutée dès le début pour faciliter l'assemblage du complexe (17). Le complexe « core » se formerait en premier en s'associant de manière spontanée, nous allons donc avoir une première structure correspondant à un complexe tétradécamérique comprenant VirB7, VirB9 et VirB10, avec VirB7 pilotant l'insertion de ce complexe dans la membrane externe pour former le pore de la membrane externe (170). Il est également proposé que la multimérisation de VirB7-VirB9 aidée par VirB6 pourrait être un événement précédent la formation du complexe « core » (17). VirB4 interagit avec VirB9 et VirB10 ainsi qu'avec VirB3 et VirB8, s'associant au complexe « core » lors de l'absence des protéines de la membrane interne, elle pourrait ainsi être

l'événement avant la formation du complexe de la membrane interne (regroupant VirB3, VirB4, VirB6, VirB8, une partie de VirB10 et peut être même VirB5) (19). La position exacte des composants de la membrane interne n'est pas encore connue et l'extraction avec des détergents ne montre pas VirB6 et VirB8 dans le même complexe ; pour cette raison nous ne pouvons pas affirmer la formation d'un complexe de la membrane interne complet avant son association avec le complexe « core » (19,186). VirB8 pourrait être associée au complexe « core » indépendamment et ensuite interagir avec VirB6, il a également déjà été proposé que VirB8, ainsi que VirB4, feraient partie du complexe « core » (17). Ainsi, l'interaction VirB6/VirB10 pourrait se faire après la formation du complexe « core » et l'interaction de VirB6 avec VirB8, déjà associée au complexe « core », pourrait avoir lieu au même moment. VirB3 pourrait arriver dans le même complexe que VirB6 au lieu d'interaction. Le complexe VirB2/VirB5 semble formé sans même que les protéines soient toutes bien associées. VirB5 requiert cependant la présence de VirB6. Durant cette biogénèse VirB4, assistée par VirB11, va également extraire les pilines VirB2 de la membrane interne (129). L'ensemble de ces étapes va mener à la formation du complexe du T4SS.

I.4.1.3 – Structure du T4SS

Une structure du complexe contenant les protéines VirB3 à VirB10 (T4SS₃₋₁₀) d'environ 3 MDa a récemment été résolue par microscopie électronique à transmission (MET) (19). Cette structure correspond au T4SS du plasmide conjugatif R388. Elle a une longueur totale de 340 Å et comprend alors le complexe « core » de 185 Å de largeur maximum, relié par une tige centrale au complexe de la membrane interne d'une largeur maximale de 255 Å (**Figure I.9A**) (19). La structure en ME du complexe « core » a déjà été obtenue pour le T4SS du plasmide pKM101 et a révélé dans l'ensemble les mêmes caractéristiques que celle du complexe de R388 (187). Ainsi, ce complexe « core » d'environ 1,1 MDa forme un pore cylindrique, cette structure consiste en une couche interne et une couche externe séparées par une plateforme centrale (**Figure I.9B**). Nous y retrouvons 14 copies de chaque protéine (VirB7, VirB9 et VirB10), la couche externe est en partie insérée dans la membrane externe et est composée de VirB7 et des domaines C-terminaux de VirB9 et VirB10, et la couche interne est composée des N-terminaux de VirB9 et VirB10 (**Figure I.9C**) (170,178,187). Dans le cas de la structure

obtenue pour le T4SS₃₋₁₀, la chambre interne est partiellement obstruée par la tige centrale (absente dans les précédentes reconstructions) (19). Le complexe « core » est donc relié par une tige centrale au complexe de la membrane interne. Cette tige centrale apparaît plutôt flexible et n'a pas de symétrie apparente, elle serait susceptible de provenir du complexe de la membrane interne et est insérée dans la membrane interne (19). Le complexe de la membrane interne consiste en la partie restante du domaine N-terminal de VirB10 (14 copies) et d'un ensemble d'autres protéines associées à la membrane interne avec 12 copies de VirB3, VirB4, VirB5, VirB8 et 24 copies de VirB6 (19). Ce complexe ressemble à une arche posée sur deux tonneaux hexamériques, chacun d'une longueur de 134 Å, d'un diamètre minimum de 105 Å et comprenant trois niveaux (**Figure I.9A** et **I.9B**) (19). L'arche serait composée de VirB3, VirB5, VirB6 et VirB8, sans connaître leurs localisations exactes, et les tonneaux correspondraient à VirB4 (**Figure I.9C**) (19,188). Selon une récente étude, deux copies de dimères de VirD4 viendraient se localiser de chaque côté du système entre les deux tonneaux (**Figure I.9D**) (189). Les auteurs émettent l'hypothèse que comme VirD4 oligomérisé en présence de l'ADN, elle se lierait au T4SS comme monomère et oligomériserait seulement une fois le substrat recruté et lié, leur structure représenterait alors l'initiation du complexe, son état de repos (189).

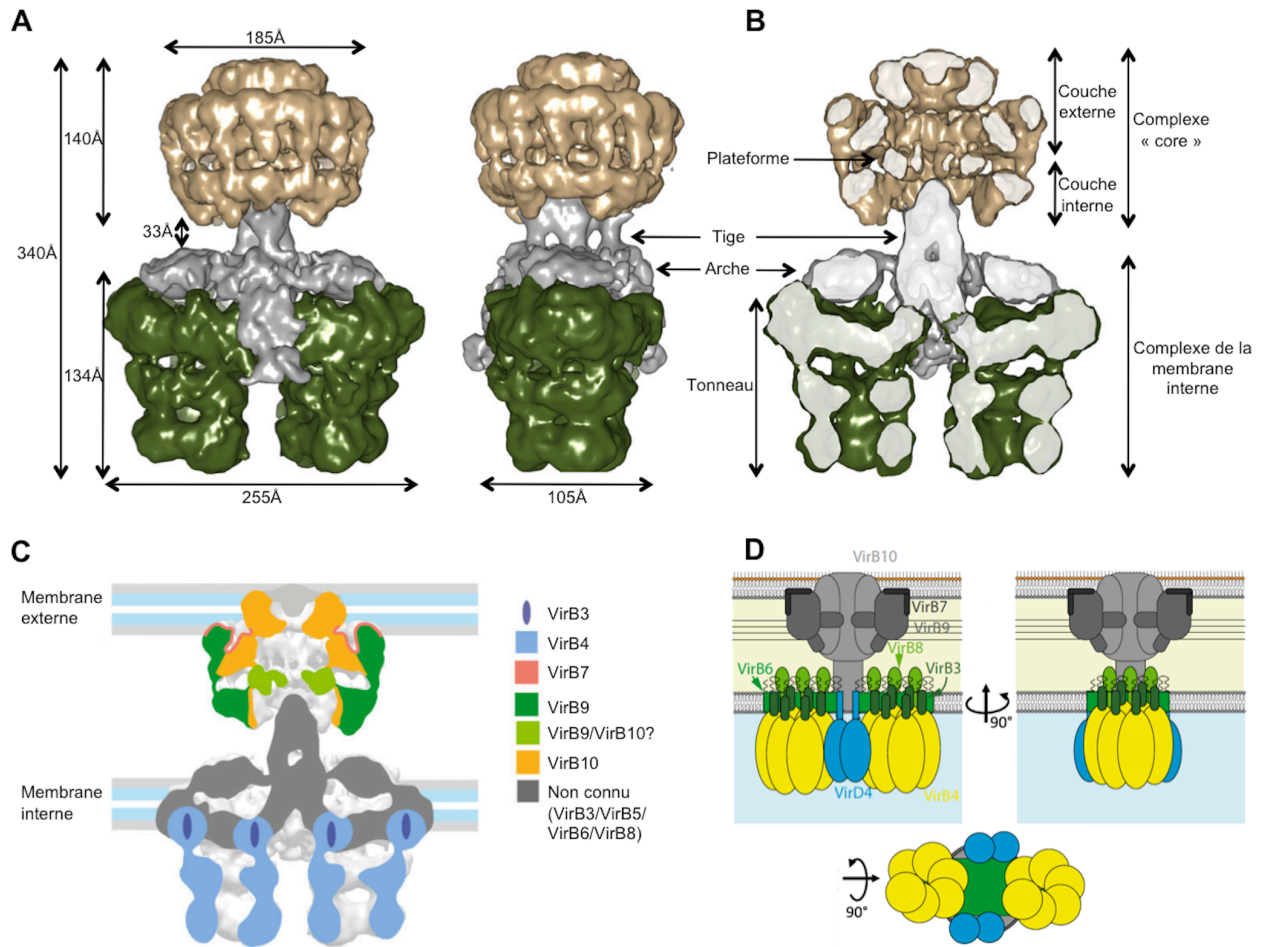


Figure I.9 : Représentation de l'architecture du T4SS.

A) Représentation globale de l'enveloppe électronique externe ainsi que les différentes tailles, B) précision de la densité interne. Les deux figures ont été obtenues grâce à de la microscopie électronique à transmission en coloration négative et modifiées de Ilangovan *et al*, 2015 (24). C) Représentation schématique de la densité électronique obtenue ainsi que l'emplacement possible des différentes VirB. Cette figure a été modifiée de Low *et al*, 2014 (19). D) Représentation schématique du complexe avec VirD4 liée. Figure adaptée de Redzej *et al*, 2017 (189).

I.4.2 – Transfert du substrat (ADN et protéines effectrices)

Nous allons par la suite décrire les étapes nécessaires au transfert du substrat à travers le T4SS. Tout d'abord, nous allons nous intéresser au transfert du brin-T de *A.tumefaciens*. Premièrement, VirC1 et VirC2 initient l'assemblage du complexe du relaxosome et le traitement de l'ADN-T (92). Deuxièmement, la relaxase VirD2, assistée par VirD1, clive le brin inférieur de l'ADN-T générant alors un brin-T simple brin et y reste attachée de manière covalente à l'extrémité 5' (21,190). Ceci résulte alors en la formation d'une nucléoprotéine, VirD2-brin-T (97). Il a été montré que VirC1 recrute ce complexe nucléoprotéique au pôle et interagit avec VirD4, proposant alors que les protéines VirC faciliteraient le contact entre VirD2 et VirD4 (92). Il a également été proposé que des protéines cytoplasmiques se liant à VirD2 (« VirD2-binding protein », VBP) pourraient également être présentes pour recruter le complexe VirD2-brin-T à la protéine de couplage VirD4 (190-192). VirD2 possède en plus une séquence de translocation à son C-terminal qui contribue à l'interaction avec VirD4 et qui constitue la base pour l'amarrage du substrat avec le canal VirB/VirD4 (97,130). Troisièmement, la protéine de couplage VirD4, recrute ce complexe et permet d'initier son passage dans le T4SS. Celle-ci va passer le substrat à VirB11 et la présence de VirB7 à cette étape est également nécessaire (**Figure I.10**) (97). Quatrièmement, le substrat est transféré à VirB6/VirB8, et bien que VirB4 n'interagisse pas avec le substrat, sa présence est nécessaire pour le passage du substrat entre VirB11 et VirB6/VirB8 (**Figure I.10**) (97). Cinquièmement, le substrat passe de VirB6/VirB8 à VirB2/VirB9 avec la nécessité de la présence de VirB3, VirB5 et VirB10 (**Figure I.10**) (97). Le changement conformationnel de VirB10, nécessaire au passage du substrat, est engendré en réponse à l'amarrage du complexe VirD2-brin-T avec VirD4 et de son passage à VirB11 et également en réponse à l'hydrolyse de l'ATP par ces deux mêmes protéines (**Figure I.10**) (130,139).

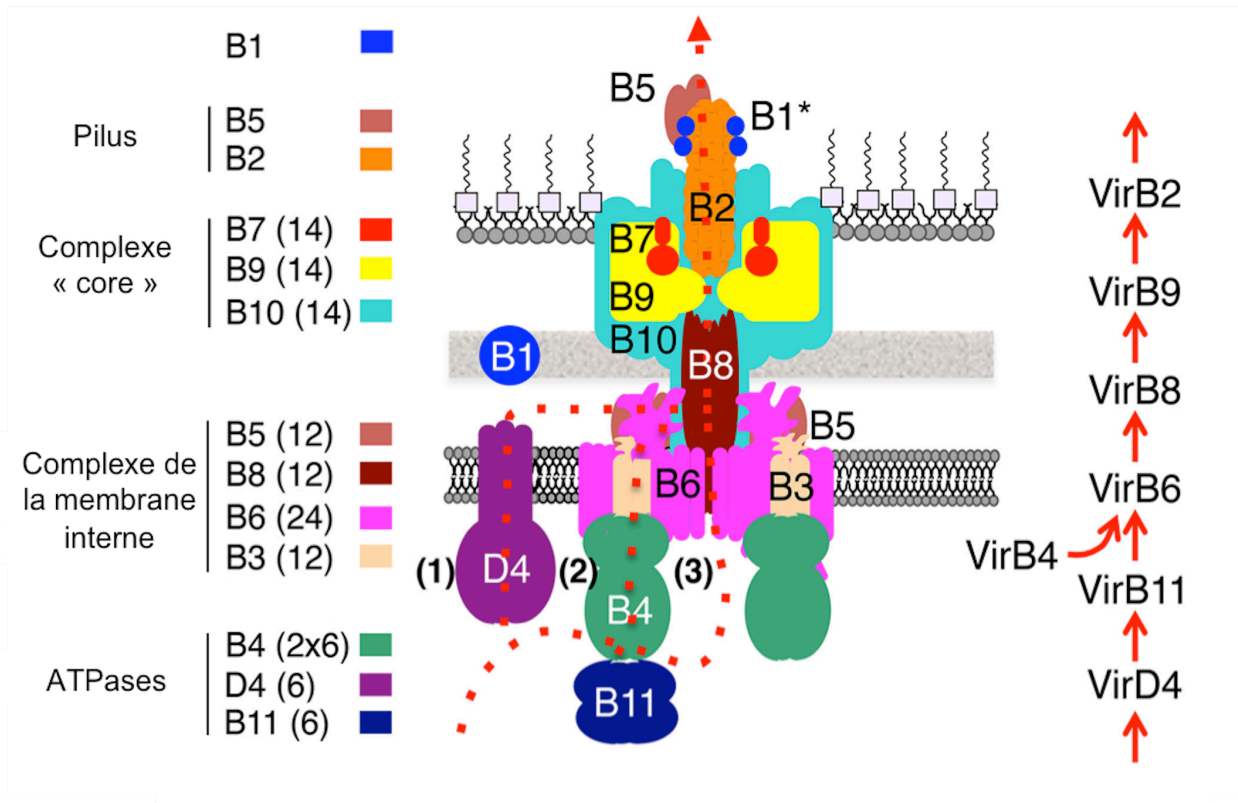


Figure I.10 : Représentation schématique du transfert du substrat dans le T4SS.

Les lignes pointillées rouge représentent les trois chemins hypothétiques que pourrait emprunter le substrat lors de son transfert, une seule voie est ensuite proposée lors du passage par le complexe « core ». Des informations sur la position de VirD4 venant d'être données, le chemin (3) pourrait être priorisé. Cette figure a été modifiée de Christie, 2016 (188).

En plus de VirD2, ce T4SS permet le passage de plusieurs protéines effectrices, comme VirE2, VirE3, VirD5 et VirF. Le passage de ces protéines dans le T4SS se fait de manière indépendante à celui du brin-T (193). Une récente étude de la relaxase TrwC du plasmide R388 a montré la nécessité de son dépliement pour le passage par le T4SS, laissant penser que VirD2 et les autres protéines effectrices subiraient un processus similaire (194). Ces protéines effectrices sont impliquées dans l'importation, la localisation nucléaire et l'intégration du brin-T dans le génome de l'hôte (**Figure I.11**). VirE2 est l'une des plus étudiée, comme le complexe VirD2-brin-T, elle interagit avec VirD4. Cependant, elle n'aurait pas besoin du changement conformationnel de VirB10 pour permettre son passage à travers le T4SS

(42,130). VirE2 est une protéine de liaison à l'ADN simple brin et suite à son passage dans la cellule hôte eucaryote elle s'associe au complexe VirD2-brin-T, appelé alors le complexe-T (VirD2-brin-T-VirE2) (97). Ce complexe protège le brin-T de la dégradation nucléolytique dans la cellule de l'hôte (195,196). Grâce aux signaux de localisation nucléaire portés par VirE2 et VirD2 le brin-T est ciblé au noyau pour son intégration dans le génome (197). VirE2 interagit également avec VIP1 (« VirE2-interacting protein 1 ») et VIP2 (« VirE2-interacting protein 2 ») qui sont des protéines de l'hôte et qui vont participer au transport nucléaire du complexe-T, le conduisant alors au site d'intégration dans le chromosome de la plante (198,199). L'intégration du brin-T serait aidée par une interaction directe entre VirD2 et les histones associées avec l'ADN de l'hôte et également par l'intermédiaire de VIP1 qui sert de lien moléculaire entre VirE2 et le nucléosome via des interactions avec les histones (200,201). VirE3 interagit avec VirE2 et imite la fonction de VIP1, la faible abondance de cette dernière dans la cellule hôte est ainsi compensée par VirE3 qui agit comme secours/soutien (100,202). VirE3 jouerait également un rôle dans l'activation de la transcription de gènes en s'associant au facteur de transcription pBrp des cellules de la plante (100). VirD5 a récemment été caractérisée et est encore peu étudiée, elle maximiserait l'efficacité de l'infection par des interactions compétitives avec des facteurs végétaux (96). VirF va au noyau des cellules de la plante et est impliquée dans la protéolyse de VIP1 et VirE2, ceci permettant de « déshabiller » (libérer) le brin-T pour son intégration dans le génome de l'hôte (203). Tout ceci permet alors, dans notre cas, à *A. tumefaciens* d'envahir et survivre dans la plante (**Figure I.11**).

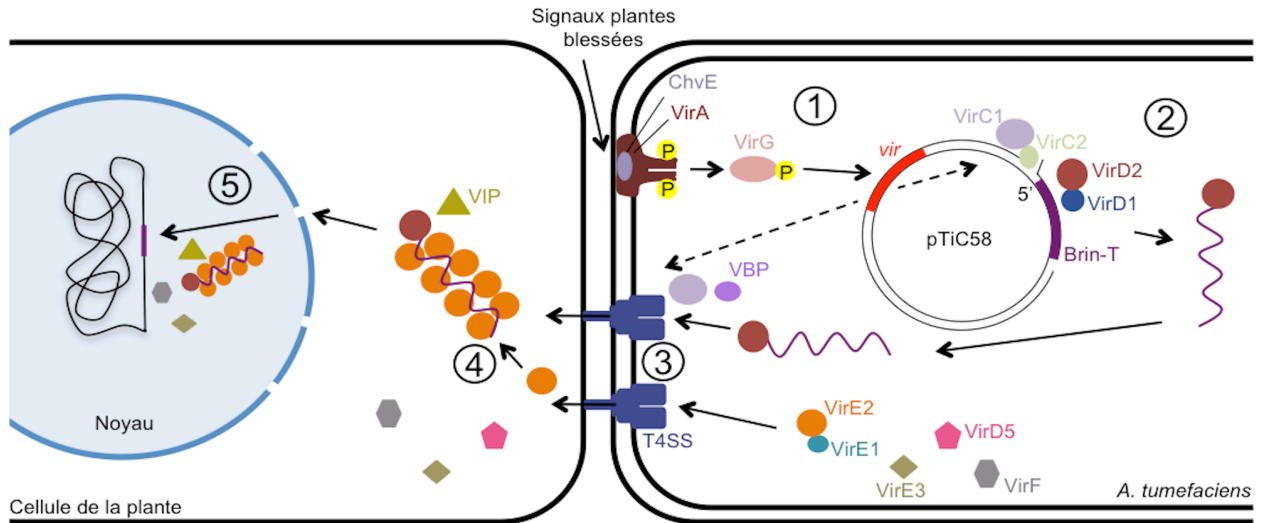


Figure I.11 : Représentation schématique des différentes étapes menant au passage du substrat et l'intégration du brin-T dans la cellule hôte.

① Détection des signaux de la plante blessée, interaction de ChvE avec VirA, autophosphorylation de VirA phosphorylant VirG activant alors les gènes *vir*. Activation permettant la formation du complexe VirB/VirD4 ainsi que le traitement de l'ADN-T. ② Traitement de l'ADN-T, formation de VirD2-brin-T puis transport au T4SS. ③ Passage à travers le T4SS de VirD2-brin-T ainsi que des protéines effectrices. ④ Formation du complexe-T. ⑤ Transport dans le noyau de la cellule hôte et intégration du brin-T dans le chromosome.

I.5 – Objectifs de la thèse

Comprendre comment les T4SSs permettent aux bactéries d'envahir et de survivre est essentiel au développement de nouveaux traitements antimicrobiens. Beaucoup d'informations sur la structure et les fonctions du T4SS, sur les effecteurs ainsi que sur la compréhension des mécanismes par lesquels les protéines sécrétées détournent les fonctions des cellules lors de l'infection sont déjà connues. Cependant il est indispensable de comprendre les détails moléculaires des interactions protéine-protéine au sein de ce système pour évaluer la séquence de leur assemblage et leurs fonctions au sein de ces machineries. Une meilleure vue d'ensemble permettra une compréhension plus précise de ces systèmes et donc une efficacité accrue lors de la recherche, par exemple, d'inhibiteurs. Les inhibiteurs vont nous permettre de cibler un site particulier de notre T4SS, bloquant ainsi la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques. En plus, ceux-ci ne tuant pas la bactérie ils n'engendreront pas une pression environnementale et donc une adaptation génétique.

Grâce à des résultats de différentes études, une interaction entre VirB6 et VirB10 était fortement suggérée. De par leur rôle central, l'hypothèse était que VirB6 agirait de concert avec VirB10 pour amener les substrats au cœur du T4SS. Ainsi nos travaux initiaux ont permis la publication d'un premier article, grâce à différentes approches telles que le « phage display », le BTH et le FRET nous avons pu montrer l'interaction du N-terminal de VirB6 avec VirB10. Une fois cette interaction déterminée nous avons identifié les résidus de VirB6 impliqués et évalué leurs importances fonctionnelles pour cette interaction *in vivo*. Ainsi nous avons réalisé un alanine « scanning » de 24 résidus de VirB6 au site d'interaction et nous avons testé les effets des changements sur l'interaction grâce à l'essai BTH. Une fois certains résidus mis en évidence nous avons évalué leur importance *in vivo* par complémentation grâce à plusieurs tests fonctionnels (accumulation des protéines, infection sur les plantes, complexes du T4SS extraits des membranes, formation des pili). Une troisième partie consiste en l'étude de l'interaction *in vitro*. Il n'y a pas d'informations structurales sur VirB6 qui est une protéine transmembranaire très hydrophobe. Ainsi nous avons tenté plusieurs expériences pour l'expression et la purification de VirB6.

Les objectifs étaient de mettre en évidence l'interaction de VirB6/VirB10, plus particulièrement l'identification du site d'interaction impliqué, et d'analyser l'importance de cette interaction pour la fonctionnalité du T4SS et notamment pour le recrutement de VirB2/VirB5 au pilus-T.

I.6 – Justification des méthodes utilisées

I.6.1 – Biologie moléculaire

I.6.1.1 – « Phage display »

Dans un premier temps, nous avons utilisé le « phage display » ou présentation de molécules à la surface de phages filamenteux. Cette approche permet un premier ciblage de zones d'interaction entre deux protéines. Dans notre cas, cette technique est réalisée grâce à des phages qui présentent à leurs surfaces des séquences peptidiques aléatoires. Certaines de ces séquences s'accrochent à la protéine d'intérêt purifiée qui est retenue sur une surface. Cette liaison permet de retenir les phages spécifiques qui seront récupérés par élution, puis la séquence à leur surface sera analysée par séquençage du génome du phage. Une fois les séquençages obtenus, nous alignons les peptides identifiés à la séquence de l'autre protéine en utilisant différents paramètres de restriction afin de repérer les sites apparaissant les plus représentés, c'est-à-dire ceux suscitant le plus d'alignement sur la séquence d'intérêt. Ainsi les peptides sélectionnés correspondent à une partie de la protéine « A » pouvant interagir avec la protéine « B » utilisée lors de la sélection. Bien que cette technique nécessite que l'une des protéines soit purifiée et que le taux d'expression de certaines séquences peptidiques peut être variable ou redondant, elle constitue un premier criblage robuste. Cette méthode, facile d'accès et d'utilisation en laboratoire puisqu'elle est disponible sous forme de « Kit », permet de cribler un très grand nombre de peptides à la surface des phages assez rapidement.

I.6.1.2 – Double hybride bactérien

La technique de double hybride bactérien ou BTH (« bacterial two hybrid ») nous permet de mesurer et de confirmer l'interaction *in vivo*, mais également d'obtenir une première quantification. Dans cette technique, les gènes des deux protéines d'intérêt vont être clonés

chacun à un fragment du gène de l'adénylate cyclase. Ainsi si les protéines fusions interagissent, elles vont restaurer l'activité de l'adénylate cyclase entraînant par voie de signalisation la formation de la β -galactosidase. L'activité enzymatique est ensuite visualisée par des colonies bleues/blanches ou quantifiée en mesurant l'activité en solution grâce à un substrat spécifique. Évidemment, cette technique nécessite des protéines chimères et la production d'une telle fusion peut poser problème. De plus, l'orientation ou la position du fragment fusionné ou même la taille de notre protéine doit être pris en considération puisque ceci peut s'avérer limitant pour le regroupement des deux fragments de l'adénylate cyclase. Cependant cette technique présente plusieurs avantages tels que l'étude de l'interaction dans un environnement *in vivo*, l'observation d'interactions transitoires ou instables, qui sont très représentées dans le T4SS, et le fait qu'elle est indépendante de l'expression naturelle des protéines d'intérêt. Ainsi dans notre cas c'est une technique de choix qui nous sert alors dans la confirmation, mais également de base pour un criblage rapide et quantifiable des résidus impliqués.

I.6.1.3 – Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes

Le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes ou FRET (« fluorescence resonance energy transfer ») a permis de confirmer et de quantifier l'interaction. Pour cette méthode, les protéines d'intérêt sont marquées par des fluorophores différents, l'une avec un donneur qui va transférer son énergie à l'autre, un receveur, uniquement lorsqu'ils seront à une distance comprise entre 10 et 100 Å. Également avec cette technique, l'absence de signal de fluorescence ne signifiera pas l'absence d'interaction. C'est une méthode extrêmement sensible qui permettra de quantifier l'interaction de manière plus précise.

I.6.1.4 – Alanine « scanning »

Pour le deuxième article de cette thèse nous avons voulu identifier les résidus de VirB6 impliqués dans l'interaction. À ces fins, nous avons utilisé la technique d'alanine « scanning ». Le choix de l'alanine est basé sur le fait qu'il s'agit d'un petit acide aminé, chimiquement inerte, mais ayant tout de même un carbone β , correspondant à une groupe fonctionnel méthyl. Ainsi en utilisant l'alanine la chaîne latérale au-delà de ce carbone β sera absente et ceci sans

altérer la conformation de la chaîne principale ou sans imposer des effets stériques ou électrostatiques. Nous avons utilisé la technique de mutagenèse dirigée, le « Quikchange », pour permettre la substitution de plusieurs de nos résidus par l'alanine. Cette technique est très répandue et a démontré son utilité dans l'analyse fonctionnelle de résidus.

I.6.1.5 – Extraction des complexes

L'analyse des complexes permet de déterminer la masse moléculaire ou la composition du complexe des protéines VirB. Nous voulons observer si des changements de résidus de VirB6 impliqués dans l'interaction avec VirB10 causent des changements des complexes du T4SS. L'extraction des complexes grâce aux détergents peut s'avérer très difficile selon les organismes et les complexes à extraire. Cependant cette technique avait déjà été réalisée dans notre laboratoire avec succès. Même si quelques optimisations ont été nécessaires c'est l'une des techniques les plus accessibles et réalisables en laboratoire pour ce type d'étude.

I.6.1.6 – Isolation des pili

VirB6 joue potentiellement un rôle clé dans la formation du pilus-T. Ainsi nous voulons déterminer les effets des changements au site d'interaction sur la formation du pilus-T. Comme pour l'extraction des complexes, la récolte des pili a déjà été réalisée dans le laboratoire avec succès. C'est également l'une des méthodes les plus accessibles et réalisables en laboratoire pour ce type d'études.

I.6.1.7 – Induction de tumeurs sur les plantes

La formation de tumeur chez les plantes est utilisée pour mesurer l'efficacité de transfert du brin-T oncogène et ainsi évaluer la fonctionnalité du T4SS suite aux changements des résidus de VirB6 impliqués dans l'interaction avec VirB10. L'essai de formation de galles peut poser plusieurs problèmes comme la capacité de reproductibilité ou même une quantification peu précise. Pour cela nous étudions la formation de galles sur les plantes *Kalanchoë daigremontiana* et également sur des coupes de carottes, ces dernières étant plus sensibles. Nous étudions également les effets sur la conjugaison avec l'homologue TraD du pKM101.

Ces trois moyens d'études s'avérant alors complémentaires.

I.6.1.8 – Chromatographie d'exclusion stérique

Suite à la purification des protéines avec une étiquette histidine, cette méthode nous permet d'améliorer la pureté de notre échantillon nécessaire pour des études structurales. Ceci permet également l'obtention d'information quant à la taille des complexes obtenus.

I.6.1.9 – « Crosslink »

Le « crosslink » (ou réticulation) permet la formation de complexes grâce à la formation de liaisons covalentes et/ou ioniques nous permettant alors leurs analyses par la suite. Dans ce projet de doctorat nous avons utilisé le disuccinimidyl subérate (DSS) comme agent crosslinkant (réticulant). Cet agent contient des esters N-hydroxysuccinimide (NHS) réagissant avec les amines primaires de la chaîne latérale des lysines ou de l'extrémité N-terminale de chaque polypeptide.

I.6.2 – Biologie structurale

Les techniques de biologie structurale utilisées, comme la microscopie, nous permettent une observation de nos échantillons et nos protéines d'intérêt directement dans un environnement naturel, *in vivo*. Ces techniques permettent également un contrôle de la localisation de nos protéines et une visualisation de leurs arrangements spatiaux.

I.6.2.1 – Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique nous permet l'observation directe de nos échantillons d'intérêt purifiés ou au sein d'une structure. Nous l'avons utilisée dans un premier temps pour observer VirB6 et ses variants directement dans la bactérie. Pour cela, les bactéries ont été fixées, osmifiées, déshydratées puis enrobées dans une résine. Les blocs obtenus ont été coupés à l'aide d'un ultramicrotome afin d'obtenir des coupes d'environ 80 nm sur lesquelles un immunomarquage en utilisant des billes d'or a été réalisé afin de localiser VirB6. Cette technique permet ainsi d'observer VirB6 ou ses variants directement dans la bactérie ; les

analyses par gels SDS-PAGE et immunobuvardage pouvant être limitantes. En effet, VirB6 ne peut pas être chauffée avant d'être mise sur gel et parfois forme des oligomères résistant au SDS empêchant sa migration (204,205). Ainsi cette technique nous permet une confirmation de la présence de VirB6 sans passer par les différentes étapes précédant le dépôt des échantillons dans un SDS-PAGE.

Nous avons également utilisé la microscopie électronique à transmission en coloration négative pour l'observation de protéines surexprimées et purifiées. L'échantillon purifié a été déposé sur une grille préalablement « glow-dischargé » puis coloré à l'aide d'uranyl acétate. La microscopie nous permet l'observation directe des complexes. La cristallographie ainsi que la RMN sont des approches de la biologie structurale ayant des limites avec des protéines transmembranaires. Ainsi cette technique nous offre l'avantage d'une observation plus directe que les autres études de biologie structurale, même si la résolution est limitante. En effet, les limitations majeures concernant la microscopie électronique sont l'obtention de structure à haute résolution de protéine ayant un poids moléculaire inférieure à 200 kDa, ainsi que l'accès et le coût d'utilisation des instruments.

I.6.2.2 – Microscopie à fluorescence à super résolution

La microscopie à fluorescence nous permet de localiser VirB6 et ses variants. VirB6 se localise aux pôles, ainsi grâce à cette technique nous voulons déterminer si les variants de VirB6 continueront de se localiser aux pôles et que leurs effets *in vivo* ne seront pas dus à une mauvaise localisation. Grâce à VirB6 fusionnée à la sfGFP et la microscopie à fluorescence à super résolution, nous pouvons directement observer la protéine dans la bactérie sans de nombreuses étapes intermédiaires entre la pousse et l'observation et avec une résolution optimale d'environ 100 nm.

I.6.2.3 – Dichroïsme circulaire

Cette technique nous permet d'obtenir des informations sur les structures secondaires des protéines ainsi que de comparer la stabilité en fonction du tampon utilisé et ceci en utilisant peu de matériel. Cette technique permet alors un « contrôle qualité » rapide suite à l'essai de différentes conditions comme la température ou le pH.

Chapitre II – Premier article scientifique

Ce premier article concerne la base de mon projet de thèse. Selon différentes études précédentes des hypothèses ont été émises quant au rôle de l'interaction de VirB6 avec VirB10. Cette interaction pourrait alors jouer une fonction centrale dans la formation du T4SS et pour le transfert du substrat. Ainsi le but de ce papier était d'analyser l'interaction entre VirB6 et VirB10.

Pour cela, nous avons dans un premier temps utilisé le « phage display » afin d'identifier le site d'interaction de VirB10 sur VirB6. De cela nous avons déterminé que le N-terminal de VirB6 est le site d'interaction avec VirB10. Nous avons donc par la suite réalisé des expériences de BTH afin de confirmer l'interaction, et pour renforcer l'idée que celle-ci se fait par ce N-terminal. Puis finalement des essais de FRET nous ont permis de confirmer et quantifier cette interaction via le N-terminal de VirB6. Avec ce papier nous montrons également que le C-terminal de VirB6 de *B. suis* se situe dans le cytoplasme confirmant plusieurs études réalisées avec des homologues de VirB6.

Cet article a été publié dans le journal *FEBS letters* en juin 2015 (Villamil Giraldo, A. M., Mary, C., Sivanesan, D., and Baron, C. (2015) VirB6 and VirB10 from the *Brucella* type IV secretion system interact via the N-terminal periplasmic domain of VirB6. *FEBS letters* 589, 1883–1889 (157)). Pour ce papier je suis co-première auteure, ma contribution y est égale à celle de Ana Maria Villamil Giraldo. Plus précisément, j'ai réalisé les expériences permettant de définir la localisation du C-terminal de VirB6 et les immunobuvardages (« western blot ») associés. J'ai également réalisé les expériences de BTH et les immunobuvardages associés. Enfin, j'ai participé à l'écriture des révisions du manuscrit. Ana Maria Villamil-Giraldo a réalisé les expériences de « phage display » et de FRET et a écrit le manuscrit. Durgajini Sivanesan a également conduit des expériences de « phage display ». Le Dr Baron a discuté et conçu les expériences et écrit le manuscrit.

VirB6 and VirB10 from the *Brucella* type IV secretion system interact via the N-terminal periplasmic domain of VirB6.

Ana Maria Villamil-Giraldo¹, **Charline Mary**¹, Durgajini Sivanesan and Christian Baron*

¹These authors made equal contributions to this manuscript

*Corresponding author

Address: Université de Montréal, Pavillon Roger-Gaudry, Department of Biochemistry and Molecular Medicine, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

Telephone: 514-343-6372

Email: christian.baron@umontreal.ca

Abstract

Type IV secretion systems are multi-protein complexes that transfer macromolecules across the cell envelope of bacteria. Identifying the sites of interaction between the twelve proteins (VirB1-VirB11 and VirD4) that form these complexes is key to understanding their assembly and function. We have here used phage display, bacterial two-hybrid and fluorescence-based interaction assays to identify an N-terminal domain of the inner membrane protein VirB6 as a site of interaction with the envelope-spanning VirB10 protein. Our results are consistent with the notion that VirB6 acts in concert with VirB10 as well as with VirB8 during secretion system assembly and function.

II.1 – Introduction

Type IV secretion systems (T4SSs) are used by Gram-negative bacteria to transfer DNA and protein substrates across the cell envelope into target cells [1, 2]. They usually consist of 12 proteins, VirB1-11 and VirD4, which assemble into a multi-protein channel that has anchoring points at both the inner and the outer membrane. The overall architecture was first determined for the outer part of the plasmid pKM101-T4SS using cryo-electron microscopy and X-ray crystallography and it was found to be composed of homologs of VirB7, VirB9 and the C-terminal domain of VirB10 [3, 4]. Analysis of the cryo-electron microscopic structure of the plasmids R388 T4SS revealed the overall structure of the inner membrane part of the channel and showed the localization of VirB4 [5]. However, the exact topologies and the nature of the interactions between the proteins forming the inner membrane complex (VirB6, VirB8 and VirB10) remain unknown.

In this work, we have focused on the analysis of the interaction between VirB6 and VirB10. VirB6 is a polytopic inner membrane protein essential for substrate secretion. It is one of the channel subunits that is likely in direct contact with the DNA substrate during its transfer across the inner membrane [6]. The DNA transfer assays suggested that VirB6 acts in concert with VirB8 and we have provided direct evidence for this notion identifying a presumably periplasmic loop of VirB6 as site of interaction [7]. So far, no structural information is available for VirB6-like proteins, but the homologous proteins ComB6 from *Helicobacter pylori* and VirB6 from *Agrobacterium tumefaciens* have been characterized using biochemical and genetic approaches [8, 9]. They are highly hydrophobic proteins, which contain five transmembrane segments and a large periplasmic loop located in their central region. The N-terminal domain of both VirB6 homologs is located in the periplasm.

VirB10 is another essential component of the T4SS and being anchored both to the inner and the outer membranes it spans the entire translocation channel. The crystal structure of the C-terminal domain of the VirB10 homolog TraF was characterized in the context of the outer membrane core complex formed by TraN-TraO-TraF (VirB7-VirB9-VirB10) [3]. According to this structure, the outer membrane channel is primarily formed by 14 copies of VirB10,

which makes direct contacts with VirB9 and VirB7 in the external part of the channel. This architecture was surprising as the seminal studies using DNA immunoprecipitation had failed to show a direct contact between VirB10 and the translocated substrate [6]. The complex formed by the plasmid R388 T4SS homologs VirB3 to VirB10 was recently characterized by cryo-electron microscopy [5]. 24 copies of VirB6 and 14 copies of VirB10 were found to be forming part of the assembly. However, this analysis did not reveal the localization of VirB6 or the N-terminal domain of VirB10 within the inner membrane complex.

VirB6 and VirB10 have also been studied from a functional perspective. VirB6 is essential for substrate interactions and substrate transfer to other VirB proteins [8]. Transferring of substrate from VirB6 and VirB8 to VirB2 and VirB9 depends on VirB10 [6] and its efficiency is affected by the conformational change undergone by VirB10 upon ATP binding to the T4SS energizing proteins VirD4 and VirB11 [10]. Despite these data suggesting close functional links, no evidence was available for a direct interaction between VirB6 and VirB10. To address this question, we used a combination of biochemical and genetic interaction assays to identify specific VirB10-interacting regions within VirB6 from the model organism *Brucella*. Our results show that the N-terminal region of VirB6 interacts with VirB10. In combination with previous data from our group [7] these results suggest that VirB6 interacts simultaneously with VirB8 and with VirB10.

II.2 – Results and Discussion

II.2.1 – Analysis of the topology of VirB6

It is generally accepted that the consensus among different methods makes the prediction of transmembrane segments more reliable [21]. We used five programs to predict the *Brucella* VirB6 transmembrane topology. All of them predicted seven transmembrane segments located in similar regions of the protein (**Figure II.1**). Interestingly, *Brucella* VirB6 (347 amino acids) is significantly longer than its homolog from *Agrobacterium* (295 amino acids). The functions of these additional amino acids are unknown, but the increased length of the hydrophobic portion explains why the presence of two additional transmembrane segments is predicted (seven vs five) and the overall predicted topology is very similar. One of the methods used

(TMHMM) also predicts the orientation of the transmembrane segments [22] and according to this prediction the VirB6 C-terminus locates in the cytoplasm.

To experimentally determine the location of the C-terminus we performed a reporter assay in which GFP was C-terminally fused to VirB6. In addition, to assess the possibility of an alternative orientation, we used a control in which a protein fragment providing an extra transmembrane segment derived from glycophorin A was inserted between the VirB6 C-terminus and GFP (**Figure II.2A**) [13]. Normalized fluorescence of cells expressing GFP directly fused to the VirB6 C-terminus was much higher than that of cells carrying the alternative construct (**Figure II.2B**). Since GFP is fluorescent in the cytoplasm and non-fluorescent when directed to the periplasm, we conclude that VirB6 C-terminus locates inside the cytoplasm.

These data, together with the consensus of the different computational methods predicting an uneven number of transmembrane segments, imply that the C-terminal region of VirB6 localizes in the cytoplasm and that the central loop locates in the periplasm, which is similar to the topology of *Agrobacterium* VirB6 [8]. This places the N-terminus and the central periplasmic loop in the same compartment as the periplasmic domains of possible interaction partners VirB8 and VirB10.

II.2.2 – VirB10-interacting domains of VirB6 identified by phage display

To identify VirB10-interacting domains within VirB6 we used phage display, an unbiased approach aimed at identifying interacting regions using large randomized libraries of peptides displayed on the surface of phages [14, 23]. The purified periplasmic domain of VirB10 was fixed on a plate and incubated with M13 phage libraries displaying random 12-mer peptides (Ph.D.-12 library) or 7-mer constrained peptides (Ph.D.-C7C library) on the surface of the M13 pIII protein. The binding phages were enriched by three rounds of panning. Sequencing of the DNA encoding the displayed peptides identified 125 unique peptides (**Table II.2**). The sequences were aligned against VirB6 sequence using the RELIC server MATCH program [15]. As the phage display approach is a screening method based on fully randomized peptide libraries, the selected sequences were not expected to provide exact matches with interacting proteins. However, this approach identified several peptides with similarity to VirB6 that

aligned with different regions of the protein, including the central periplasmic loop and the N-terminus (**Figure II.3**). We next tested these possible interaction sites using both *in vivo* and *in vitro* methods.

II.2.3 – The VirB6 N-terminal domain interacts with VirB10 *in vivo*

The interaction between VirB10 and the VirB6 was next assessed using the bacterial two-hybrid (BTH) system in which each protein was fused to the N- or the C-terminal domains of adenylate cyclase (AC), respectively. The readout of the assay consists of detecting β -galactosidase activity induced by the cAMP produced by the resulting enzymatic activity when the N- and C-terminal domains of AC are brought together by interacting fusion proteins. We co-expressed different fragments of VirB6 covering the potential interacting regions (**Figure II.4A**) fused to the C-terminus of CyaA with full-length VirB10 fused to the N-terminus of CyaA. VirB8, a known interaction partner of VirB10 was used as positive control and co-expression with empty fusion protein vectors were used as negative control. We detected β -galactosidase activity in strains expressing VirB6 residues 1-58 and 1-168 fused CyaA, but not in the case of fusion proteins to other fragments or to full-length VirB6 (**Figure II.4B**), suggesting that these regions interact with VirB10.

To determine whether β -galactosidase activities correlated with the accumulation of VirB6 fusion proteins in the cell, we conducted Western blot analysis to detect the CyaA portions of the fusion proteins. We detected VirB6 fusion proteins only in cells in which β -galactosidase activity was detected suggesting that the other fusion proteins may not be expressed or not be stable. Interestingly, the VirB10-CyaA fusion protein was also detected only in cells which β -galactosidase activity was detected, suggesting that VirB10 and its interacting domains from VirB6 as well as VirB8 mutually stabilize each other. Whereas the negative results with full-length VirB6 and other fusion proteins could be due to misfolding or low expression, the positive results in case of VirB6 1-58 and 1-168 fusions strongly suggest that this part of VirB6 contains a VirB10 binding site. In order to better define the region in VirB6 that interacts with VirB10, we next conducted *in vitro* FRET experiments with synthetic VirB6 peptides and the periplasmic domain of VirB10.

II.2.4 – The VirB6 N-terminal domain interacts with VirB10 *in vitro*

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) is a widely used method to analyze interactions between proteins. We used this approach to explore specific interactions between different VirB6-derived peptides and the periplasmic domain of VirB10. VirB6-derived synthetic peptides covering amino acids 10-33 (N-terminus, peptide I) and 100-143 (central periplasmic loop, peptide II) were chosen to represent potential interaction sites identified by phage display and the BTH assay. A third synthetic peptide comprising amino acids 301-329 (C-terminus, peptide III), which according to the predicted topology would be located in the cytoplasm, was used as a negative control. They were labeled via N-terminal Cys residues with acceptor fluorophore (Alexa fluor 456) and VirB10 was labeled with donor fluorophore (Alexa fluor 488). Fluorescence emission of donor-labeled VirB10 was measured upon increasing concentrations of acceptor-labeled VirB6 peptides. Addition of the peptide corresponding to the N-terminal domain of VirB6 increased FRET efficiency (reduced donor emission) with an apparent K_D value of $\sim 4 \mu\text{M}$ while the peptides corresponding to the central periplasmic loop and the C-terminus did not impact donor emission (**Figure II.5**). These results agree with the results of the phage display and BTH assays suggesting that the N-terminal region comprises an interaction site with VirB10.

II.2.5 – VirB6 peptides that interact with VirB10 or VirB8 do not disrupt the VirB8 and VirB10 interactions

Considering that the N-terminal peptide interacts with VirB10, the central VirB6 peptide interacts with VirB8 [7] and that VirB8 also interacts with VirB10 [24], we reasoned that these interactions may impact each other. To test this possibility, we conducted FRET assays with donor and acceptor pairs switched accordingly. VirB10 was labeled with the donor fluorophore (Alexa fluor 488) while VirB8 was labeled with the acceptor fluorophore (Alexa fluor 546). The titration curve indicated a K_D value of $0.5 \mu\text{M}$, which is in the same range of our previous data [24] (**Figure II.6A**). Next, the efficiency of energy transfer was assessed in the presence of unlabeled VirB6 N-terminal peptide (**Figure II.6A**) and of unlabeled VirB6 central peptide (**Figure II.6B**). Neither of these peptides affected the energy transfer between VirB10 and VirB8 suggesting that none of the two VirB6-derived peptides affects the

interaction between VirB8 and VirB10. Finally, we assessed whether there is an effect of VirB8 (or VirB10) on the VirB6 N-terminal peptide-VirB10 (or VirB6 central peptide-VirB8) interaction. Here, the donor fluorophore was attached to VirB10 and the acceptor was attached to the VirB6 N-terminal peptide. The effects of the addition of unlabeled VirB8 were assessed. An equivalent setup was used to assess an effect of VirB10 on VirB6 central peptide-VirB8 interaction, i.e., donor-labelled VirB8, acceptor-labelled VirB6 central peptide, unlabeled VirB10. No effects were detected on the interaction of any of the proteins with the corresponding peptide from VirB6 (**Figure II.6C and D**). The *in vitro* conditions probably mimick the *in vivo* situation only partly, but these results suggest that VirB6 is able to interact with VirB8 and VirB10 simultaneously in a non-competitive fashion. The interactions between these three proteins are likely very important for the dynamics of T4SS assembly and our results may also help understanding the results from previous work. When the pKM101 homologs of VirB7, VirB8, VirB9 and VirB10 were overexpressed in an operon a stable complex of VirB7, VirB9 and VirB10 formed, but VirB8 did not form part of this complex [4]. On the contrary, when VirB3 to VirB10 homologs from plasmid R388 were overexpressed and purified, VirB8 formed part of the resulting complex [5]. Given that VirB6 interacts both with VirB8 and with VirB10 it could stabilize the interaction between these proteins in the natural biological context explaining the presence of VirB8 in the VirB3-VirB10 complex. This transient interaction could in turn mediate the substrate transfer from VirB6 and VirB8 to VirB9 and VirB2 for which VirB10 is absolutely required [10].

II.3 – Materials and Methods

II.3.1 – Plasmid, strain constructions and mutagenesis

DNA manipulations followed standard procedures [11]. The strains and plasmids used are given in **Table II.1**. *Escherichia coli* strains JM109 (DE3) and BL21 (DE3) were used as hosts for cloning and mutagenesis and protein overproduction, respectively.

II.3.2 – Cultivation of bacteria

Cultures of *E. coli* JM109 for cloning experiments were grown at 37°C in LB medium (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) in the presence of antibiotics for plasmid propagation (ampicillin [amp], 100 µg/ml; kanamycin [kan], 50 µg/ml). For protein overproduction, *E. coli* strain BL21star (ΔDE3) was grown under aerobic conditions at 37°C in LB to exponential phase (optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.4-0.8), followed by the addition of 0.5 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) to induce gene expression. Cultivation under aerobic conditions proceeded at 26°C for 16 h after induction.

II.3.3 – Purification of fusion proteins

pHTvirB8sp, pHTvirB10sp (encoding periplasmic domains of *Brucella* VirB8 and VirB10) and their variants were transformed into BL21star (DE3) and protein overproduction and purification were carried out as described previously [12]. Briefly, 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 13 000 rpm (4°C), filtered through a 0.45 µm membrane, loaded onto a HisTrap Ni-chelate column (GE Healthcare) and eluted over a linear 50 ml gradient from 40-500 mM imidazole. Proteins were then concentrated, 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 His-tag using His-tagged TEV protease in a ratio of 1:70 for 15 h at 20°C. The solution was diluted ten times, centrifuged at 13 000 rpm (4°C), filtered through a 0.45 µm membrane and passed through a pre-equilibrated HisTrap Ni-chelate column. The flow through containing cleaved VirB8 or VirB10 was collected.

II.3.4 – Determination of the localization of the VirB6 C-terminus

The gene encoding GFP was fused to the region of *virB6* encoding the C-terminus of the protein using the pWarf vector system and fluorescence emission (λ exc 485 nm λ em 512 nm) was measured as described [13]. The level of protein production was assessed by quantifying

the intensities of the signals corresponding to the fusion proteins after performing a Western blot using anti-GFP antiserum (Roche).

II.3.5 – Phage display

Purified VirB10 (100 µg/mL) in 0.1 M NaHCO₃ pH 8.6 was adsorbed onto polystyrene microtitre plates (Thermo Scientific) and incubated at 4 °C for 16 h, followed by incubation for 2 h at 37°C with blocking buffer (0.1 M NaHCO₃, pH 8.6; 5 mg/ml BSA; 0.02% NaN₃). Phage libraries (Ph.D.-12 or Ph.D.-C7C) were diluted to 4 x 10¹⁰ pfu/ml from the original library (New England Biolabs, NEB), added to the plate, followed by washing with TBS-T and elution of VirB10-binding phage using 100 µl of elution buffer (0.2 M glycine-HCl, pH 2.1; 1 mg/ml BSA). Amplification of phage, phage separation and titering were performed as described previously [14]. Single-stranded DNAs were isolated from 1.5 ml of individually isolated plaque supernatant using the QIAprep M13 kit (Qiagen). Forward 1 (5'-GTGACGATCCCGCAAAGCGGCCT-3') and 96gIII primers (5'-CCCTCATAGTTATTAGCGTAACG-3') were used to amplify the DNA sequence encoding the surface-exposed peptide. Each PCR product was sequenced to identify the encoded peptide sequence. Unique peptides were aligned to VirB6 sequence using Relic server's MATCH program which uses a default scoring window of 5 and a threshold score of 13 [15]. Pair-wise similarity is calculated for each scoring window of residues. We also used MatchScan (P.D. Pawelek, Concordia University, Montréal) that allows calculation of peptide similarity using a wide range of residue windows and scores.

II.3.6 – SDS/PAGE and Western blotting

Cells and protein samples were incubated in Laemmli sample buffer for 5 min at 100°C, followed by SDS-PAGE [16, 17].

II.3.7 – Bacterial two-hybrid assay (BTH)

Interactions between VirB6 variants and VirB10 were assessed in vivo using the BTH system [18]. The genes encoding VirB6 variants and full length VirB10 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 interaction was detected using the functional complementation between the two catalytic AC fragments leading to cAMP/ β -galactosidase production detected using ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside as the substrate. The levels of protein production were assessed using Western blot analyses with anti-CyaA (3D1) antiserum (Santa Cruz Biotechnology Inc.).

II.3.8 – Protein labeling

Conjugation reactions of Alexa Fluor 488 (A10254, Invitrogen) or Alexa Fluor 546 (A10258, Invitrogen) were performed according to the instructions of the manufacturer. Briefly, 10 μ l of a freshly prepared aqueous solution of the dye (10 mg/ml) was added to previously reduced protein or peptide dissolved in 100 mM Tris-HCl pH 7.3, 150 mM NaCl and incubated in the dark for 2 h at room temperature. Excess probe was quenched by adding a 100-fold molar excess of dithiothreitol and removed using a Sephadex G-25 pre-packed Nap-5 column. The labeled product was further purified using a gel filtration Superdex 75 or Superdex Peptide column.

II.3.9 – Fluorescence measurements

Fluorescence emission spectra were measured at room temperature in 100 mM Tris-HCl pH 7.3, 150 mM NaCl using a Cary Eclipse spectrofluorometer. Excitation wavelength was set to 488 nm and spectra were recorded between 500 and 600 nm. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) was assessed by the decrease in Alexa fluor 488-labeled VirB10 fluorescence in the presence of Alexa fluor 546-labeled peptides and calculated as $1-(F'/F)$ where F' and F are the donor emission in the presence and absence of the acceptor, respectively. K_D values were calculated according to Wang et al. [19]. The concentration of VirB10 was 3 μ M. The fluorophore was chemically attached to an extra Cys residue inserted by mutating the gene at

position 57 of VirB10. VirB10 contains two Cys residues, which in the homologous protein from *A. tumefaciens* were shown to form a disulphide bridge essential for protein function [20]. We therefore performed the labeling under conditions in which disulfide bonds are preserved. The synthetic VirB6-peptides included an extra Cys residue at their N-terminus used for covalent binding of the fluorophore and contained the following aminoacid sequences: IGTSIHNQLNNYVTMVASNTMNMI (peptide I), DAFAGNHGTPSSTIYQTLDNSLGKGWNIAAMLFEKGDNRGLT (peptide II), and TSIFSGSSGGGGSGSAKAGGESSYSAGGN (peptide III).

II.4 – 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), the Canada Foundation for Innovation (CFI) and the Fonds de recherche du Québec-Santé (FRQ-S). We thank Peter Pawelek (Concordia University, Montreal, Canada) for the use of MATCHSCAN, Mark Smith for the construction of pHTVirB10sp and Benoit Bessette for technical assistance.

II.5 – References

1. Fronzes, R., Christie, P. J. & Waksman, G. (2009) The structural biology of type IV secretion systems, *Nature reviews Microbiology*. 7, 703-14.
2. Trokter, M., Felisberto-Rodrigues, C., Christie, P. J. & Waksman, G. (2014) Recent advances in the structural and molecular biology of type IV secretion systems, *Current opinion in structural biology*. 27C, 16-23.
3. 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, 1011-5.
4. 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, 266-8.
5. Low, H. H., Gubellini, F., Rivera-Calzada, A., Braun, N., Connery, S., Dujeancourt, A., Lu, F., Redzej, A., Fronzes, R., Orlova, E. V. & Waksman, G. (2014) Structure of a type IV secretion system, *Nature*. 508, 550-3.
6. Cascales, E. & Christie, P. J. (2004) Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate, *Science*. 304, 1170-1173.

7. Villamil Giraldo, A. M., Sivanesan, D., Carle, A., Paschos, A., Smith, M. A., Plesa, M., Coulton, J. & 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, 3881-90.
8. 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.
9. Karnholz, A., Hoefler, C., Odenbreit, S., Fischer, W., Hofreuter, D. & Haas, R. (2006) Functional and topological characterization of novel components of the comB DNA transformation competence system in *Helicobacter pylori*, *J Bacteriol*. 188, 882-93.
10. Cascales, E. & Christie, P. J. (2004) *Agrobacterium* VirB10, an ATP energy sensor required for type IV secretion, *Proc Natl Acad Sci USA*. 101, 17228-17233.
11. Maniatis, T. A., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
12. Smith, M. A., Coincon, M., Paschos, A., Jolicoeur, B., Lavalley, P., Sygusch, J. & Baron, C. (2012) Identification of the Binding Site of *Brucella* VirB8 Interaction Inhibitors, *Chem Biol*. 19, 1041-8.
13. Hsieh, J. M., Besserer, G. M., Madej, M. G., Bui, H. Q., Kwon, S. & Abramson, J. (2010) Bridging the gap: a GFP-based strategy for overexpression and purification of membrane proteins with intra and extracellular C-termini, *Protein science : a publication of the Protein Society*. 19, 868-80.
14. Carter, D. M., Gagnon, J. N., Damlaj, M., Mandava, S., Makowski, L., Rodi, D. J., Pawelek, P. D. & Coulton, J. W. (2006) Phage display reveals multiple contact sites between FhuA, an outer membrane receptor of *Escherichia coli*, and TonB, *Journal of molecular biology*. 357, 236-51.
15. Mandava, S., Makowski, L., Devarapalli, S., Uzubell, J. & Rodi, D. J. (2004) RELIC--a bioinformatics server for combinatorial peptide analysis and identification of protein-ligand interaction sites, *Proteomics*. 4, 1439-60.
16. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*. 227, 680-685.
17. Schägger, H. & von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1 to 100 kDa, *Anal Biochem*. 166, 368-379.
18. Karimova, G., Josette Pidoux, Agnes Ullmann and Daniel Ladant (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 5752-5756.
19. Wang, Z. X., Kumar, N. R. & Srivastava, D. K. (1992) A novel spectroscopic titration method for determining the dissociation constant and stoichiometry of protein-ligand complex, *Anal Biochem*. 206, 376-81.
20. 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, *Molecular microbiology*. 71, 779-94.

21. Nilsson, J., Persson, B. & von Heijne, G. (2000) Consensus predictions of membrane protein topology, *FEBS letters*. 486, 267-9.
22. Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes, *Journal of molecular biology*. 305, 567-80.
23. McCafferty, J. & Schofield, D. (2015) Identification of optimal protein binders through the use of large genetically encoded display libraries, *Current opinion in chemical biology*. 26C, 16-24.
24. 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, 4483-93.
25. 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.
26. 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.
27. 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**, 1033-43.

II.6 – Legends to figures

Figure II.1 – Predicted topology of VirB6.

Predicted transmembrane segments are shown as black rectangles with residue numbers relative to the N terminus. The N-terminus, the central loop region and the C-terminus are indicated. The five methods used are listed on the left: SOSUI: bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/, TMHMM: www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/, HMMTOP: www.enzim.hu/hmmtop/, DAS: www.sbc.su.se/~miklos/DAS/, TMPred: www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html.

Figure II.2 – Localization of VirB6 C-terminus.

A. The gene encoding VirB6 was cloned into pWarf(-) and pWarf(+) vectors. The resulting constructs code for VirB6 C-terminally fused to GFP (VirB6-GFP) and VirB6 C-terminally fused to GFP, preceded by a glycoporphin transmembrane segment (VirB6-TMgpA-GFP). The predicted orientations of the two VirB6 fusions are shown (VirB6 transmembrane helices in

gray, glycoporphin transmembrane region in black, loops as black strokes); GFP is fluorescent only in the cytoplasm. **B.** Fluorescence (excitation at 485 nm, emission at 512 nm) of whole cells expressing VirB6 fusions either in pWarf(-) or pWarf(+) relative to the value of optical density at 600 nm was normalized by the level of protein production assessed by Western blot with GFP-specific antibodies (not shown). Values and standard deviation were calculated from three independent experiments.

Figure II.3 – Identification of VirB10 binding peptides by phage display.

The purified periplasmic domain of VirB10 was subjected to three rounds of panning using the Ph.D.-C7C and Ph.D.-12 M13 phage display libraries. The sequences of the affinity-selected peptides were aligned to different regions of the VirB6 sequence using RELIC software [15]. Identical residues are highlighted in black and conserved residues are highlighted in grey.

Figure II.4 – In vivo analysis of VirB6 and VirB10 interactions using bacterial two-hybrid assay.

A. Full length VirB10 and different domains of VirB6 (fusion after amino acids 58, 142, 168, 235 and 347 (full length) and after the region comprising amino acids 58-168) were expressed as fusions to the T25 and T18 domains of adenylate cyclase, respectively. **B.** The interactions between VirB6 domains and VirB10 were assessed using the bacterial two-hybrid assay measuring β -galactosidase activity. The interaction between VirB10 and VirB8 [24] was used as the positive control while co-expression of the plasmid expressing T25VirB10 with an empty T18 fusion vector was used as the negative control. Values and standard deviations were calculated from three independent experiments. The lower panels show the Western blots using anti-Cya antibodies. Signals shown by arrows correspond to the predicted molecular masses of T18VirB6 1-58 fusion protein in the first lane, T18VirB6 1-168 in the third lane, and T18VirB8 in the last lane. The T25VirB10 fusion protein was equally detected at the predicted molecular mass in the strains expressing these three fusion proteins, signals of lower molecular masses likely correspond to degradation products.

Figure II.5 – Fluorescence resonance energy transfer between VirB6-derived peptides and VirB10.

A. Fluorescence emission of Alexa fluor 488 (donor) chemically attached to VirB10 (3 μ M) upon increasing concentrations of VirB6-derived peptides labeled with acceptor fluorophore Alexa fluor 546 (peptide 1: filled circles, amino acids 10-33; peptide 2: empty triangles, amino acids 100-143; peptide 3: empty squares, amino acids 301-329). FRET efficiency was calculated as $1-(F'/F)$ where F' and F are the donor emission in the presence and absence of the acceptor, respectively. **B.** Peptides 1-3 (amino acids in black bold print) displayed on a model of the VirB6 structure generated with TOPO2 (<http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/open-topo2.py>) based on the transmembrane segment prediction using TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

Figure II.6 – Fluorescence resonance energy transfer between VirB10, VirB8 and VirB6-derived peptides.

A. Fluorescence emission of Alexa fluor 488 (donor) chemically attached to VirB10 was measured upon increasing concentrations of VirB8 labeled with Alexa fluor 546 (acceptor) in the absence (filled symbols) and presence (empty symbols) of VirB6 N-terminal peptide (amino acids 10–33) or **B.** VirB8-interacting central VirB6 peptide (amino acids 100–143). **C.** Fluorescence emission of Alexa fluor 488 (donor) chemically attached to VirB10 was measured upon increasing concentrations of VirB6 N-terminal peptide (amino acids 10–33) labeled with Alexa fluor 546 (acceptor) in the absence (filled symbols) or presence (empty symbols) of unlabeled wild type VirB8. **D.** Fluorescence emission of Alexa fluor 488 (donor) chemically attached to VirB8 was measured upon increasing concentrations of VirB6 central peptide (amino acids 100–143) labeled with Alexa fluor 546 (acceptor) in the absence (filled symbols) or presence (empty symbols) of unlabeled wild type VirB10. FRET efficiencies were calculated as $1-(F'/F)$ where F' and F are the donor emission in the presence and absence of the acceptor, respectively.

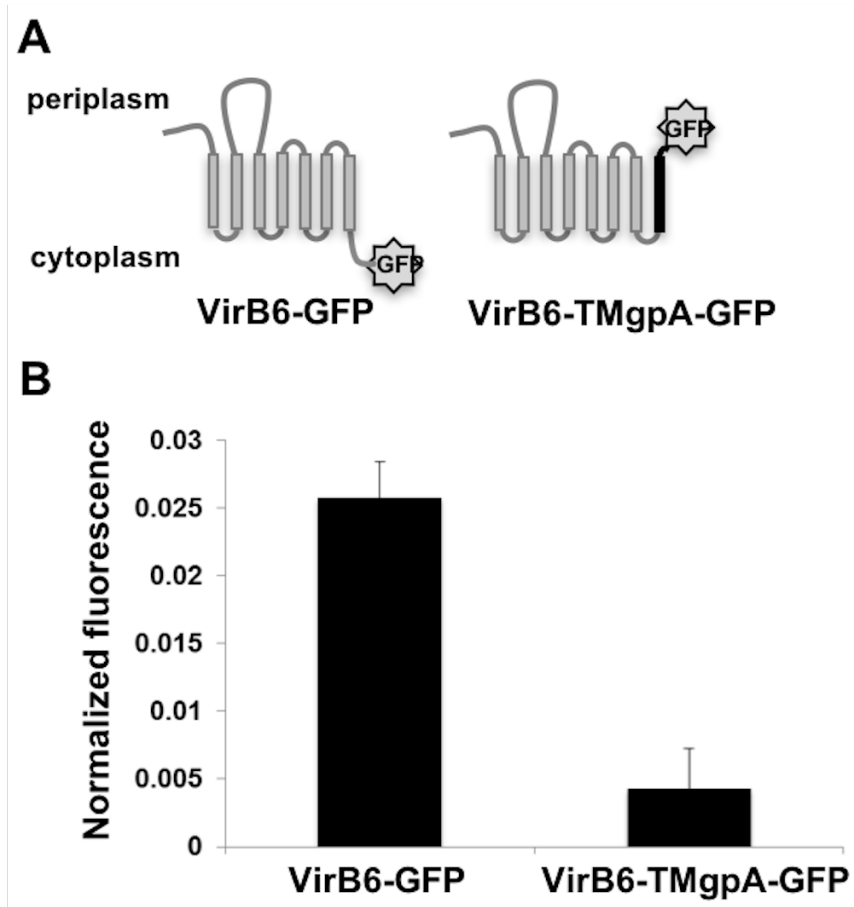


Figure II.2 : Localization of VirB6 C-terminus.

MVNPVIFEFIGTSLHNQLNNYVTMVASNTMNMIAATTAVLAGGLYYTAMGILMSVGRIEGPFSQLVISCIFMLIAAFALNISTY
 AYTTSIPNRNQL AVPHRVGGHSL KI
 KISQPTTVASLQ
 KCCGTTASSTSI
 STMNKTHMELHR

SEWVIDTVHNMESGFADAFAGNHGTPSSSTIYQTLDNSLGKGNIAAMLFEKGNRGLTQIVQGFSELLSFLVAGSTLILAGPT
 WQMKQDSVRN LLXKTLNRLYD KVVWPLLTSIVPS HNPLLSF LSSPT
 KCCFTASSTSI

GAMIVATNAVIAILLGIGPLFILALGWAPTRGFFDRWFAGIIVTSILQVALLSAVLSISSAIFSRMVAAINLASATQSTLFSCLS
 SN AWPPPSMGPPLAY KVVWPLLTSIVPS KCCFTASSTSI NLRTDS
 AHSKLELLSNR

LTAVTIVMPYMYKVYEGGILGSSISAATISLGLAVNTATSGGGAMTSIFSGSSGGGSGSAKAGCESSYSAGGNAMWSPAY
 LTLVIR KCCFTASSTSI

RQHVLGQFNRD

Figure II.3 : Identification of VirB10 binding peptides by phage display.

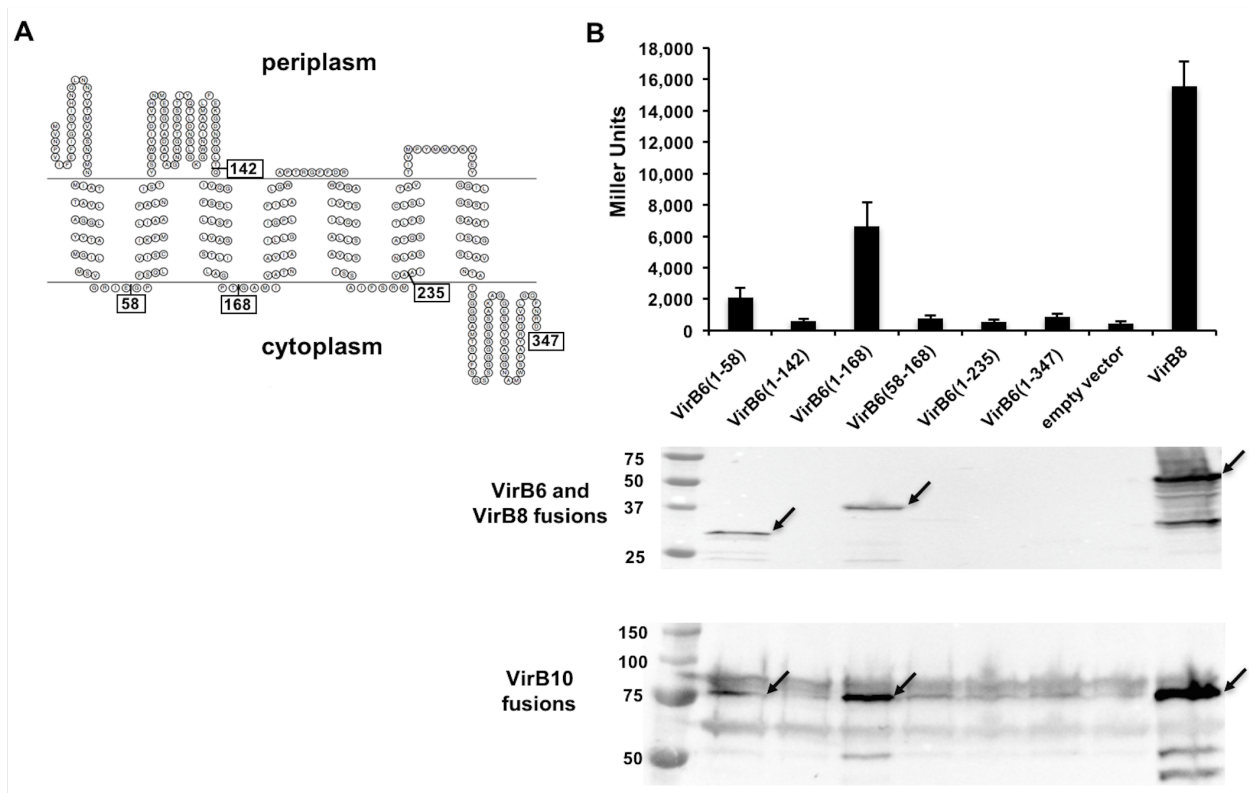


Figure II.4 : In vivo analysis of VirB6 and VirB10 interactions using bacterial two hybrid assay.

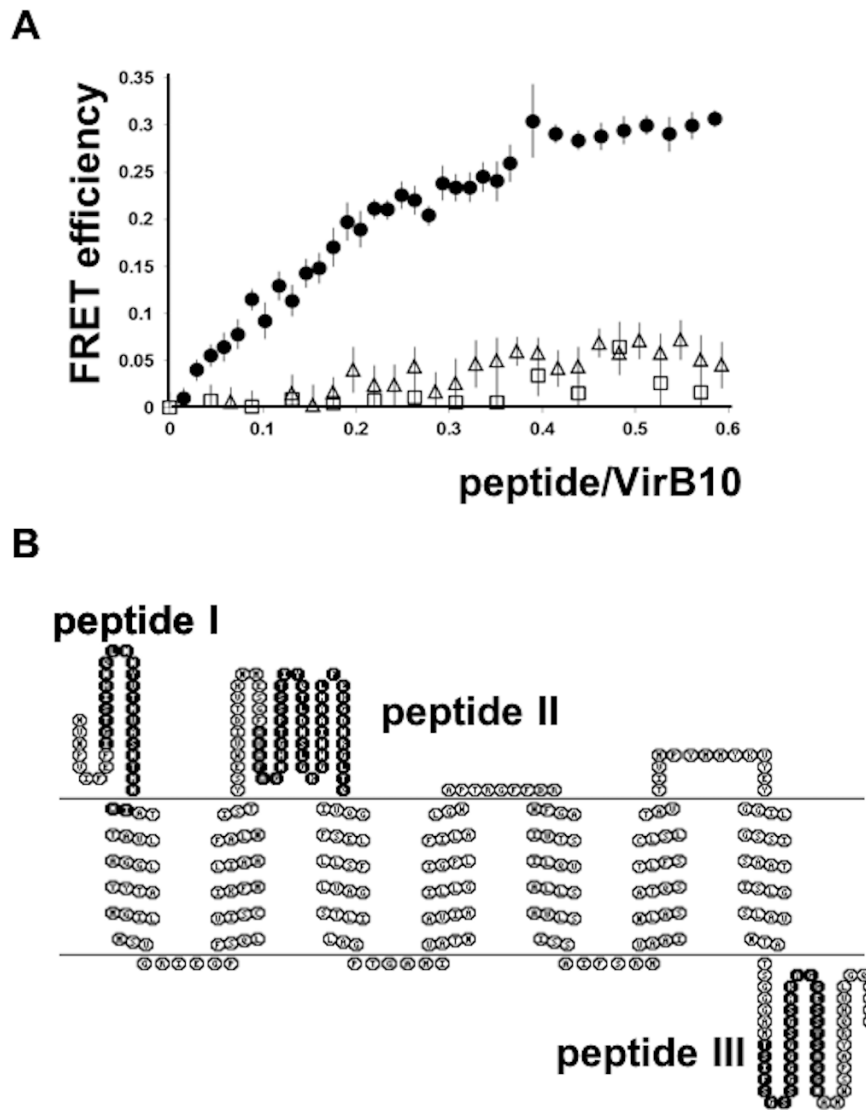


Figure II.5 : Fluorescence resonance energy transfer between VirB6-derived peptides and VirB10.

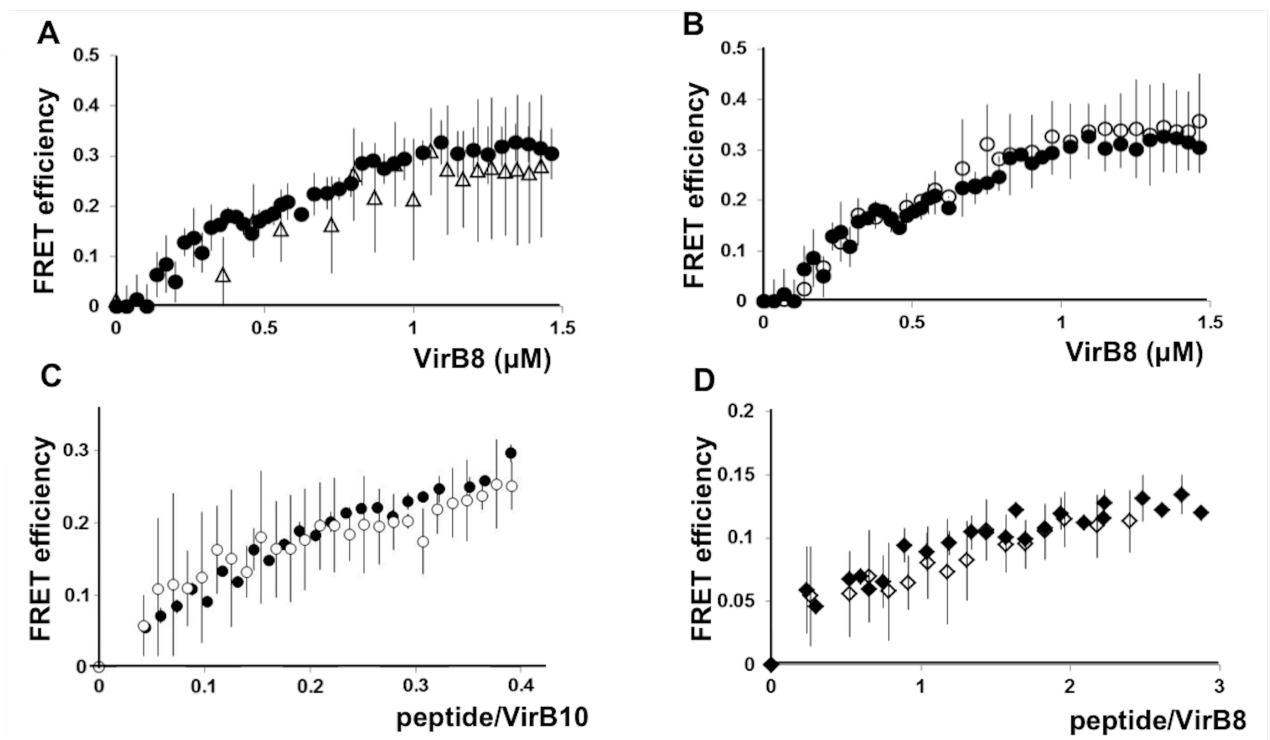


Figure II.6 : Fluorescence resonance energy transfer between VirB10, VirB8 and VirB6-derived peptides.

II.8 – Supplementary informations

Table II.1 : Bacterial strains and plasmids

Strain	Genotype or Description	Source or Reference
JM109	<i>endA1 gyr96 thi hsdR71 supE44 recA1 relA1 (Δlac-proAB) (F'traD36 proAB+lacIqlacZΔM15)</i>	[25]
BL21(DE3)star	<i>F- ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm rne131 (DE3)</i>	Invitrogen
BTH101	<i>F- cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1 (str^r), hsdR2, mcrA1, mcrB1</i>	[26]
Plasmids		
pHT	kan ^r pET24d derivative T7 expression vector with N-terminal 6xHis-tag and TEV protease cleavage site	[12]
pHTVirB8sp	kan ^r T7 promoter vector for the expression of 6xHis-tagged periplasmic domain of <i>B. suis</i> VirB8	[12]
pHTVirB8sp Q139C	kan ^r pHTVirB8sp modified to encode VirB8 with amino acid change Q139C	[12]
pHTVirB10sp	kan ^r pHT harboring 1017 bp <i>virB10</i> fragment from <i>B. suis</i> (encoding 339 amino acid periplasmic domain)	this work
pHTB10C57	kan ^r pHTVirB10sp modified to encode VirB10 with a cysteine residue included at position 57	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	[26]
pKNT25	pSU40 derivative including the T25 fragment (amino acids 1-224 of <i>B. pertussis</i> CyaA) N-terminal to the multiple cloning site	[26]
pUT18C	pUC19 derivative including the T18 fragment (amino acids 225-399 of <i>B. pertussis</i> CyaA) C-terminal to the multiple cloning site	[26]

pKT25	pSU40 derivative including the T25 fragment (amino acids 1-224 of <i>B. pertussis</i> CyaA) C-terminal to the multiple cloning site	[26]
pUT18CB10	amp ^r , pUT18C harboring 1176 bp XbaI/KpnI <i>virB10</i> fragment from <i>B. suis</i> (encoding full-length VirB10)	[27]
pKT25B10	kan ^r , pKT25 harboring 1176 bp XbaI/KpnI <i>virB10</i> fragment from <i>B. suis</i> (encoding full-length VirB10)	[27]
pUT18CB8	amp ^r , pUT18C harboring 720 bp XbaI/KpnI <i>virB8</i> fragment from <i>B. suis</i> (encoding full-length VirB8)	[27]
pKT25B8	kan ^r , pKT25 harboring 720 bp XbaI/KpnI <i>virB8</i> fragment from <i>B. suis</i> (encoding full-length VirB8)	[27]
pUT18B6 1-347	amp ^r , pUT18 harboring 1044 bp XbaI/KpnI <i>virB6</i> fragment from <i>B. suis</i> (encoding full-length VirB6)	this work
pUT18B6 1-235	amp ^r , pUT18 harboring 705 bp XbaI/KpnI <i>virB6</i> fragment from <i>B. suis</i> (encoding 235 amino acids including five predicted transmembrane segments)	this work
pUT18B6 1-168	amp ^r , pUT18 harboring 504 bp XbaI/KpnI <i>virB6</i> fragment from <i>B. suis</i> (encoding 168 amino acids including three predicted transmembrane segments)	this work
pUT18B6 1-58	amp ^r , pUT18 harboring 174 bp XbaI/KpnI <i>virB6</i> fragment from <i>B. suis</i> (encoding 58 amino acids including one predicted transmembrane segment)	this work
pUT18B6 58-168	amp ^r , pUT18 harboring 339 bp XbaI/KpnI <i>virB6</i> fragment from <i>B. suis</i> (encoding 113 amino acids including the second and third predicted transmembrane segments and the predicted periplasmic domain)	this work

Table II.2 : Unique peptides isolated from the libraries Ph.D.-C7C or Ph.D.-12

7-mer constrained peptides	12-mer peptides
T T N S P P L	H F K P M Q P A H P I P
P A H R V P S	A Y T T S I P N R N Q L
P P L S A P N	K V W P P L T S I V P S
S G T P W H P	S H P W N A Q R E L S V
A P S P W K Q	N S T L K V L P Q G W M
M E R P A H L	L S L N F D R E S E T N
R L P H S V G	V S R H Q S W H P H D L
T F L D T R A	D P A L R H T H H N L R
G E T P N P H	F P A M S F A X K K L A
P S K L Q E H	A W P P P S M G P L A Y
M R N D G A N	T I L K A W P N I T Q L
P L W D K R H	N A D N Q M T W R H V L
D S L Q Y P A	A W P P P S M G P L A Y
P L W D K R H	K I X I F Y P F K S P L I
M S K H Q A Y	A V P H R V G G L H S L
Q W T N H A L	S W N S K A W I V V P A
L S S P T S N	K V W I S P Q S L G A T
D P F H V H N	L L X K T L N N R L Y D
N D F K L Q F	K V W Q L Q P S N S V T
F G N P H G H	A W P P P S M G P L A Y
T N P V T E S	T P F P F A P L G R P P
L S Y L H P T	I L A N D L T A P G P R
D A Q W A F M	K V W P P M Y L S H T F
G P K M F R I	A Y T T S I P N R N Q L
H P Q L P S I	K I S Q P T T V A S L Q
Y K L P S R H	K V V Q L S E L S R L L
Q K A H H E Q	K V W I S P Q S L G A T
P A T Y T S A	N Q R V L P P S H S W L
N S W P P S R	N L R T D S L T L V I R
F S S S R N Y	K C C F T T A S S T S I
Q W T N H A L	K V W I S P Q S L G A T
S T H T S R L	M K V S E P L H A H F S

TLPLPNL	VSRHQSWHPHDL
NRYTPTA	ILANDLTAPGPR
PHTLSRT	KCCTLPRPLEML
DPGASHP	KVWXMAPTAFS
PEAALSS	AYTTSIPNRNQL
PKKLD SI	GLKIWSLPPHHG
KSAKTYH	KVWMPNNRGPVP
TQPWTRA	ILANDLTAPGPR
ALGHSAK	WMADTSPSLAST
PVPYPQL	SIHRHHDDHFLT
RLPHSVG	TPFPFAPLGRPP
NRGQLST	LSLNFDRESETN
SGTPWHP	KVWMPNNRGPVP
GMMPVAL	KVWMPNNRGPVP
LKITGED	AYTTSIPNRNQL
KATAQGA	HPHHETSVMRLQ
HNPLLSF	KVWPPMYLSHTF
KPASHNA	KISQPTTVASLQ
TTNSPPL	KISQPTTVASLQ
PLWDKRH	STMNDIHMELHR
GFLGKNQ	HSPSNLGFQSP
VIPQPQQ	KCCTLPRPLEML
SYPTRPT	TILKAWPNITQL
WAAIFPL	TILKAWPNITQL
FSNQTML	KVWMPNNRGPVP
NSWPPSR	AHSHKLFLLSNR
HEARSTM	KAWVLTEWQTTK
DPFHVHN	AVPHRVGGLHSL
CSTPTPH	TPFPFAPLGRPP
	IDAPANQRLLQK
	NQRVLPPSHSWL
	KIWQMDQDSVRN

Chapitre III – Deuxième article scientifique

Ce deuxième article est en continuité avec le précédent. Une fois l'interaction confirmée nous avons voulu étudier le rôle fonctionnel de cette interaction, et notamment de certains résidus de VirB6, *in vivo* par complémentation. Le but de ce papier étant d'obtenir des informations sur le mécanisme d'assemblage impliqué dans la formation du pilus et le transfert du substrat. Nous avons ainsi pu déterminer un rôle central de cette interaction pour l'incorporation de VirB2 et VirB5 dans le pilus-T et pour la fonctionnalité du T4SS.

Dans un premier temps nous avons réalisé un alanine « scanning » dans le but de changer 24 résidus présents dans le N-terminal de VirB6 constituant le site d'interaction avec VirB10. L'influence de ces changements sur l'interaction a été analysée par BTH. Une fois les résidus critiques pour l'interaction identifiés, nous avons réalisé différentes expériences *in vivo* par complémentation afin de déterminer l'impact sur la fonctionnalité du T4SS en utilisant comme modèle principal *A. tumefaciens*. Ainsi grâce à différentes expériences telles que la microscopie électronique à transmission, la fluorescence à super résolution, l'extraction des complexes grâce aux détergents, l'isolation des pili et la visualisation des effets sur la formation de galles sur les plantes, nous avons pu constater un impact de certains résidus sur la fonctionnalité du T4SS et sur la formation du pilus-T.

Cet article a été soumis au journal *Journal of Biological Chemistry* en mars 2018 (Mary C., Fouillen A., Bessette B., Nanci A., and Baron C. (2018) Interaction via the N-terminus of VirB6 with VirB10 is required for incorporation of VirB2 and VirB5 into T-pili and for type IV secretion function). Pour ce papier je suis première auteure, j'ai préparé et conduit la majorité des expériences et fait leurs analyses ; j'ai également écrit le manuscrit. Aurélien Fouillen a réalisé les expériences de microscopie électronique et a quantifié la fluorescence suite à mes expériences de microscopie super résolution ; il a également révisé le manuscrit. Benoit Bessette a préparé certaines expériences et a révisé le manuscrit. Le Dr Nanci a fourni l'aide pour l'analyse de données et le matériel nécessaire pour la microscopie. Le Dr Baron a discuté et conçu les expériences et a participé à l'écriture du manuscrit.

Interaction via the N-terminus of VirB6 with VirB10 is required for incorporation of VirB2 and VirB5 into T-pili and for type IV secretion function

Charline Mary¹, Aurélien Fouillen^{1,2}, Benoit Bessette¹, Antonio Nanci^{1,2}, and Christian Baron^{1*}

From the ¹Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada; ²Department of Stomatology, Faculty of Dental Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

Running title: *N-terminal VirB6-VirB10 interaction for pilus assembly*

*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: *Agrobacterium tumefaciens*, type IV secretion system, protein-protein interaction, membrane protein, T-pilus, VirB6, VirB10, virulence

Abstract

Many bacterial pathogens employ multicomponent protein complexes such as type IV secretion systems (T4SSs) to transfer virulence factors into host cells. Identifying the importance of the protein-protein interactions of these complexes is essential for understanding of their assembly and function. To map the interaction site between T4SS components VirB6 and VirB10 we changed amino acids from the N-terminal periplasmic domain of VirB6 by alanine scanning and by deletion of blocks of six amino acids. Analysis of the interaction using the bacterial two-hybrid system identified residues that are required for the interaction with VirB10. Western blotting after SDS-PAGE of cell lysates as well as native

PAGE of detergent-extracted membrane proteins showed that these residues modulate the stability of VirB6 and of VirB5 in *Agrobacterium tumefaciens*. However, immuno-electron microscopy and super-resolution microscopy suggest that they are not required for membrane association or for polar localization of VirB6. Deletions of two blocks of six amino acids in the N-terminus of VirB6 (amino acids 18-23 and 30-35) abolish pilus formation and virulence of *A. tumefaciens*. The corresponding deletions in the VirB6 homolog TraD from the plasmid pKM101 T4SS abolish plasmid transfer. Our results demonstrate that specific residues of the N-terminal domain of VirB6 are required for the interaction with VirB10, for the stabilization of VirB6 and for the incorporation of VirB2 and VirB5 into T-pili explaining the effects of the changes on T4SS function.

III.1 – Introduction

Type IV secretion systems (T4SSs) mediate the translocation of DNA and protein substrates across the cell envelopes of Gram-negative (Gram-) and Gram-positive (Gram+) bacteria (1,2). Proteins composing the T4SS are conserved in plant, animal and human pathogens such as *Agrobacterium tumefaciens*, *Brucella suis* and *Helicobacter pylori* (3). *A. tumefaciens*, a soil-borne bacterial plant pathogen that is responsible of Crown Gall tumor disease, uses a T4SS to deliver DNA (a segment of oncogenic DNA from the Ti plasmid) and proteins into plants (4,5). Its T4SS consists of 12 proteins, VirB1-11 and VirD4, which assemble into a macromolecular complex that spans the inner and the outer membrane. A combination of X-ray crystallography and cryo-electron microscopy solved the structure of the outer part of the T4SS from plasmid pKM101 (6,7). Transmission electron microscopy was used to solve the structure of the VirB3-10 complex from the plasmid R388 T4SS (8) and VirD4 equally localized in this complex (9). This work focuses on the analysis of the interaction between the inner membrane protein VirB6 and VirB10 that is anchored in both bacterial membranes, but currently their exact localization in the T4SS is unknown (8).

VirB6 is a polytopic inner membrane protein that is essential for substrate secretion that has a periplasmic N-terminus and a cytoplasmic C-terminus. VirB6 from *A. tumefaciens* potentially comprises five transmembrane (TM) segments and a large periplasmic loop, while in silico studies predict seven TM domains for VirB6 from *B. suis* and also the presence of a large periplasmic loop (10,11). Amino acid substitutions in the periplasmic loop reduce the interaction of VirB6 with the T-strand substrate, and deletions of N-terminal and C-terminal residues abolish substrate transfer to VirB2 and VirB9 (11). VirB6 impacts VirB7 and VirB9 multimerization and it also stabilizes VirB5 and it is therefore a key component for T-pilus and T4SS assembly (12,13). VirB6 is believed to act in concert with VirB8 in DNA transfer (11,14) and the putative periplasmic loop of VirB6 may be the site of interaction (15). We have previously shown that the N-terminus of VirB6 from *B. suis* interacts with VirB10 (10), but specific amino acids that form the interaction site have not been identified and we have no insights into the mechanistic role of this interaction.

VirB10 is another essential component of the T4SS that is anchored both to the inner and the outer membranes making it a structural scaffold protein (14,16). It is also considered to be an energy sensor, since it undergoes a conformational change induced by the energizing T4SS components VirD4 and VirB11 (16,17). VirB10 comprises a short N-terminal cytoplasmic region, one TM α -helix, a periplasmic region containing a proline-rich domain and a C-terminal β -barrel domain (18). TraF, a homolog of VirB10 in the conjugative plasmid pKM101, was found to interact in the outer membrane complex with TraN and TraO (homologs of VirB7 and VirB9, respectively) to form a ring-like structure (6,7,18).

VirB6 and VirB10 interact via the N-terminal region of VirB6 (10) and deletion of this region impedes DNA substrate transfer to VirB2 and VirB9 (11), suggesting that this interaction is critical for the functionality of the T4SS. The first objective of this study was to map the residues in the N-terminal portion of VirB6 that are essential for its interaction with VirB10. Secondly, we used *in vivo* studies to evaluate the consequences of amino acid substitutions at the interaction site on T4SS stability and functionality.

III.2 – Results

III.2.1 – Analysis with the bacterial two-hybrid system to identify residues of VirB6 involved in the VirB6/VirB10 interaction

Following up on our previous work that identified the N-terminus as interaction site (10), we determined which residues of VirB6 from *B. suis* (VirB6b) are involved in the interaction with VirB10b. We used the bacterial two-hybrid (BTH) assay to measure the interaction between a construct expressing the first 168 amino acids of VirB6b and full-length VirB10b and we changed each of the 24 amino acids (I10 to I33) comprising the previously identified VirB10b-binding peptide to alanine (10). Since protein-protein interaction sites typically comprise more than one amino acid, we also deleted four blocks of six amino acids each of this peptide. The BTH results (**Figure III.1A**) show that deletions $\Delta(16-21)$ and $\Delta(28-33)$ as well as the amino acid substitution L18A strongly reduce the interaction. In contrast, no individual amino acid substitution between residues N28 and I33 strongly impacts the interaction. To ensure that we study changes that have strong impact on the protein-protein interaction we focused in the

following on those reducing the interaction to less than 50% of the wild type level. Western blot analysis showed reduced levels of these VirB6b variants in the cell as compared to wild type (WT) and levels of VirB10b are equally reduced (**Figure III.1B**). These results are in accordance with our previous data suggesting that the fusion proteins mutually stabilize each other in the heterologous host *E. coli* (10).

III.2.2 – Effect of changes in the N-terminus of VirB6 on the stability of T4SS components

To assess the effects of amino acid substitutions and deletions in the N-terminus of VirB6 on the stability and function of the T4SS, we analyzed the effects of complementation with the protein variants *in vivo*. The BTH assays were conducted with the VirB6 homolog from *Brucella* and we used alignments with the CLUSTAL multiple sequence alignment tool MUSCLE (3.8) to identify the corresponding residues of VirB6 from *A. tumefaciens* (VirB6a) and TraD from the pKM101 T4SS (**Figure III.2**). This analysis showed that amino acid L18 and deletions $\Delta(16-21)$ and $\Delta(28-33)$ from VirB6b correspond to amino acid F20 and deletions $\Delta(18-23)$ and $\Delta(30-35)$ in VirB6a and to amino acid I17 and deletions $\Delta(15-20)$ and $\Delta(27-32)$ in TraD. We also substituted residues L18 from VirB6a and V21 from TraD by alanine to serve as controls, since we did not expect these changes to have effects based on the results of BTH analysis.

We tested the effects on the complementation of a *virB6* deletion strain of *A. tumefaciens* C58 (CB1006) (13). Expression of VirB6a from pTrc200 leads to overproduction of the protein, even in the absence of the inducer IPTG, and VirB6aL18A and to a lesser extent VirB6a $\Delta(18-23)$ are also highly expressed (**Figure III.3**). In contrast, the levels of VirB6aF20A and VirB6a $\Delta(30-35)$ are low, but reproducibly higher than in the deletion strain CB1006. The levels of VirB5 are strongly reduced in CB1006 and complementation with VirB6a, VirB6aL18A and VirB6a $\Delta(18-23)$ restores the wild type level (**Figure III.3**). Complementation with VirB6aF20A and VirB6a $\Delta(30-35)$ increases the level of VirB5, but to levels lower than after complementation with the wild type. We do not observe significant effects of the deletion or of the complementation on the levels of any other VirB protein.

III.2.3 – VirB6 and its variants localize in the membrane and show polar localization

To assess the localization of VirB6a and its variants in *Agrobacterium*, we analyzed the bacteria by electron microscopy (EM) of thin sections labelled with VirB6-specific primary antibody and colloidal gold-labelled protein A (**Figure III.4**). The results show that VirB6 is present in the membranes of virulence-gene induced strain C58, it is not detected in CB1006 and it is present in comparable amounts in the membranes of the complemented strains.

Previous work using immunofluorescence microscopy (19,20) and C-terminal GFP fusion (11) showed that VirB6 localizes to the cell pole. We also analyzed the localization in the cells using sfGFP (superfolder-GFP) fused to the C-terminus of VirB6a wild type and variants. Using Structural Illumination Microscopy (SIM), we demonstrated the preferential localization of VirB6a and of its variants to the cell pole (**Figure III.5A**). Quantification comparing the Corrected Total Cell Fluorescence (CTCF) in the bacteria and on each pole demonstrated that there is preferential accumulation at one pole of the cell for the wild type and all variants (**Figure III.5B**) and the overall amounts of fluorescence are similar.

Since the results of EM and SIM analysis do not match the differences of the accumulation of VirB6a and some of the variants observed by SDS-PAGE and western blotting, we next isolated VirB protein complexes by detergent extraction.

III.2.4 – Effect of changes in the N-terminus of VirB6 on the stability of T4SS membrane protein complexes

In previous work we have shown that VirB proteins can be extracted from the membranes in complexes of different sizes that likely reflect functionally important subcomplexes (21). This work had suggested that VirB6a is important for the formation of a low molecular mass complex of VirB2a and VirB5a that could be a T-pilus pre-assembly complex (22). We next analyzed whether the variants of VirB6a impact the formation of this complex. Membrane proteins were extracted with dodecyl β -D-maltoside (DDM), followed by separation by native gel electrophoreses and western blotting with specific antisera (**Figure III.6**). In wild type cells VirB9a and VirB10a were detected in high molecular mass complexes of around 500 kDa, whereas VirB2a, VirB5a co-fractionate at around 160kDa and VirB6a migrates with a

significantly higher molecular mass of about 200 kDa. We do not observe notable differences on the accumulation of VirB2a, VirB9a and VirB10a even in the absence of VirB6a, suggesting that the protein does not impact the stability of these proteins and their complexes. The amounts of VirB6a are similar to those observed after SDS-PAGE of cell lysates showing overexpression of VirB6a as well as of VirB6aL18A and VirB6a Δ (18-23) in the complemented strain. In contrast, the levels of VirB6aF20A and VirB6a Δ (30-35) are lower and similar to VirB6a in the wild type strain C58. The levels of VirB5a are similar in all strains expressing VirB6a and its variants showing that the amino acid substitutions and deletions of VirB6a have no impact on the formation of the different complexes.

III.2.5 – Effect of changes in the N-terminus of VirB6 and TraD on T4SS functions

Since the amino acid substitutions and deletions primarily affect the levels of VirB6a in the cells we conducted T4SS functional assays to determine the importance of the VirB6-VirB10 interaction. First, since VirB6 is important for T-pilus biogenesis and substrate transfer (11) we isolated extracellular high molecular mass structures from the cell surface by shearing and ultracentrifugation and tested for the presence of major T-pilus component VirB2 and minor component VirB5 (**Figure III.7**). T-pilus formation is not observed in CB1006 and the defect is complemented by expression of VirB6aL18A and to a lesser extent by VirB6aF20A. In contrast, variants VirB6a Δ (18-23) and VirB6a Δ (30-35) do not complement T-pilus formation. Very similar results were observed when the formation of tumors after infection of carrot discs (**Figure III.8A**) and *Kalanchoë daigremontiana* leaflets (**Figure III.8B**) was assessed. Complementation with VirB6a Δ (18-23) and VirB6a Δ (30-35) does not restore tumor formation in both assays, whereas VirB6aL18A fully complements. Expression of VirB6aF20A complements in the carrot disc infection assay (**Figure III.8A**) and leads to an attenuated phenotype in the *Kalanchoë daigremontiana* assay (**Figure III.8B**).

To obtain independent evidence for the importance of the N-terminus of VirB6 we also tested functionality of similar changes in its homolog TraD from the pKM101 T4SS that mediates plasmid conjugation. Amino acid substitutions and deletions in regions corresponding to the above changes in VirB6 were introduced into the *traD* gene following

sequence alignments as shown above (**Figure III.2**). Next, TraD and its variants TraDI17A, TraDV21A, TraD Δ (15-20) and TraD Δ (27-32) were expressed in a pKM101 *traD* insertion strain. Analysis of conjugative plasmid transfer into recipient WL400 shows that TraD variants with single amino acid substitutions (TraDI17A and TraDV21A) fully complement, but that the deletion variants TraD Δ (15-20) and TraD Δ (27-32) do not complement the *traD* defect (**Figure III.8C**).

The results of functional assays suggest that the interaction between VirB6 and VirB10-like proteins via the N-terminus of VirB6 is essential for late stages of T-pilus biogenesis and for T4SS function.

III.3 – Discussion

We here present a detailed analysis of the requirements of amino acids from an interacting peptide of 24 amino acids from the N-terminal region of VirB6 for its interaction with VirB10 and for T4SS function. Whereas the effects of certain individual amino acid substitutions on the protein-protein interaction are very clear in the BTH assay (more than 70% reduction), analysis of complementation with VirB6aL18A and VirB6aF20A in *A. tumefaciens* shows that the changes do not have very strong effects on overall protein and T4SS functions. We observe similar results using equivalent single amino acid substitutions in the pKM101 conjugation system suggesting that they may be generally applicable for the interaction of VirB6 and VirB10 homologs.

In contrast, the effects of deletions of blocks of six amino acids that have much stronger effects in the BTH assay (80% to 85% reduction) are much stronger in the *Agrobacterium* and pKM101 complementation assays showing that the interaction is essential for T4SS function. This distinction is likely due to the fact that protein-protein interaction sites usually comprise several amino acids. It is therefore difficult to perturb them with single amino acid substitutions. Nevertheless, complementation with the VirB6aF20A variant had an intermediate phenotype leading to reduced T-pilus formation and tumor formation in the *Kalanchoë daigemontiana* infection assay. These assays are not quantitative, but the results suggest that amino acid F20 plays an important role for the protein-protein interaction or for folding of the VirB6 protein. The fact that amino acid substitutions F20A, Δ (30-35), and to a

lesser extent $\Delta(18-23)$, reduce the levels of VirB6a in the cells as compared to the overexpressed wild type protein suggest that the changes do have an impact on protein stability and this may be due to folding defects. Nevertheless, they accumulate to levels similar to that in the virulence-induced strain C58 and they stabilize VirB5 suggesting that the overall impact on their folding is not major.

Using both fluorescence and electron microscopy we did not observe any significant differences in the accumulation of the different VirB6 variants. Also, SIM showed that VirB6a and all variants localize to a single pole of the cells, which is similar to previous observations (19). The results suggest that even the non-functional variants arrive at their normal location in the cell in the membrane and at the pole. These observations somewhat contradict the results of SDS-PAGE analysis, and it is possible that this is due to misfolded proteins that may not enter the gels and can therefore not be detected by western blotting. The results from SDS-PAGE analysis correlate well with those obtained after detergent extraction and native PAGE showing that VirB6 fractionates in a complex of approximately 200 kDa, but that the amounts of the F20A and $\Delta(30-35)$ variants are reduced as compared to the overexpressed wild type protein. Nevertheless, the amount of these proteins in the cell is similar to VirB6 in strain C58 and the levels of the other membrane protein complexes, including VirB5 that is stabilized by VirB6, are similar to wild type complementation.

These results suggest that the effects of the amino acid substitutions and deletions on the overall folding and stability of VirB6 and on the stabilization of VirB5 are relatively limited. The observed effects on T-pilus assembly and T4SS functions are therefore due to effects on protein function, suggesting that perturbation of the VirB6-VirB10 interaction prevents T-pilus assembly and T4SS function. Interestingly, after detergent extraction from the membranes VirB6 and VirB10 fractionate in complexes of two different sizes, and VirB2 and VirB5 co-fractionate in a lower molecular mass complex (this work and (21)). Whereas these complexes are present and some proteins target themselves to the cell pole (19), T4SS assembly may not be possible because of a lack of interaction between VirB6 and VirB10. This interaction may be a central point for the assembly of the different parts preventing the recruitment of the VirB2-VirB5 complex to build the pilus (22). Deletion of the *virB6* gene results in a strong decrease of the level of VirB5 and the cells do not assembly T-pili. Strains

complemented with VirB6a Δ (18-23) and VirB6a Δ (30-35) are avirulent and they do not assemble T-pili, but VirB5 and other VirB proteins and their complexes are stable suggesting that the perturbation of the VirB6-VirB10 interaction explains the phenotype.

Deletions of the VirB6 N-terminus (Δ 1-30, Δ 30-60) or C-terminus (Δ 261-290) abolish substrate transfer to VirB2 and VirB9 (11) and deletion of *virB10* blocks later-stages of transfer from VirB6/VirB8 to VirB2/VirB9 (23). These results underline the importance of VirB6 and VirB10 for interactions of VirB2. However, N- and C-terminal residues of VirB6 are dispensable for substrate trafficking to and across the inner membrane (11,12). The substrate transfer to VirB6 does not depend on pilus formation and deletions of the genes encoding VirB2 or VirB9 have no effect on its transfer to VirB6 and VirB8 (14,24). Also, the fact that VirB11 supports pilus production even when substrate transfer is blocked (24) shows that the pilus can be formed even when the translocated substrate does not bind to VirB6. VirB6 may therefore induce pilus formation in a substrate-independent fashion. The pilus assembly signal could be induced when VirB4/VirB11 interact with VirB6 and it is further transmitted via a conformational change of VirB10 to the VirB2-VirB5 complex (16,24) (**Figure III.9**). The non-complementing VirB6 variants stabilize VirB5, but they may not be able to transfer the pilus assembly signal to VirB2-VirB5 due to the absence of interaction with VirB10. This model is consistent with the results of previous studies showing that substrate is not translocated when portions of the N-terminus (Δ 1-30, Δ 30-60) of VirB6 are lacking (11).

We already know that VirB6 and VirB8 may link the core T4SS proteins to the pilus assembly complex comprising VirB2 and VirB5 (22). Other studies have shown the importance of VirD4 for the transfer of substrate to VirB11 and VirB4, coordinating substrate transfer to VirB6 (25). Finally, a conformational switch of VirB10 is induced by substrate engagement and contacts between VirD4 and VirB11 (23). To conclude, VirB6 may receive a signal via the VirB4/VirB11 complex, which leads to the recruitment of other components for pilus production. Simultaneously, VirB10 will undergo a conformational change that may be necessary for recruitment of VirB2/VirB5 and substrate translocation to these proteins. Our results demonstrate that preventing the VirB6-VirB10 interaction leads to defects of the recruitment of VirB2/VirB5 for pilus assembly and of substrate translocation. Future studies

on the interaction site of VirB10 with VirB6 should also include VirB8 that is believed to function together with VirB6 in substrate translocation. These interaction sites may be used as target for inhibitors of T4SS function in bacterial virulence and in plasmid transfer of antimicrobial resistance genes.

III.4 – Experimental procedures

III.4.1 – Plasmid construction and DNA modification procedure

The strains and plasmids used are listed in supplementary **Table III.1**. For making the *A. tumefaciens* CB1006 strain, an in-frame deletion of *virB6* was introduced into the Ti plasmid of nopaline strain C58, as described previously (10,26). For complementation experiments, the nopaline Ti plasmid *virB6* gene and the *traD* gene from the IncN plasmid pKM101 were PCR amplified and cloned in pTrc200 vector, resulting in pTrcVirB6 and pTrcTraD. To determine effects of variants in the conjugation assay, strain FM433 carrying a non-polar transposon insertion in the *traD* gene was transformed with complementation vector pTrc200 (negative control), pTrc200TraD (positive control), or pTrc200 expressing TraD variants.

E. coli strain XL-1 Blue was used as host for cloning and mutagenesis. Standard protocols were used for DNA manipulations using enzymes from New England Biolabs. Cultures for cloning experiments were grown at 37°C in Lysogeny Broth (LB). Antibiotics were added for plasmid selection (50 µg/mL spectinomycin, 50 µg/mL streptomycin, 100 µg/mL ampicillin, 50 µg/mL kanamycin).

III.4.2 – Bacterial two-hybrid assay (BTH)

Residues implicated in the interactions between VirB6b and VirB10b were determined *in vivo* using the BTH system (10,27). The genes encoding VirB6b(1-168) or its variants were fused to the DNA sequence encoding the T18 fragment and full length VirB10s was fused to the T25 fragment. These fragments correspond to the catalytic domain of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase (AC), and are co-expressed in BTH101 AC (*cya*) deficient cells. The interaction was detected using the functional complementation between the two catalytic AC fragments, leading to cAMP/β-galactosidase production. β-galactosidase activity was then

assessed by using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal) or ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) as substrate. The transformants were plated onto LB-X-Gal-IPTG (40 μ g/mL and 1 mM respectively) medium, with the 2 antibiotics (amp. 100 μ g/mL and kan. 50 μ g/mL) and incubated at 26°C for 48 h to detect blue or white colonies. Quantification was assayed by growing BTH101 colonies carrying the T18/T25 fusion plasmids in LB with the appropriate antibiotics (amp. 100 μ g/mL and kan. 50 μ g/mL) overnight at 26°C with 1 mM IPTG. The β -galactosidase activity was measured from 20 μ l aliquots of the cultures mixed with 80 μ l of detection buffer (8 mg/mL 2-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG), 0,01% SDS, 50 mM β -mercaptoethanol mixed in Z-buffer (0.06 M Na₂HPO₄x7H₂O, 0.04 M NaH₂PO₄xH₂O, 0.01 M KCl, 0.001 M MgSO₄) pH 7.0). Reaction mixtures were incubated for 2 h at room temperature, and reactions were stopped with 100 μ L 1 M Na₂CO₃. The end products were measured at 420 nm and 550 nm with a 2104 EnVision Multilabel Plate Reader (PerkinElmer). Specific activity was calculated as Miller Units = [OD₄₂₀ - (1.75 x OD₅₅₀)] / [(t) x OD₆₀₀ x (vol in mL)] X 1000 (OD₆₀₀ = after 12 h incubation; (t) = time needed for the color formation). The levels of protein production were assessed using western blot analyses with anti-CyaA (3D1) antiserum (Santa Cruz Biotechnology Inc.) for VirB6b and VirB10b-specific antiserum.

III.4.3 – SDS/PAGE, native gel and western blot

Cells and protein samples were incubated in Laemmli sample buffer for 10 min at 95°C, followed by SDS-PAGE. For analysis of VirB6a, samples were lysed with detergent and incubated in Laemmli sample buffer for 15 min at 37°C, followed by SDS-PAGE. For native gel, proteins solubilized by 2% DDM were mixed with Coomassie Blue G-250 to confer negative electric charge for electrophoretic separation and followed by native gradient gel electrophoresis (4-16% acrylamide) (21).

Western blotting was performed in a tank blot apparatus and proteins transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Detection was performed with VirB protein-specific antisera and a chemiluminescence-based solution.

III.4.4 – Bacterial growth and virulence gene induction

For experiments performed with *A. tumefaciens* strain C58 (wild type), its derivatives CB1006 and CB1006 complemented with VirB6 or its variants, cells were grown in YEB medium (10 mg/mL tryptone, 1 mg/mL yeast extract, 5 mg/mL sucrose, 2 mM MgSO₄) with spectinomycin (300 µg/mL) and streptomycin (100 µg/ml) for plasmid propagation during 24 h at 26°C. Following this, cells were inoculated at an OD₆₀₀ of 0.1 in liquid ABMM+ABSalt 1X pH5.5 (ABMM: 10 mg/mL glucose, 3.9 mg/mL MES (morpholineethanesulfonic acid), 1 mM Na-K-P buffer (0.5M KH₂PO₄ to adjust pH 5.5 by adding Na₂PO₄ 0.5 M); AB-Salts: 20 mg/mL NH₄Cl, 6 g/mL MgSO₄·7H₂O, 0.2 mg/mL CaCl₂, 0.05 mg/mL FeSO₄·7H₂O, pH5.5), for 5h30 at 20°C. After this, 1 mL of bacteria was plated on 30 cm diameter Petri dishes (ABMM+ABSalt solidified with 2% agar) with 200 µM of acetosyringone (AS) or without (-AS) for virulence gene induction and further incubated at 20°C for 4 days. Otherwise, 200 µM of AS can be added (or not) directly into the liquid culture and incubated at 20°C for 20h for virulence gene induction (13,28).

III.4.5 – Colloidal gold labeling assays

Bacteria were produced as described above and cells were sedimented and fixed with 4% paraformaldehyde (Acros organics, Morris Plains, NJ, USA) and 0.1% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA) for 30 min at 4°C, followed by post-fixation with 1% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) for 1 h at room temperature. Between each step, the pellet was washed three times with 0.1 M phosphate buffer. Pellets were then dehydrated using graded alcohol and processed for embedding in LR White resin (London Resin Company; Berkshire, UK). Ultrathin sections of 80–100 nm thickness were cut with a diamond knife and collected on Formvar–carbon coated 200-mesh nickel grids. For immunoelectron microscopy, sections were blocked with 1% ovalbumin in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS) and incubated overnight with VirB6a mouse antiserum (1:200 dilution) in PBS. They were then washed using PBS, and blocked again before 30 min incubation with 10 nm protein A-coupled gold beads (1:50 dilution, University Medical Center, Utrecht, The Netherlands). Finally, sections were stained with lead citrate for 1 min and observed in a Tecnai 12 transmission electron microscope (FEI Eindhoven, The

Netherlands) operated at 120 kV and images were acquired using a 2 k CCD AMT camera. The gold particles over bacterial profiles were quantified using ImageJ.

III.4.6 – Fluorescence assays

For fluorescence microscopy, 2.5 μ L of samples at OD600 4 were spotted on a coverslip and immobilized by 2.5 μ L of ProLong Diamond (Life Technologies™, Mississauga, ON, Canada). Samples were examined at 30°C with a 63x/1.4 oil objective under structured illumination microscopy using an Elyra PS1 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Proteins linked to the sfGFP were excited at 485 nm and emission around 507 nm was observed using a 14bit EMCCD camera. Z-stack volumes were acquired using the Structural Illumination Method (SIM) and reconstructed using the Zen Black edition software. Fluorescence of entire bacteria and of each bacterial pole were quantified using the Corrected Total Cell Fluorescence (CTCF) (29) using the ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij>).

III.4.7 – Isolation of membranes and detergent extraction

The isolation was conducted following the protocol as previously described (21). Briefly, cells were pelleted from 100 ml of ABMM-ABSalt liquid culture. Each pellet was resuspended in the appropriate volume of 50 mM Na-K-phosphate buffer (pH 5.5) to obtain the same amount of bacteria in each sample. 7 mL of each sample was passed through the cell disruptor at 27 kPsi two times. PMSF was added at 0.5 mM after the second round. Cell debris was removed by centrifugation at 3,600 g in a SS-34 rotor (Sorvall) for 20 min. Soluble and membrane proteins in the supernatant were then separated by ultracentrifugation for 2 h at 150,000 g in a Sorval T-1270 rotor. Membrane pellets were stored on ice for 12 h. Then, 1 mL of ACA buffer (750 mM 6-amino-caproic acid (ACA), 50 mM BisTris, pH7) was added and the membranes were suspended by sonication (8 times 10s duty 40% force 2, Branson sonifier 450). For detergent solubilizing, the protein concentration was adjusted to 10 mg/ml and DDM was added from a 10% stock solution in ACA buffer to give final concentrations of 2%. The samples were mildly shaken for 2h40 at 4°C, followed by ultracentrifugation for 2 h at 150,000 g in a Sorval T-1270 rotor to separate DDM-soluble and -insoluble proteins. Because

of interference from the detergent, protein concentrations in the soluble and insoluble fractions could not be determined at this point.

III.4.8 – Isolation of T-pilus

The isolation of T-pilus was conducted following the protocol as described previously (28). Briefly, cells were grown on ABMM ABSalt agar in 30-cm-diameter plates (4 plates per sample). Cells from each plate were collected with 5 mL of 50 mM Na-K-P buffer (pH 5.5) and then centrifuged at 12,000 g for 1 h in a SS34 rotor. Cell pellets were suspended in 1 mL of Na-K-P buffer, passed ten times through a 26-gauge needle to remove surface-associated high-molecular-weight structures and then centrifuged in a microcentrifuge for 1h30min at 14,000 g. Supernatants were subjected to high-speed centrifugation at 230,000 g for 1h40 min in a Sorval T-1270 rotor to separate high-molecular-weight structures, like flagella and pili, from other soluble constituents coming from cell shearing. Pellets were resuspended in 80 μ L of Na-K-P buffer.

III.4.9 – Virulence assays

Kalanchoë daigremontiana were injured with a needle and inoculated with 10 μ L of *A. tumefaciens* cells (wild type and complemented derivatives) grown for 5h30 at 20°C as described above. Tumor formation was scored after 5-6 weeks.

For the carrot experiments, *A. tumefaciens* was inoculated at 0.1 OD600 in YEB after 24 h cultivation in YEB and placed at 26°C for 5 h (logarithmic-phase culture). During that time, carrots were sterilized with 20% of commercial bleach during 30 min. Under a hood, carrots were rinsed with sterile water and cut into 4-5 mm slices. The apical surface was placed on AB buffer plate (1 mM NaH₂PO₄ + K₂HPO₄ pH5.5) and 4 slices per plate were used. Slices were inoculated with 15 μ L of 10⁹ cells of *Agrobacterium* harvested and suspended in AB buffer. Slices were placed at 20°C for 48 h and then transferred to 24°C. Tumors were monitored 3–4 weeks after inoculation.

III.4.10 – Conjugation assays

E. coli FM433 pKM101 donor strains (WT or complemented) and WL400 recipient strain (chloramphenicol resistant) were grown in liquid LB medium at 37°C (with 100 µg/mL amp. for pKM101 and 34 µg/mL chloramphenicol for WL400) to an OD600 of 0.5–1, pelleted by centrifugation, and resuspended in an appropriate volume of LB medium to obtain an OD600 of 1, without antibiotics. Equal amounts of donor and recipient strains (1 µl of each) were mixed on prewarmed LB agar in 96-well plates and incubated for 1 h or 2 h at 37 °C to enable conjugation. Cells were then washed from the well with 150 µL 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 µg/mL amp., 34 µg/mL chloramphenicol).

III.5 – 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), the Canada Foundation for Innovation (CFI) and the Fonds de recherche du Québec-Santé (FRQ-S). A.N. is recipient of a Canada Research Chair in Calcified tissues, Biomaterials and Structural Imaging. We extend our thanks to Katia Julissa Ponce (Université de Montréal, Department of Stomatology) for technical assistance.

III.6 – References

1. Fronzes, R., Christie, P. J., and Waksman, G. (2009) The structural biology of type IV secretion systems. *Nature reviews. Microbiology* 7, 703-714
2. Trokter, M., Felisberto-Rodrigues, C., Christie, P. J., and Waksman, G. (2014) Recent advances in the structural and molecular biology of type IV secretion systems. *Current opinion in structural biology* 27, 16-23
3. Cascales, E., and Christie, P. J. (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nature reviews. Microbiology* 1, 137-149
4. Zupan, J., Muth, T. R., Draper, O., and Zambryski, P. (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J.* 23, 11-28
5. Christie, P. J., and Gordon, J. E. (2014) The *Agrobacterium* Ti Plasmids. *Microbiol Spectr.* 2

6. Chandran, V., Fronzes, R., Duquerroy, S., Cronin, N., Navaza, J., and Waksman, G. (2009) Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature* 462, 1011-1015
7. Fronzes, R., Schafer, E., Wang, L., Saibil, H. R., Orlova, E. V., and Waksman, G. (2009) Structure of a type IV secretion system core complex. *Science* 323, 266-268
8. Low, H. H., Gubellini, F., Rivera-Calzada, A., Braun, N., Connery, S., Dujeancourt, A., Lu, F., Redzej, A., Fronzes, R., Orlova, E. V., and Waksman, G. (2014) Structure of a type IV secretion system. *Nature* 508, 550-553
9. Redzej, A., Ukleja, M., Connery, S., Trokter, M., Felisberto-Rodrigues, C., Cryar, A., Thalassinou, K., Hayward, R. D., Orlova, E. V., and Waksman, G. (2017) Structure of a VirD4 coupling protein bound to a VirB type IV secretion machinery. *The EMBO journal* 36, 3080-3095
10. Villamil Giraldo, A. M., Mary, C., Sivanesan, D., and Baron, C. (2015) VirB6 and VirB10 from the *Brucella* type IV secretion system interact via the N-terminal periplasmic domain of VirB6. *FEBS letters* 589, 1883-1889
11. Jakubowski, S. J., Krishnamoorthy, V., Cascales, E., and Christie, P. J. (2004) *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 domains direct the ordered export of a DNA substrate through a type IV secretion system. *Journal of molecular biology* 341, 961-977
12. Jakubowski, S. J., Krishnamoorthy, V., and Christie, P. J. (2003) *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 Protein Participates in Formation of VirB7 and VirB9 Complexes Required for Type IV Secretion. *Journal of bacteriology* 185, 2867-2878
13. Hapfelmeier, S., Domke, N., Zambryski, P. C., and Baron, C. (2000) VirB6 Is Required for Stabilization of VirB5 and VirB3 and Formation of VirB7 Homodimers in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology* 182, 4505-4511
14. Cascales, E., and Christie, P. J. (2004) Definition of a Bacterial Type IV Secretion Pathway for a DNA Substrate. *Science* 304, 1170-1173
15. Villamil Giraldo, A. M., Sivanesan, D., Carle, A., Paschos, A., Smith, M. A., Plesa, M., Coulton, J., and 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, 3881-3890
16. Cascales, E., and Christie, P. J. (2004) *Agrobacterium* VirB10, an ATP energy sensor required for type IV secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 17228-17233
17. Banta, L. M., Kerr, J. E., Cascales, E., Giuliano, M. E., Bailey, M. E., McKay, C., Chandran, V., Waksman, G., and Christie, P. J. (2011) An *Agrobacterium* VirB10 mutation conferring a type IV secretion system gating defect. *Journal of bacteriology* 193, 2566-2574
18. Jakubowski, S. J., Kerr, J. E., Garza, I., Krishnamoorthy, V., Bayliss, R., Waksman, G., and Christie, P. J. (2009) *Agrobacterium* VirB10 domain requirements for type IV secretion and T pilus biogenesis. *Molecular microbiology* 71, 779-794
19. Judd, P. K., Kumar, R. B., and Das, A. (2005) Spatial location and requirements for the assembly of the *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion apparatus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11498-11503

20. Judd, P. K., Kumar, R. B., and Das, A. (2005) The type IV secretion apparatus protein VirB6 of *Agrobacterium tumefaciens* localizes to a cell pole. *Molecular microbiology* 55, 115-124
21. Krall, L., Wiedemann, U., Unsin, G., Weiss, S., Domke, N., and Baron, C. (2002) Detergent extraction identifies different VirB protein subassemblies of the type IV secretion machinery in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11405-11410
22. Yuan, Q., Carle, A., Gao, C., Sivanesan, D., Aly, K. A., Hoppner, C., Krall, L., Domke, N., and Baron, C. (2005) Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *The Journal of biological chemistry* 280, 26349-26359
23. Cascales, E., Atmakuri, K., Sarkar, M. K., and Christie, P. J. (2013) DNA Substrate-Induced Activation of the *Agrobacterium* VirB:VirD4 Type IV Secretion System. *Journal of bacteriology* 195, 2691-2704
24. Sagulenko, E., Sagulenko, V., Chen, J., and Christie, P. J. (2001) Role of *Agrobacterium* VirB11 ATPase in T-pilus assembly and substrate selection. *Journal of bacteriology* 183, 5813-5825
25. Atmakuri, K., Cascales, E., and Christie, P. J. (2004) Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Molecular microbiology* 54, 1199-1211
26. Schmidt-Eisenlohr, H., Domke, N., and Baron, C. (1999) TraC of IncN plasmid pKM101 associates with membranes and extracellular high-molecular-weight structures in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 181, 5563-5571
27. Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 5752-5756
28. Schmidt-Eisenlohr, H., Domke, N., Angerer, C., Wanner, G., Zambryski, P. C., and Baron, C. (1999) Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology* 181, 7485-7492
29. McCloy, R. A., Rogers, S., Caldon, C. E., Lorca, T., Castro, A., and Burgess, A. (2014) Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle* 13, 1400-1412
30. Zinoni, F., Heider, J., and Böck, A. (1990) Features of the formate dehydrogenase mRNA necessary for decoding of the UGA codon as selenocysteine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 4660-4664
31. Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van Den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R. A., and Schell, J. (1974) Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252, 169-170
32. Paschos, A., den Hartigh, A., Smith, M. A., Atluri, V. L., Sivanesan, D., Tsolis, R. M., and 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. *Infection and immunity* 79, 1033-1043

33. Langer, P. J., and Walker, G. C. (1981) Restriction endonuclease cleavage map of pKM101: relationship to parental plasmid R46. *Mol Gen Genet.* 182, 268-272
34. Winans, S. C., and Walker, G. C. (1985) Conjugal transfer system of the IncN plasmid pKM101. *Journal of bacteriology* 161, 402-410

III.7 – Legends to figures

Figure III.1 – Results of bacterial two hybrid analysis to assess the interactions of VirB10b with variants of VirB6b(1-168).

A) Bacterial two-hybrid assay measuring β -galactosidase activity in *E. coli* indicator strain BTH101 resulting from the interactions of CyaA fusion proteins to VirB10b and VirB6b(1-168) carrying substitutions of indicated amino acids by alanine or deletions of blocks of six amino acids. Positive control (+), fusions to VirB10b and VirB6b(1-168) WT and negative control, (-) fusion to VirB10b and strain not expressing an interaction partner. **B)** Analysis of protein levels after SDS-PAGE and Western blot using anti-CyaA and anti-VirB10b antibodies. Molecular masses of reference proteins are shown on the left (in kDa). Values and standard deviations were calculated from five independent experiments. P-values were obtained by t-test, significant differences were observed between several variants and wild type (****: $p < 0.0001$).

Figure III.2 – Sequence alignment between VirB6b, VirB6a and TraD.

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8) indicating which residues and deletions in VirB6a and TraD correspond to the ones identified with the BTH assay in VirB6b. Sequence similarity is indicated as (*) identical (single, fully conserved residue), (:) conserved substitutions (strongly similar properties), and (.) semi-conserved substitutions (weakly similar properties).

Figure III.3 – VirB proteins levels in strains C58 and CB1006 after complementation with VirB6a and its variants.

Results of SDS-PAGE and western blot analysis with VirB protein-specific antisera of *A. tumefaciens* C58 cultivated without (-AS) or with virulence gene induction (+AS) and *virB6* deletion (CB1006) transformed with empty vector pTrc200 or pTrc200 expressing VirB6a or its variants VirB6aL18A, VirB6aF20A, VirB6a Δ (18-23) and VirB6a Δ (30-35). The signals of the expected molecular masses of VirB proteins are indicated by arrows. Molecular masses of reference proteins are shown on the left (in kDa). Representative results of five repetitions are shown.

Figure III.4 – Immunogold labeling using VirB6-specific antisera to localize Virb6-WT and its variants in *A. tumefaciens*.

A) Results of immuno-EM analysis with VirB6-specific antisera and colloidal gold-labelled protein A of *A. tumefaciens* C58 cultivated without (-AS) or with virulence gene induction (+AS) and *virB6* deletion (CB1006) transformed with empty vector pTrc200 or pTrc200 expressing VirB6a or its variants VirB6aL18A, VirB6aF20A, VirB6a Δ (18-23) and VirB6a Δ (30-35). Gold beads are indicated by arrows. **B)** Graphic representation of the number of gold beads per μm^2 . Values and standard deviations were calculated from three independent experiments. P-values were obtained by t-test, no significant differences were observed between strain C58 and complemented CB1006, ns: $p \geq 0.05$.

Figure III.5 – Structural illumination microscopy of sfGFP-fused VirB6a and its variants.

A) C-terminal fusions of VirB6 and of variants VirB6aL18A, VirB6aF20A, VirB6a Δ (18-23) and VirB6a Δ (30-35) to sfGFP were expressed in strain CB1006 and imaged by SIM. **B)** Quantification of the fluorescence using the Corrected Total Cell Fluorescence (CTCF) method showing preferentially polar localization for each sample (****: $p < 0.0001$). Values and standard deviations were calculated from three independent experiments. P-values were obtained by t-test, for each construction, between the overall bacteria and pole 1 or pole 2, ns: $p \geq 0.05$, *: $0.01 < p < 0.05$ and ****: $p < 0.0001$.

Figure III.6 – Native gel electrophoresis to separate detergent-extracted VirB protein complexes.

Membranes were extracted with detergent dodecyl maltoside (DDM) from *A. tumefaciens* C58 cultivated without (-AS) or with virulence gene induction (+AS) and *virB6* deletion (CB1006) transformed with empty vector pTrc200 or pTrc200 expressing VirB6a or its variants VirB6aL18A, VirB6aF20A, VirB6a Δ (18-23) and VirB6a Δ (30-35). DDM-solubilized membrane proteins were separated by native PAGE, followed by western blotting with specific antisera and detected in different molecular mass ranges are indicated by arrows. Molecular masses of reference proteins are shown on the left (in kDa). Representative results of four repetitions are shown.

Figure III.7 – Analysis of the formation of T-pili.

T-pili were isolated from *A. tumefaciens* C58 cultivated without (-AS) or with virulence gene induction (+AS) and *virB6* deletion (CB1006) transformed with empty vector pTrc200 or pTrc200 expressing VirB6a or its variants VirB6aL18A, VirB6aF20A, VirB6a Δ (18-23) and VirB6a Δ (30-35). High-molecular mass extracellular structures were isolated from the surface of *A. tumefaciens* by shearing, followed by ultracentrifugation. T-pilus components VirB2 and VirB5 were detected by SDS-PAGE and western blotting with specific antisera. Molecular masses of reference proteins are shown on the left (in kDa). Representative results of four repetitions are shown.

Figure III.8 – Virulence and conjugation assays.

A) Carrot discs and **B)** *Kalanchoë daigremontiana* assays showing the formation of tumors after infection with *A. tumefaciens* C58, *virB6* deletion (CB1006) and CB1006 transformed with empty vector pTrc200 or pTrc200 expressing VirB6a or its variants VirB6aL18A, VirB6aF20A, VirB6a Δ (18-23) and VirB6a Δ (30-35). Representative results of three repetitions are shown. **C)** Conjugation assays between pKM101-carrying donor strain FM433 and plasmid-free recipient WL400 were conducted for 1h or 2h. Donor cells were pKM101 wild type and a *traD* insertion mutant transformed with pTrc200 (empty vector) or complemented with pTrc200 expressing TraD or its variants TraDV21A, TraDI17A, TraD Δ (15-20) and TraD

$\Delta(27-32)$. Conjugation assays showing effects of changes on the capacity of TraD and its variants to complement (CFU, colony-forming units of recipient strain). Values and standard deviations were calculated from three independent experiments.

Figure III.9– Model for the role of the VirB6-VirB10 interaction for T4SS assembly.

(1) The interaction between VirB6 and VirB10 enables (2) the recruitment of the components of the T-pilus VirB2 and VirB5 to the T4SS (3) and is an essential step for pilus biogenesis.

III.8 – Figures

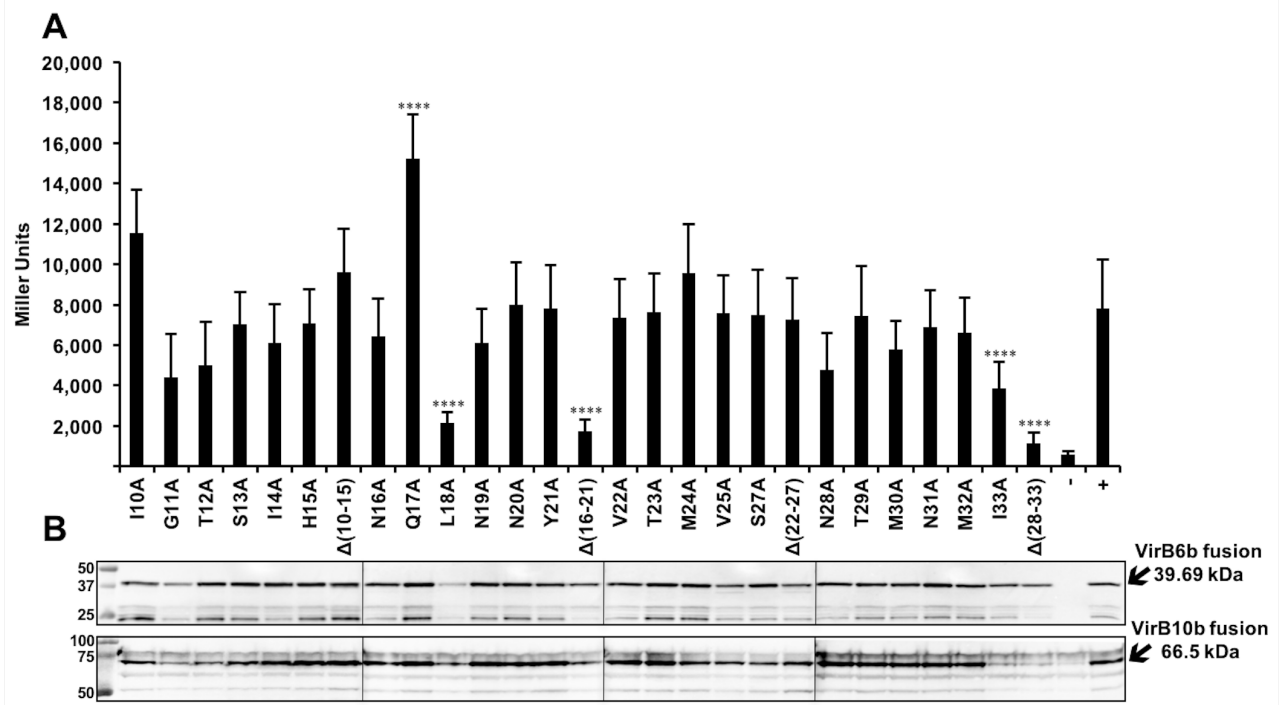


Figure III.1 : Results of bacterial two hybrid analysis to assess the interactions of VirB10b with variants of VirB6b(1-168).

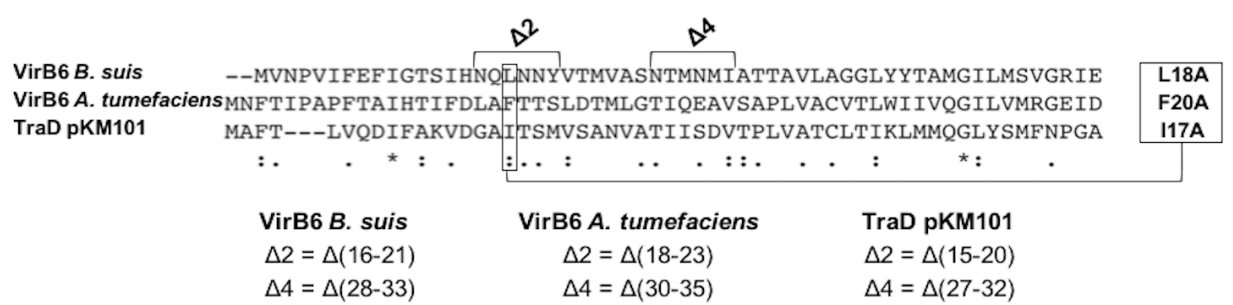


Figure III.2 : Sequence alignment between VirB6b, VirB6a and TraD.

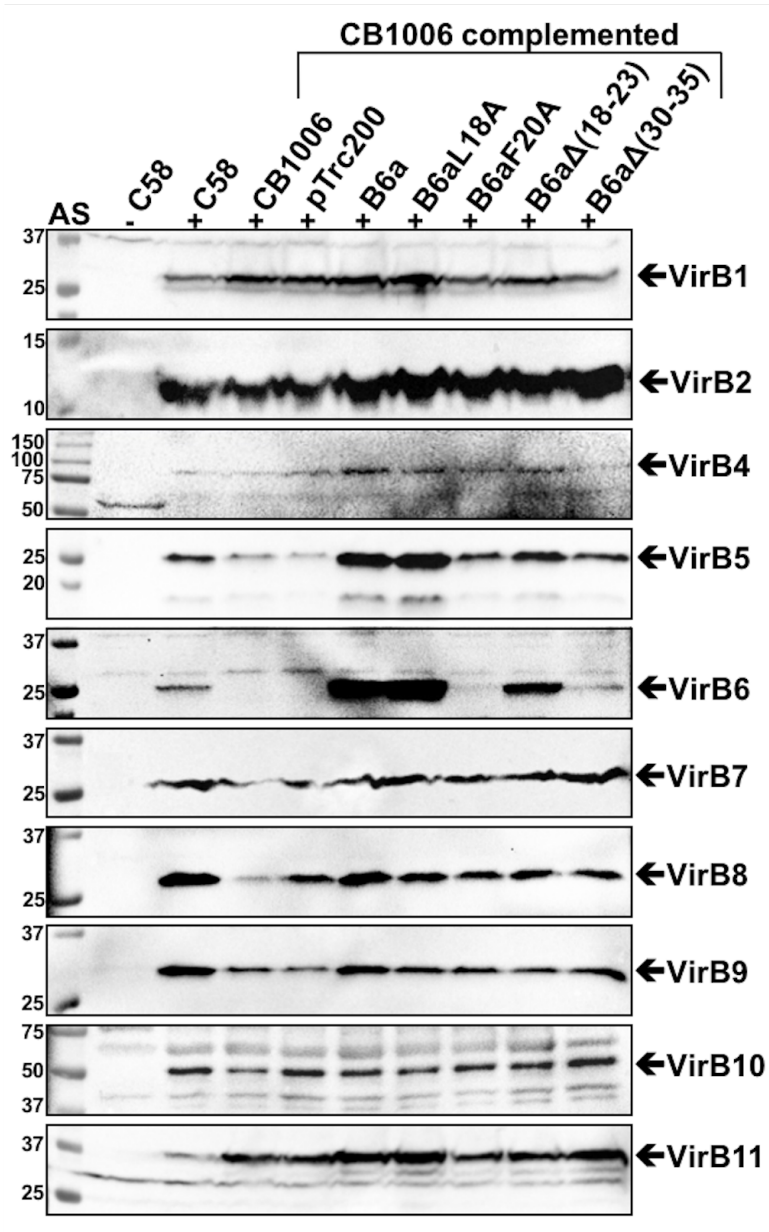


Figure III.3 : VirB proteins levels in strains C58 and CB1006 after complementation with VirB6a and its variants.

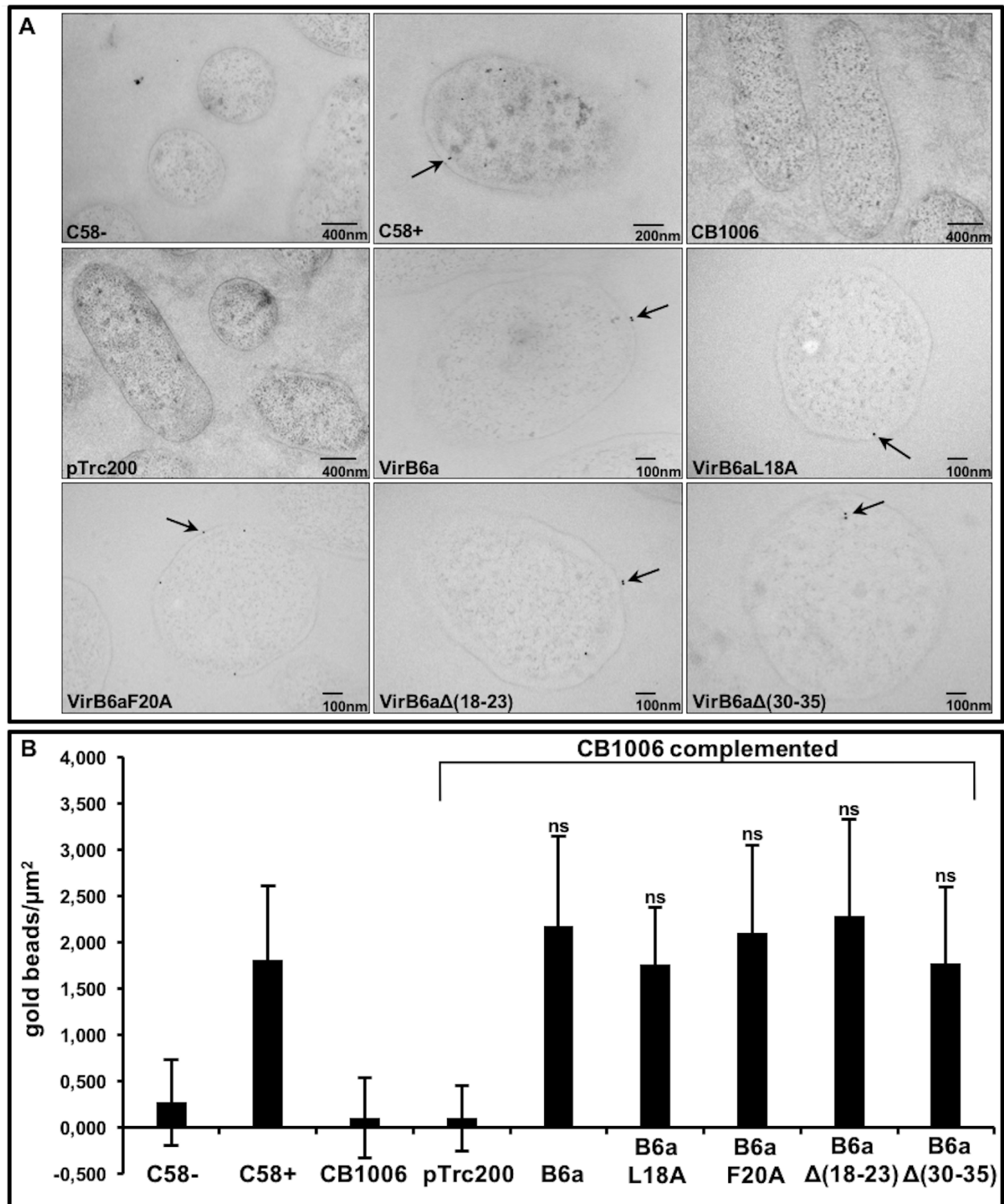


Figure III.4 : Immunogold labeling using VirB6-specific antisera to localize Virb6-WT and its variants in *A. tumefaciens*.

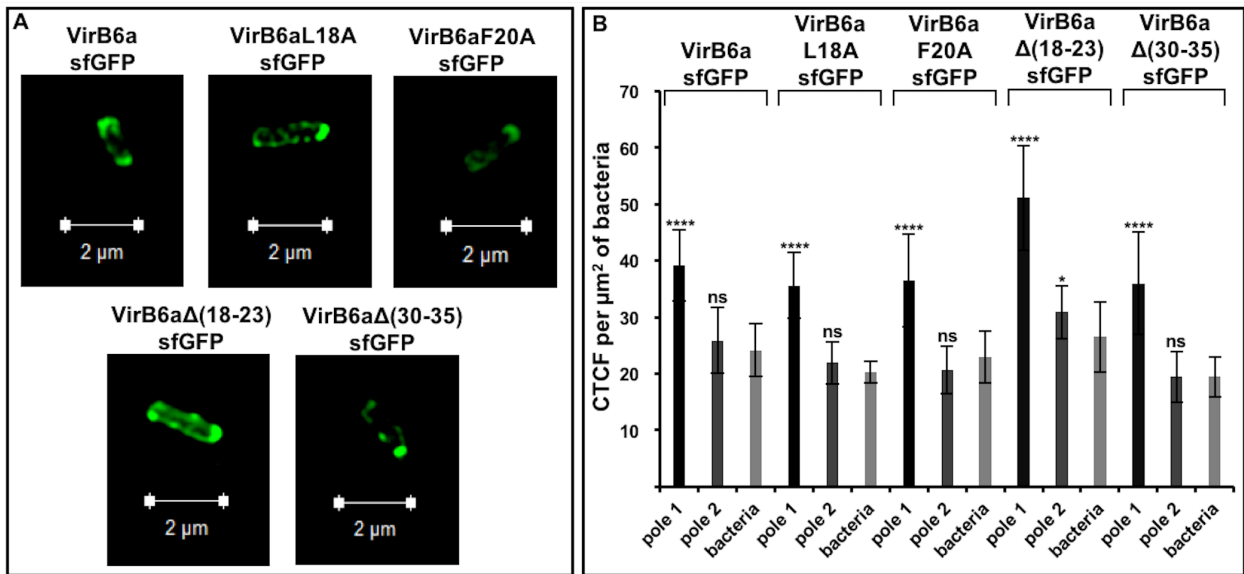


Figure III.5 : Structural illumination microscopy of sfGFP-fused VirB6a and its variants.

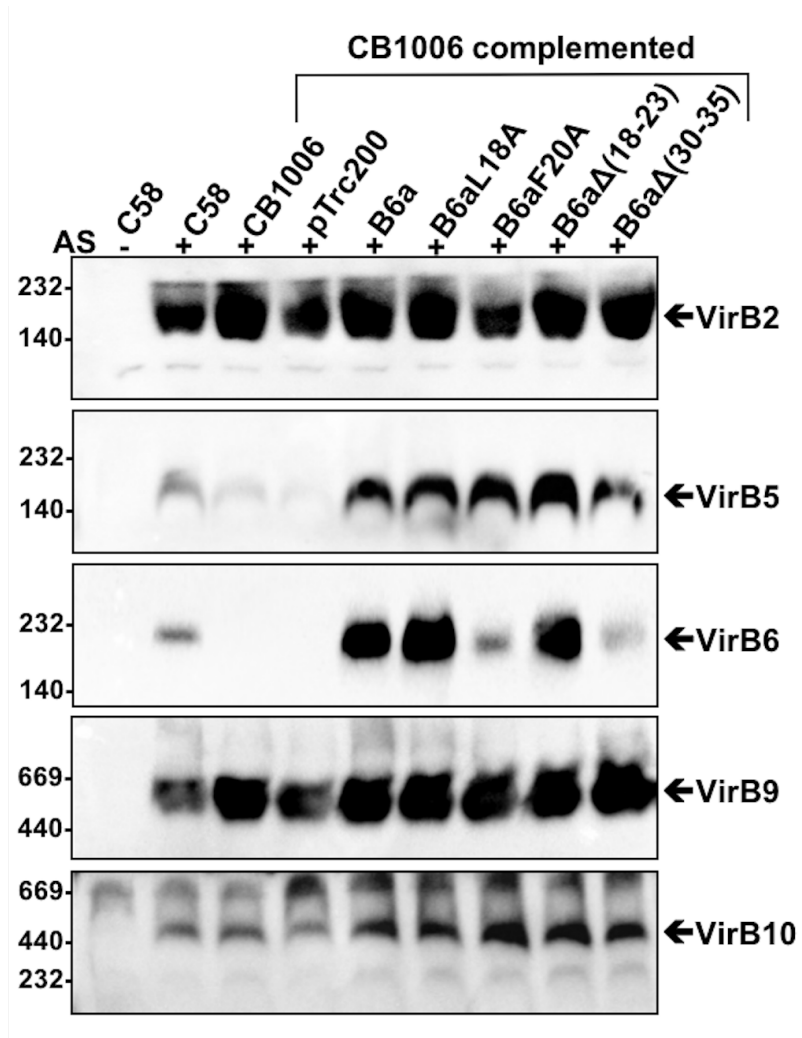


Figure III.6 : Native gel electrophoresis to separate detergent-extracted VirB protein complexes.

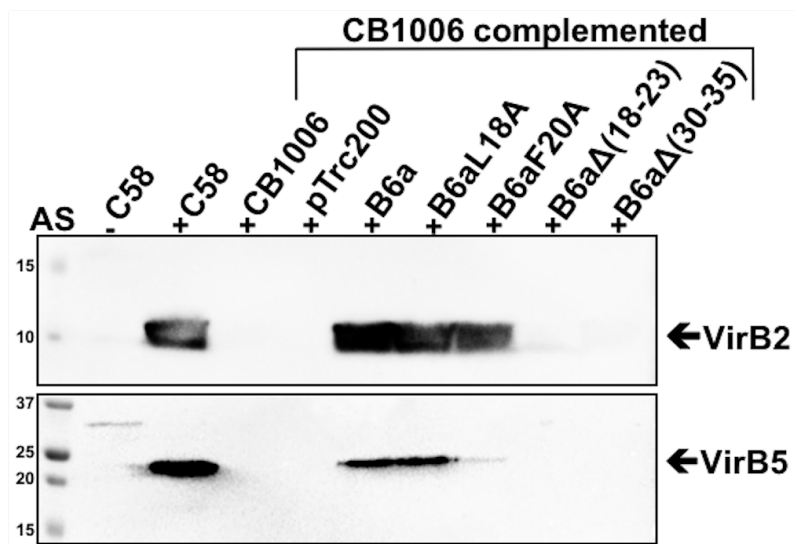


Figure III.7 : Analysis of the formation of T-pili.

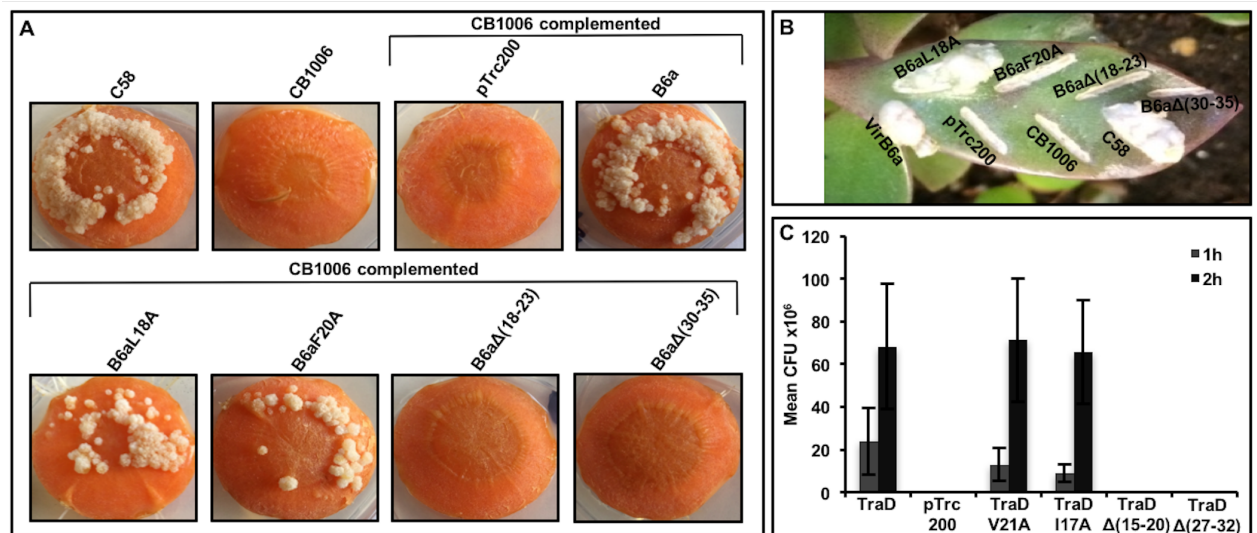


Figure III.8 : Virulence and conjugation assays.

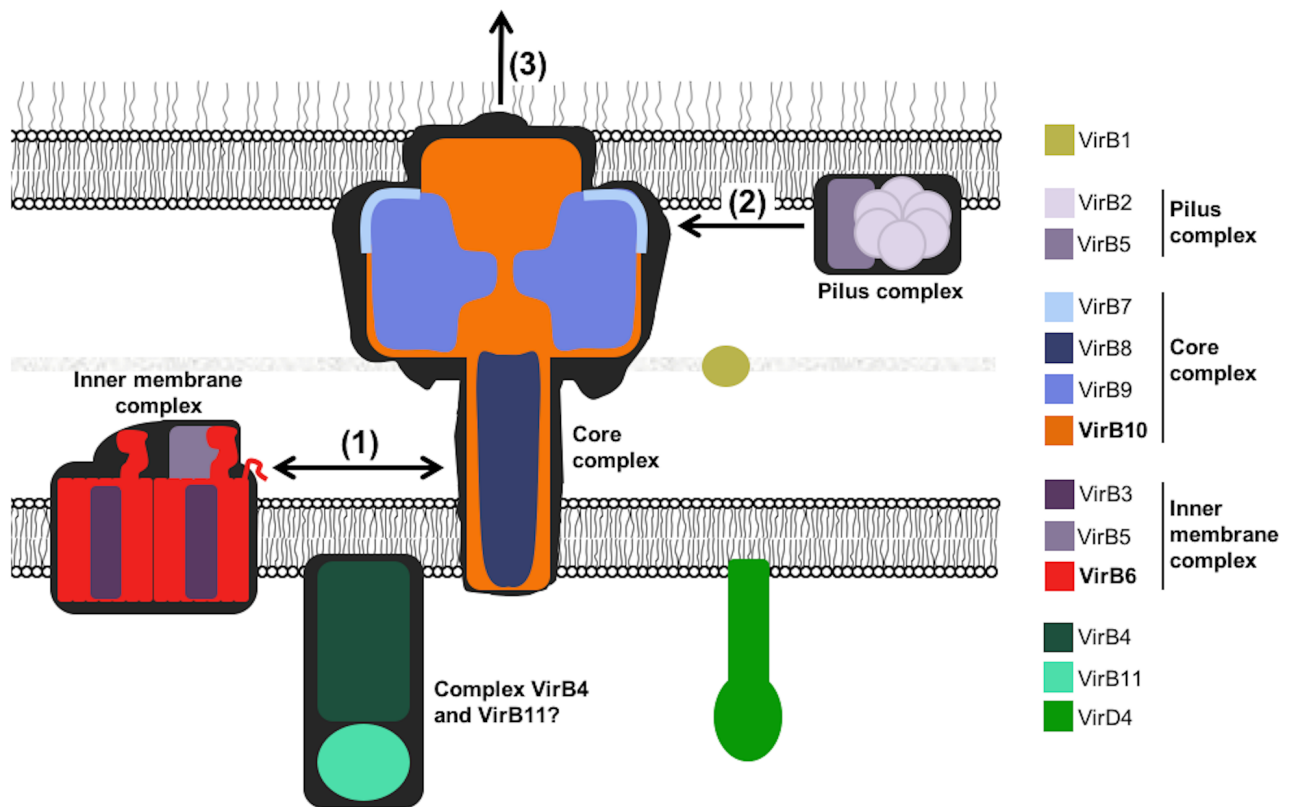


Figure III.9 : Model for the role of the VirB6-VirB10 interaction for T4SS assembly.

III.9 – Supplementary informations

Table III.1 : Bacterial strains and plasmids.

Strains or plasmids	Genotype/description	Source or reference
<i>E. coli</i> strains		
XL-1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac (F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr))</i>	Agilent Technologies
BTH101	<i>F- cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1 (str^r), hsdR2, mcrA1, mcrB1</i>	(27)
FM433	<i>Spc^faraD139 Δ (argF-lac)U169 ptsF25 deoC1 relA1 flbB5301 rpsE13 Δ (srl-recA)306::Tn10</i> , conjugation donor	(30)
WL400	<i>Cm^rStr^raraD139 Δ (argF-lac)U169, ptsF25 deoC1 relA1 flbB5301 rpsL150 ΔselD204::cat</i> , conjugation recipient	W. Leinfelder, unpublished data
<i>A. tumefaciens</i> strains		
C58	Wild type, pTiC58	(31)
CB1006	pTiC58 carrying in-frame deletion of <i>virB6</i>	This work
Plasmids		
pUT18	kan ^r , pUC19 derivative including the T18 fragment (amino acids 225–399 of <i>B. pertussis</i> CyaA) N-terminal to the multiple cloning site	(27)
pKNT25	kan ^r , pSU40 derivative including the T25 fragment (amino acids 1–224 of <i>B. pertussis</i> CyaA) N-terminal to the multiple cloning site	(27)
pUT18C	amp ^r , pUC19 derivative including the T18 fragment (amino acids 225–399 of <i>B. pertussis</i> CyaA) C-terminal to the multiple cloning site	(27)
pKT25	amp ^r , pSU40 derivative including the T25 fragment (amino acids 1–224 of <i>B. pertussis</i> CyaA) C-terminal to the multiple cloning site	(27)
pKT25B10	kan ^r , pKT25 harboring 1176 bp XbaI/KpnI <i>virB10</i>	(32)
pUT18B6 (1-168)	amp ^r , pUT18 harboring 504 bp XbaI/KpnI <i>virB6</i> fragment from <i>B. suis</i> (encoding 168 amino acids including three predicted transmembrane segments)	(10)

pUT18B6 (1-168) I10A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change I10A	This work
pUT18B6 (1-168) G11A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change G11A	This work
pUT18B6 (1-168) T12A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change T12A	This work
pUT18B6 (1-168) S13A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change S13A	This work
pUT18B6 (1-168) I14A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change I14A	This work
pUT18B6 (1-168) H15A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change H15A	This work
pUT18B6 (1-168) $\Delta(10-15)$	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with deletion of amino acids $\Delta(10-15)$	This work
pUT18B6 (1-168) N16A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change N16A	This work
pUT18B6 (1-168) Q17A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change Q17A	This work
pUT18B6 (1-168) L18A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change L18A	This work
pUT18B6 (1-168) N19A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change N19A	This work
pUT18B6 (1-168) N20A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change N20A	This work
pUT18B6 (1-168) Y21A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change Y21A	This work
pUT18B6 (1-168) $\Delta(16-21)$	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with deletion of amino acids $\Delta(16-21)$	This work
pUT18B6 (1-168) V22A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change V22A	This work
pUT18B6 (1-168) T23A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change T23A	This work
pUT18B6 (1-168) M24A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change M24A	This work
pUT18B6 (1-168) V25A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change V25A	This work
pUT18B6 (1-168) A26A	pUT18B6 (1-168)	This work

pUT18B6 (1-168) S27A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change S27A	This work
pUT18B6 (1-168) $\Delta(22-27)$	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with deletion of amino acids $\Delta(22-27)$	This work
pUT18B6 (1-168) N28A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change N28A	This work
pUT18B6 (1-168) T29A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change T29A	This work
pUT18B6 (1-168) M30A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change M30A	This work
pUT18B6 (1-168) N31A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change N31A	This work
pUT18B6 (1-168) M32A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change M32A	This work
pUT18B6 (1-168) I33A	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with amino acid change I33A	This work
pUT18B6 (1-168) $\Delta(28-33)$	pUT18B6 (1-168) modified to encode VirB6b with deletion of amino acids $\Delta(28-33)$	This work
pTrc200	<i>Str^r</i> , <i>Spc^r</i> , pVS1 derivative, <i>LacI^q</i> , <i>trc</i> promoter expression vector	(26)
pTrc200VirB6a	pTrc200, <i>virB6a</i> PCR fragment cloned downstream of the <i>trc</i> promoter of pTrc200	This work
pTrc200VirB6a L18A	pTrc200VirB6a modified to encode VirB6a with amino acid change L18A	This work
pTrc200VirB6a F20A	pTrc200VirB6a modified to encode VirB6a with amino acid change F20A	This work
pTrc200VirB6a $\Delta(18-23)$	pTrc200VirB6a modified to encode VirB6a with deletion of amino acids $\Delta(18-23)$	This work
pTrc200VirB6a $\Delta(30-35)$	pTrc200VirB6a modified to encode VirB6a with deletion of amino acids $\Delta(30-35)$	This work
pTrc200VirB6a sfGFP	pTrc200, <i>virB6a</i> with <i>sfGFP</i> in C-terminal, PCR fragment cloned downstream of the <i>trc</i> promoter	This work
pTrc200VirB6a L18A sfGFP	pTrc200VirB6a sfGFP modified to encode VirB6a with amino acid change L18A	This work
pTrc200VirB6a F20A sfGFP	pTrc200VirB6a sfGFP modified to encode VirB6a with amino acid change F20A	This work

pTrc200VirB6aΔ(18-23) sfGFP	pTrc200VirB6a sfGFP modified to encode VirB6a with deletion of amino acids Δ(18-23)	This work
pTrc200VirB6aΔ(30-35) sfGFP	pTrc200VirB6a sfGFP modified to encode VirB6a with deletion of amino acids Δ(30-35)	This work
pTrc200TraD	pTrc200, <i>traD</i> PCR fragment cloned downstream of the <i>trc</i> promoter	This work
pTrc200TraD I17A	pTrc200TraD modified to encode traD with amino acid change I17A	This work
pTrc200TraD V21A	pTrc200TraD modified to encode traD with amino acid change V21A	This work
pTrc200TaDΔ(15-20)	pTrc200TraD modified to encode traD with deletion amino acids Δ(15-20)	This work
pTrc200TraDΔ(27-32)	pTrc200TraD modified to encode traD with deletion amino acids Δ(27-32)	This work
pKM101	Amp ^r , <i>mucA</i> , <i>mucB</i> , TraI-TraIII region for DNA processing, DNA transfer, and entry exclusion	(33)
pKM101 <i>traD</i>	Amp ^r , Km ^r , pKM101 <i>traD</i> 1141::Tn5	(34)

Chapitre IV – Données supplémentaires

IV.1 – Introduction

Lors de ce doctorat, en parallèle des études *in vivo*, nous voulions également étudier l'interaction VirB6/VirB10 cette fois-ci *in vitro*. Pour cela nous devons être capable d'exprimer et purifier les protéines d'intérêt. Nous étions déjà en mesure d'exprimer et purifier la partie périplasmique de VirB10, l'intérêt premier était donc de pouvoir exprimer et purifier VirB6. Comme nous l'avons indiqué précédemment, VirB6 possède 5 ou 7 domaines transmembranaires selon les espèces et les différentes études *in silico*. Ces domaines révèlent ainsi un défi pour l'étude de VirB6 *in vitro*, celle-ci n'ayant donc jamais été exprimée et purifiée.

Nous avons réalisé plusieurs essais d'expression et de purification afin de pouvoir caractériser la structure de VirB6 et étudier ses interactions *in vitro*. Suite à de nombreuses optimisations (utilisation de différents plasmides d'expression, de souches bactériennes ou de conditions d'expressions) nous avons purifié VirB6 de *B. suis* (VirB6b) ainsi que son homologue TraD, donnant alors de premières données prometteuses pour de futures études structurales.

Suite à ces premières données, nous avons également réalisé des expériences de co-expression et de co-purification de TraD avec TraE (homologue de VirB8 du pKM101). Nous avons ainsi montré que ces deux protéines interagissaient *in vitro*. Mes données sur la purification de TraD ainsi que l'interaction de TraD/TraE ont ajouté des informations complémentaires importantes pour un manuscrit, récemment soumis à *PNAS* (Casu B., **Mary C.**, Sverzhinsky A., Fouillen A., Nanci A., and Baron C. (2018) The VirB8 homolog TraE from plasmid pKM101 forms a hexameric ring structure and interacts with the VirB6 homolog TraD)

Annexe I.

Dans ce quatrième chapitre nous présenterons donc les données sur l'expression et la purification ayant permis l'obtention d'informations sur VirB6b, celle-ci étant encourageantes pour la suite des études *in vitro*.

IV.2 – Résultats et discussion

IV.2.1 – Expression, purification et caractérisation de VirB6b grâce aux détergents

Dans un premier temps, nous avons déterminé les meilleures conditions d'expression de VirB6b. Ainsi, suite à plusieurs optimisations comme l'essai de différents plasmides d'expression (pWARF, pHT, SIMPLEx), de bactéries (C53, HTL54, BL21star(λ DE3)), de températures (18, 25, 30, 37°C) ou même de milieu (LB, auto induction), nous avons identifié les conditions d'expression donnant le meilleur rendement et un minimum de dégradation.

Suite à cela nous avons optimisé les conditions de purification en testant notamment différents détergents (CHAPS, DM, DDM, DMNG, LMNG et OGNG) pour l'extraction des protéines de la membrane et la formation de micelles solubles. La condition optimale pour VirB6b avec étiquette histidine (HisTag-VirB6b) correspond à une auto induction pendant 42h30 à 25°C, suivi d'une extraction avec du DDM puis d'une purification à l'aide d'une colonne HisTraP Ni-chelate et finalement une chromatographie d'exclusion stérique grâce à une colonne Superdex 200. Avec cette protéine purifiée, différentes expériences de base, comme le dichroïsme circulaire, ont pu être réalisées afin d'estimer sa structure secondaire. L'allure de la courbe obtenue par dichroïsme circulaire permet de constater une prédominance d'hélices- α , en concordance avec une protéine membranaire (**Figure IV.1**). Ensuite, les spectres de dichroïsme circulaire ont été analysés avec le serveur « DichroWeb » en utilisant la méthode CDSSTR ainsi que 12 références (206). Ce traitement confirme l'observation précédente puisque nous identifions 54% d'hélices- α , 16% de feuillets- β et 20% de portion désordonnée (**Figure IV.1**).

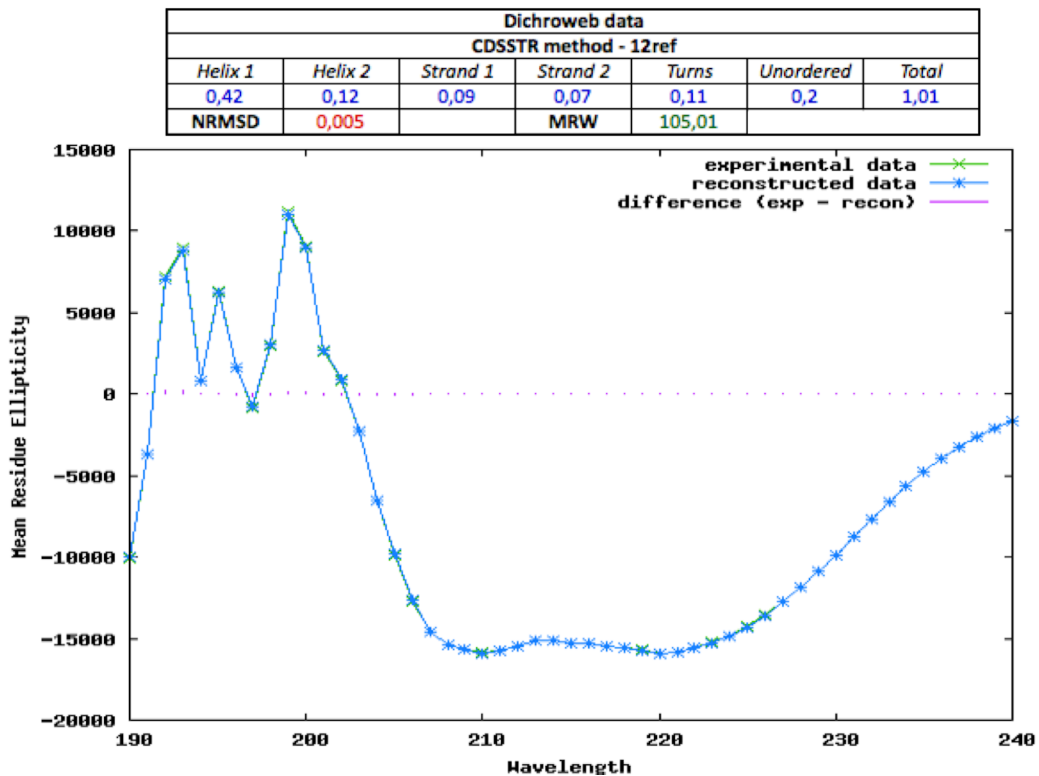


Figure IV.1 : Représentation des données obtenues par dichroïsme circulaire pour HisTag-VirB6b.

La chromatographie d'exclusion stérique ainsi que l'analyse par gel natif nous ont montré une possible association de VirB6b en hexamère (**Figure IV.2.**) La chromatographie d'exclusion stérique a révélé un pic majoritaire à un volume d'élution correspondant à environ 200 kDa (**Figure IV.2A**). Les analyses par gel SDS-PAGE ainsi que par immunobuvardage ont confirmé la présence de VirB6b ainsi que quelques produits de dégradation (**Figure IV.2B**). Le poids moléculaire attendu de VirB6b est de 38,3 kDa, mais nous constatons des signaux à environ 28 kDa. La spectrométrie de masse a confirmé l'identité de la protéine entière et cette observation est en accord avec les analyses de VirB6 de *A. tumefaciens* montrant que VirB6 migrerait avec une masse moléculaire plus basse qu'attendue, chose assez fréquente pour des protéines transmembranaires (deuxième article de cette thèse soumis à *JBC* et (155)). L'analyse du gel natif montre une association en complexe d'un peu plus de 200 kDa, confirmant les données obtenues par chromatographie d'exclusion stérique (**Figure IV.2C**).

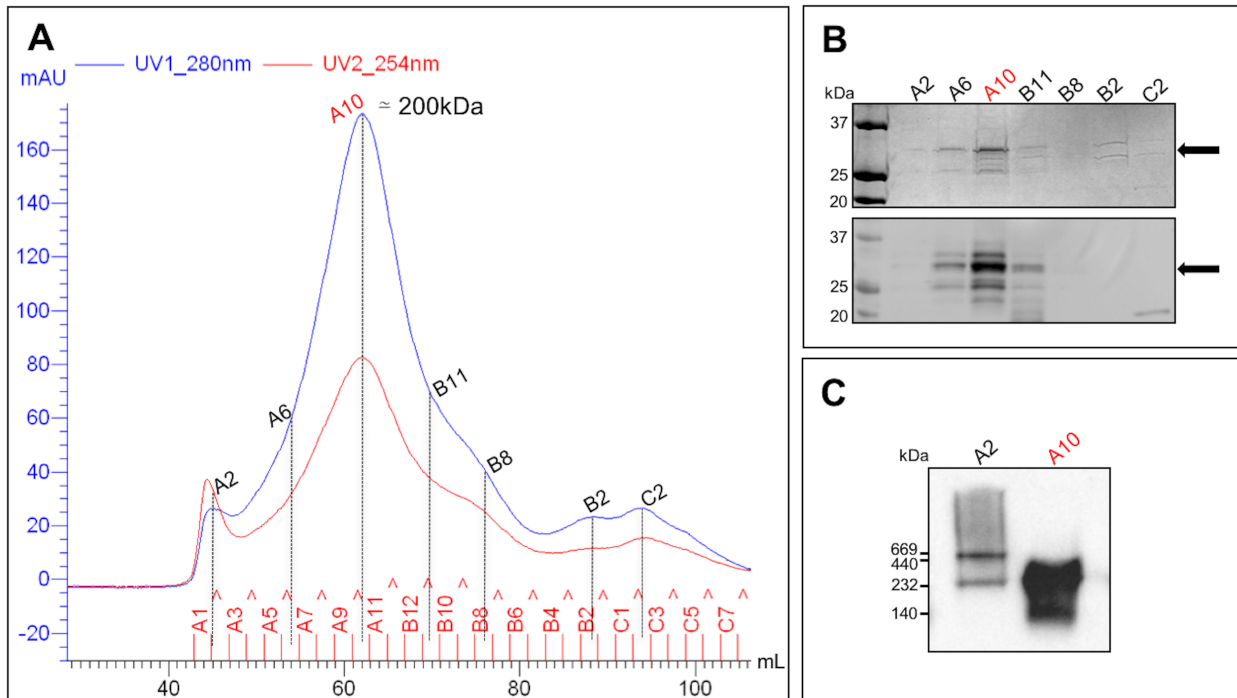


Figure IV.2 : Données biochimiques préliminaires de purification de HisTag-VirB6b.

A. Chromatographie d'exclusion stérique, fraction A10 présentant le pic majoritaire. B. Gel SDS-PAGE (haut) et immunobuvardage (anticorps détectant l'étiquette histidine) (bas) des fractions de la chromatographie d'exclusion stérique. C. Analyse par immunobuvardage (anticorps détectant l'étiquette histidine) après séparation par un gel natif présentant les fractions A2 et A10.

Nous avons réalisé des expériences de « crosslink » montrant également une association de notre protéine en complexe de haut poids moléculaire (**Figure IV.3**). Ainsi nous pouvons constater que l'ajout d'une concentration croissante de DSS cause une formation croissante de complexes de haut poids moléculaire. Finalement, nous observons un complexe aux alentours de 200 kDa puis des produits à plus haut poids moléculaire ne rentrant plus dans le gel (**Figure IV.3**).

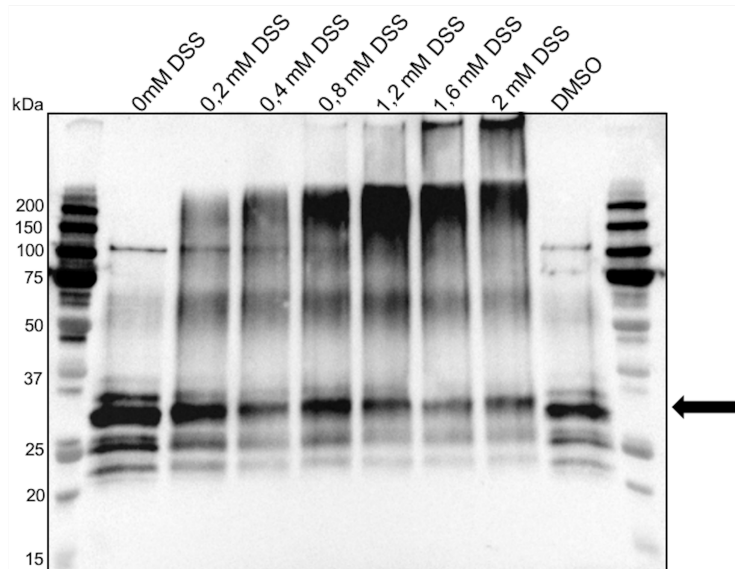


Figure IV.3 : Expérience de « crosslink » avec HisTag-VirB6b

Nous avons montré une association de VirB6b possiblement en hexamère, cependant des analyses plus précises nous permettront de confirmer ceci à l’avenir. L’utilisation notamment du SEC-MALS (« size exclusion chromatography - multi-angle light scattering ») permettra de mesurer la masse moléculaire des complexes et ceci indépendamment de leur taille ou de leur conformation. De plus, l’utilisation du DDM pour différentes études structurales engendre un encombrement pouvant réduire la résolution, comme par exemple les analyses via la microscopie électronique. Pour cette raison, l’échange par d’autres procédés comme les amphipoles ou l’utilisation de lipoparticules d’acide maléique styrène (« styrene maleic acid lipo-particle », SMALP) pourraient faciliter l’analyse des complexes de VirB6b (207-209).

IV.2.2 – Expression, purification et caractérisation de VirB6b grâce au plasmide d’expression SIMPLEx

Considérant que l’utilisation de détergents complique souvent l’analyse de protéines membranaires, nous avons également travaillé avec un plasmide d’expression (SIMPLEx) permettant l’obtention d’une protéine de fusion soluble (210). Ce plasmide nous permet d’obtenir une protéine de fusion constituée d’une MBP (« maltose-binding protein »), de notre protéine d’intérêt, puis d’une ApoAI (« apolipoprotein A-I »), le tout donnant alors une

protéine de fusion MBP-VirB6b-ApoAI-HisTag (**Figure IV.4**). ApoAI est une protéine amphipathique qui possède un degré élevé de flexibilité structurelle lui permettant de s'adapter facilement à une variété de géométries différentes. Dans notre cas nous envisageons qu'elle pourrait s'enrouler autour de VirB6b agissant alors comme un nanodisque. Ce bouclier amphipathique séquestre les protéines membranaires par rapport à l'eau favorisant ainsi leur solubilisation. La MBP a quant à elle été ajoutée afin d'éviter l'insertion de la protéine de fusion dans la membrane interne ; cette protéine très soluble joue le rôle de protéine « leurre » et permet la répartition dans le cytoplasme (210).

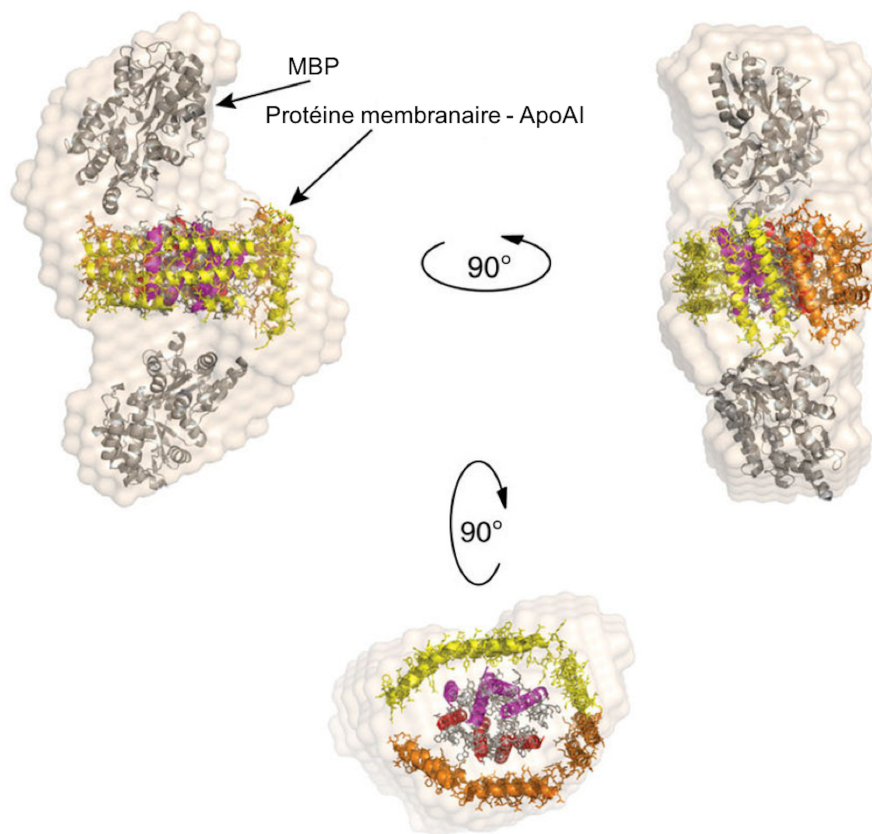


Figure IV.4 : Représentation de l'enveloppe SAXS d'une protéine fusion MBP-protéine membranaire-ApoAI-HisTag.

Les représentations en ruban obtenues en cristallographie ont été placées dans cette enveloppe. Cette figure a été adaptée de Mizrachi *et al*, 2015

Cette approche nous a permis l'obtention d'une protéine de fusion de VirB6b stable et soluble sans détergent, avec des conditions d'expression en milieu LB, à 18°C et induit par l'IPTG pendant 16 heures. Ainsi nous avons effectué une analyse par dichroïsme circulaire, montrant également une prédominance d'hélices- α (**Figure IV.5**). L'analyse des données avec CDSSTR a montré 56% d'hélices- α , 19% de feuillets- β et 24% de portion désordonnée (**Figure IV.5**).

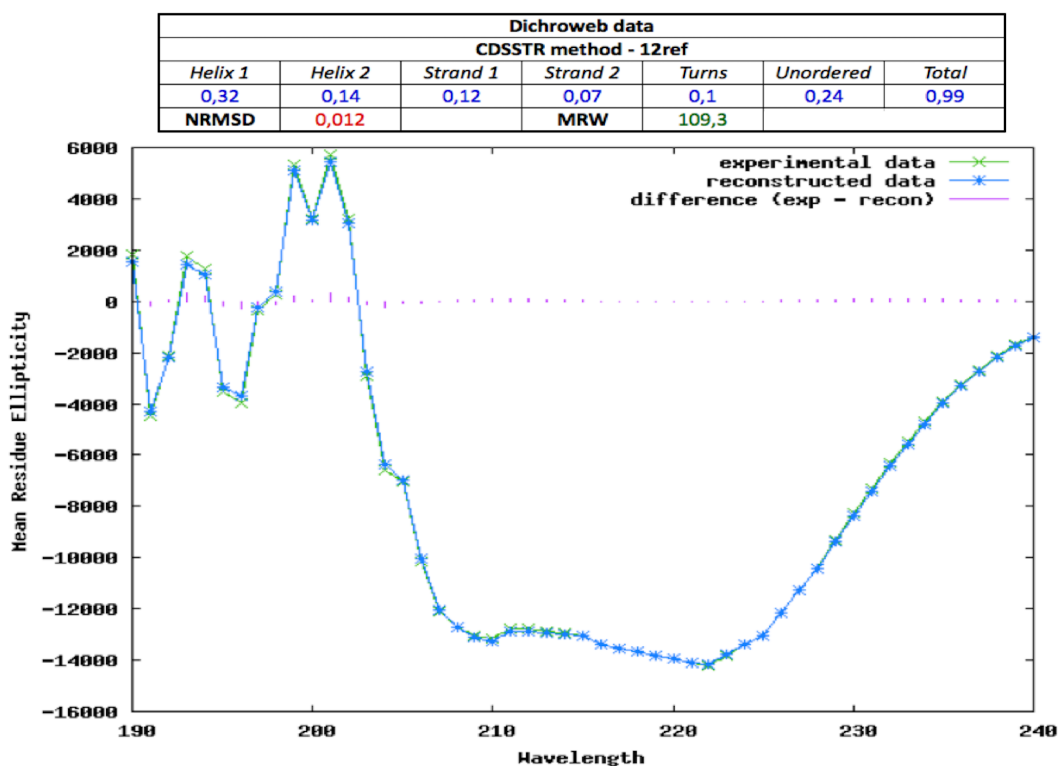


Figure IV.5 : Représentation des données obtenues par dichroïsme circulaire pour MBP-VirB6b-ApoAI-HisTag.

Ensuite, nous avons réalisé la chromatographie d'exclusion stérique ainsi que des gels natifs qui ont également montré une association possible en hexamère (**Figure IV.6**). La chromatographie d'exclusion stérique a été réalisée avec une colonne Superose 6 et nous avons observé deux pics majoritaires ; le premier correspondant probablement à la protéine agrégée hors de la résolution de la colonne et le deuxième ayant un volume d'élution correspondant à environ 600 kDa (**Figure IV.6A**). Les analyses par SDS-PAGE et immunobuvardage ont également confirmé la présence de la protéine de fusion (102 kDa),

nous n'avons pas détecté de produits de dégradation (**Figure IV.6B**) et la spectrométrie de masse a confirmé son identité. Comme dans le cas de HisTag-VirB6b, nous avons observé un poids moléculaire plus bas par rapport à la masse calculée confirmant une migration anormale pendant la séparation via le gel SDS-PAGE. L'analyse sur un gel natif suggère également une association en complexes de haute masse moléculaire, de 600 kDa et plus, confirmant les données obtenues par chromatographie d'exclusion stérique (**Figure IV.6C**).

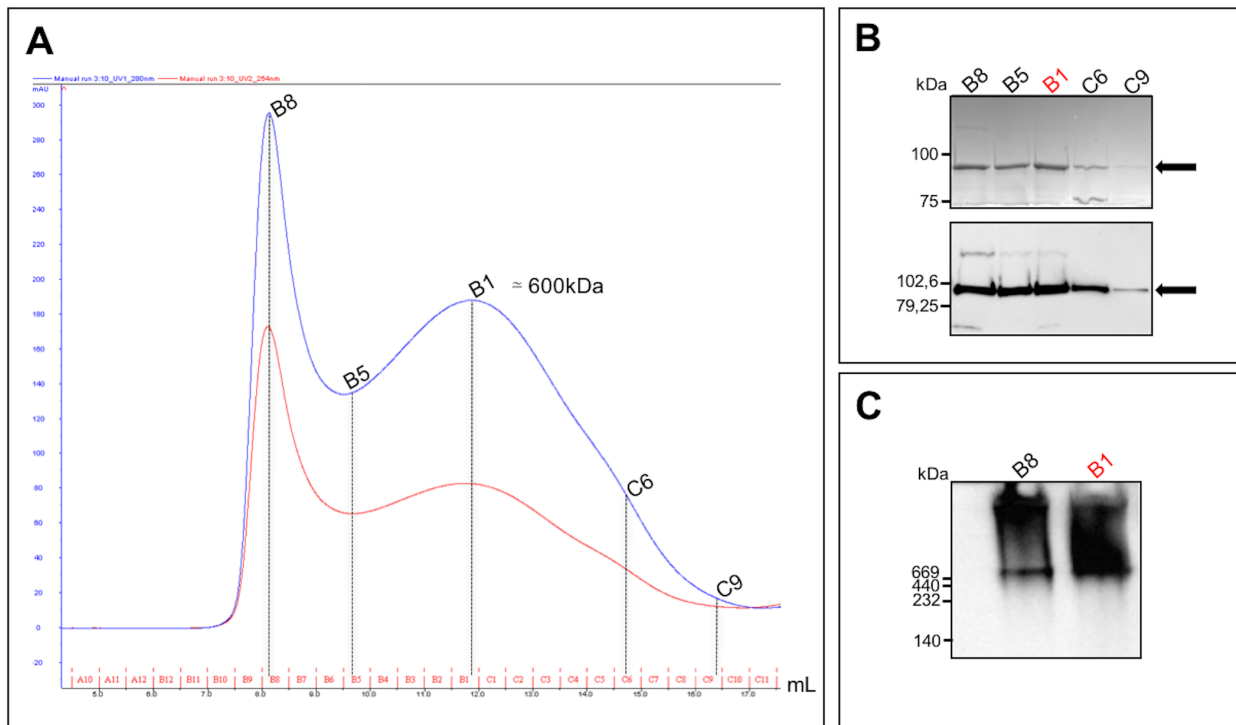


Figure IV.6 : Données biochimiques préliminaires de purification de MBP-VirB6b-ApoAI-HisTag.

A. Chromatographie d'exclusion stérique, B. Gel SDS-PAGE (haut) et immunobuvardage (anticorps détectant l'étiquette histidine) (bas) des fractions de la chromatographie d'exclusion stérique. C. Immunobuvardage (anticorps détectant l'étiquette histidine) après séparation par un gel natif, présentant les fractions B8 et B1.

Nous avons également réalisé des expériences de « crosslink » montrant la aussi que MBP-VirB6b-ApoAI-HisTag forme des complexes de haut poids moléculaire (**Figure IV.7**). Ainsi nous pouvons constater que l'ajout d'une concentration croissante de DSS cause une

formation croissante de complexes de haut poids moléculaire. Finalement, nous observons des complexes à haut poids moléculaire ne rentrant pas dans le gel (**Figure IV.7**).

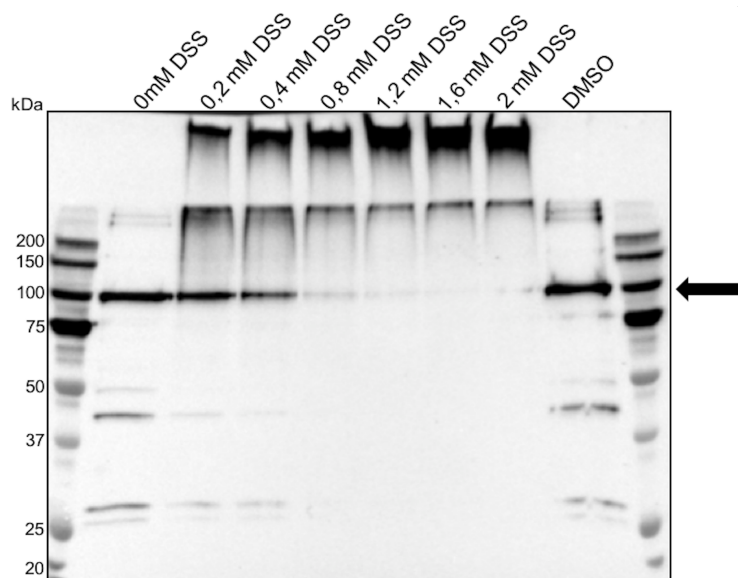


Figure IV.7 : Expérience de « crosslink » avec MBP-VirB6b-ApoAI-HisTag.

Suite à la purification de la protéine de fusion MBP-VirB6b-ApoAI-HisTag nous avons effectué des expériences de microscopie électronique à transmission en coloration négative. Cette analyse a montré différentes populations correspondant à des structures en anneaux ou en bâtonnets, pouvant possiblement représenter des anneaux cassés (**Figure IV.8**). Dans le cas de la fraction qui correspondait à l'agrégation (B8) nous observons une présence d'anneaux plus importante que dans la fraction B1 (600kDa). Dans la fraction B1 nous observons quelques anneaux et des structures qui pourraient correspondre à des anneaux cassés ; la présence de bâtonnets est cependant prédominante.

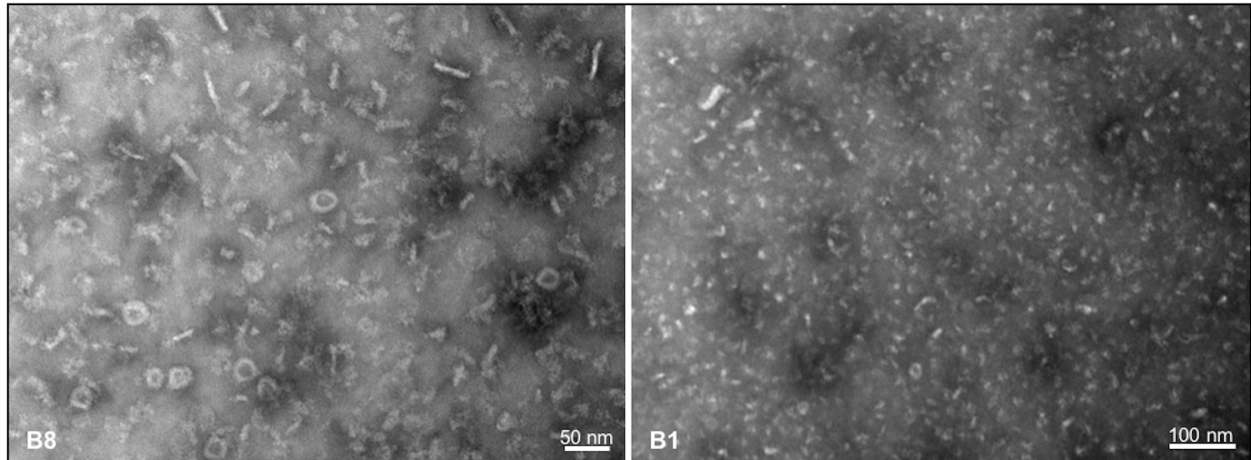


Figure IV.8 : Visualisation de MBP-VirB6b-ApoAI-HisTag en microscopie électronique à transmission en coloration négative.

Ces résultats nous ouvrent de nouvelles possibilités d'analyses utilisant différentes techniques comme la cristallographie, le SAXS ou la microscopie électronique à transmission (coloration négative et cryo-MET). La présence de différentes populations suggère qu'il sera nécessaire d'optimiser d'avantage la stabilité de la protéine pour déterminer si les anneaux ou les bâtonnets représentent le complexe. Il sera également nécessaire d'effectuer des contrôles pour déterminer si les anneaux ou bâtonnets ne sont pas des artefacts engendrés par ApoAI.

IV.3 – Conclusion

Toutes ces données nous donnent un premier aperçu de la structure de VirB6. Ceci ouvrira de nombreux horizons pour l'étude de son interaction avec d'autres protéines VirB. De plus, une fois la structure de VirB6 résolue, ceci pourra permettre de la placer dans le modèle du T4SS obtenu en microscopie électronique et également résoudre le processus d'assemblage des différentes protéines VirB.

IV.4 – Matériels et méthodes

IV.4.1 – Souches et plasmides

La souche d'*Escherichia coli* XL-1 Blue a été utilisée comme hôte pour le clonage et la souche BL21star (λ DE3) pour la surexpression de HisTag-VirB6b et MBP-VirB6b-ApoAI-HisTag. Le clonage du gène de HisTag-VirB6b a été réalisé dans le plasmide pHT (pHTVirB6b) et celui de MBP-VirB6b-ApoAI-HisTag dans le plasmide SIMPLEx (SIMPLExVirB6b) (210,211).

IV.4.2 – Dichroïsme circulaire

Des échantillons de HisTag-VirB6b ont été purifiés et concentrés à 14, 7, 3,5 et 1,75 μ M dans le tampon A (phosphate de sodium 50 mM pH 7,4, NaCl 300 mM, imidazole 40 mM) sans imidazole. Les échantillons de MBP-VirB6b-ApoAI-HisTag ont été purifiés et concentrés à 3, 1,5, 0,75 et 0,375 μ M dans le tampon A sans imidazole. Les mesures de dichroïsme ont été effectuées en utilisant des cuvettes avec un trajet optique de 0,1 cm. Les spectres ont été acquis par le spectropolarimètre Jasco J-810 à une longueur d'onde allant de 180 à 250 nm, en prenant des mesures tous les 0,5 nm avec une bande passante de 1 nm et une vitesse de balayage de 50 nm/min. Chaque spectre représente la moyenne de trois mesures. Tous les spectres ont été corrigés par rapport au signal du tampon. L'analyse des spectres CD pour une estimation de la structure secondaire a été effectuée en utilisant 12 références et la méthode CDSSTR du serveur « DichroWeb ».

IV.4.3 – HisTag-VirB6b et MBP-VirB6b-ApoAI-HisTag expression et purification

pHTVirB6b a été transformé dans la souche BL21star (λ DE3) puis cultivé dans un milieu d'autoinduction 4ZYM-4X LAC- 25 mM succinate pendant 42h30 à 25°C avec 50 μ g/mL de kanamycine (212). Pour la purification les cellules ont été récoltées puis remises en suspension dans le tampon A avec un cocktail d'inhibiteurs de protéase (« cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail » Roche) et DNaseI à 100 μ g/mL. L'échantillon a été lysé deux fois au « One shot cell disrupter » (Constant Systems inc.) à 27 kPsi à 4°C. Les débris ont ensuite été retirés par centrifugation à 13 000 g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant a été récupéré et soumis à

une ultracentrifugation à 250 000 g pendant 1h30 à 4°C. Les membranes ont été récupérées et solubilisées pendant 2 h à 4°C dans du tampon A avec 1% de DDM et le cocktail d'inhibiteurs de protéase. Le tout a été par la suite centrifugé pendant 30 min à 34 500 g pour récupérer le complexe HisTag-VirB6b solubilisé par le DDM et effectuer la purification avec une colonne « HisTrap Ni-chelate » (GE Healthcare). Une fois passée sur la colonne la protéine a été éluée en utilisant un gradient linéaire de 50 mL de 40 à 500 mM d'imidazole. Suite à cette purification, le complexe récupéré a été passé sur une colonne Superdex 200 (GE Healthcare) pour une chromatographie d'exclusion stérique.

SIMPLExVirB6b a été transformé dans la souche BL21star (λ DE3) puis cultivé dans un milieu LB avec 50 μ g/mL de kanamycine. Des précultures ont été utilisées pour inoculer des cultures mises à 37°C pendant 3 h afin qu'elles atteignent une OD de 0,6. Puis l'expression a été induite par l'ajout de 1 mM d'IPTG à 18°C pendant 16h. Pour la purification les cellules ont été récoltées puis remises en suspension dans un tampon A avec le cocktail d'inhibiteurs de protéase et DNaseI à 100 μ g/mL. Le tout a été lysé deux fois au « One shot cell disrupter » (Constant Systems inc.) à 27 kPsi à 4°C. Les débris ont ensuite été retirés par centrifugation à 15 000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant a été récupéré, filtré à 0,45 μ m puis mis sur l'« HisTrap Ni-chelate column » (GE Healthcare). Une fois passée sur la colonne la protéine a été éluée en utilisant un gradient linéaire de 50 mL de 40 à 500 mM d'imidazole. Suite à cette purification le complexe récupéré a été passé sur une colonne Superose 6 (GE Healthcare) permettant une chromatographie d'exclusion stérique.

IV.4.4 – Gels SDS-PAGE, gels natifs et immunobuvardages

Les échantillons de protéines ont été incubés dans du tampon Laemmli pendant 15 min à 37°C suivi d'un gel SDS-PAGE ou d'un gel natif. Le transfert a été réalisé par l'intermédiaire de membrane PVDF (« polyvinylidene fluoride ») et la détection a été effectuée avec des anticorps anti-HisTag (dilution 1/5 000).

IV.4.5 – « Crosslink »

Les protéines HisTag-VirB6b et MBP-VirB6b-ApoAI-HisTag purifiées ont été incubées en présence de DSS dissout dans du DMSO à 0, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 et 2 mM pendant 30 min à température ambiante avec une légère agitation. Le résultat du « crosslink » a été analysé par SDS-PAGE suivi d'un immunobuvardage avec un anticorps anti-HisTag (dilution de 1/5000).

IV.4.6 – Microscopie électronique à transmission

3 μ l des échantillons purifiés ont été déposés pendant 1 min sur une grille de nickel composée d'un film de carbone ayant préalablement subi une décharge lumineuse. Une fois l'excès de liquide absorbé, 3 μ l d'acétate d'uranyl ont été déposés pendant 1 min afin de colorer négativement l'échantillon. La grille a ensuite été visualisée avec un microscope électronique à transmission Tecnai T12 de la compagnie FEI à 120kV et les images ont été acquises par une caméra CCD 2k de la compagnie AMT.

Chapitre V – Discussion

La combinaison d'expériences de biologie moléculaire et structurale a permis de mettre en avant et d'éclaircir l'importance de l'interaction de VirB6 avec VirB10 au niveau fonctionnel. Nos résultats montrent que la fonctionnalité du T4SS qui a un arrangement pourtant complexe, peut être compromise par la perturbation d'une unique interaction. La caractérisation de cette interaction centrale nous ouvrira alors des possibilités quant à la recherche d'inhibiteurs pour traiter des maladies infectieuses causées par des bactéries qui dépendent des T4SSs pour leur virulence.

V.1 – Analyse des interactions et de la structure de VirB6

Tout d'abord, grâce à plusieurs études par le passé il apparaît que chaque partie de VirB6 est essentielle pour la fonctionnalité du T4SS. En effet, sa large boucle périplasmique permettrait l'interaction avec VirB8 et formerait aussi une structure secondaire requise pour l'interaction avec le substrat (156,160). Les parties N- et C-terminales seraient quant à elles nécessaires pour le transfert du substrat à VirB2/VirB9 avec l'aide de VirB10 pour cette étape du transfert (97,156). VirB10 et VirB8 sont reconnues pour interagir et il a récemment été démontré que VirB6 s'associerait avec VirB8 (soumis à *PNAS* et (160)). L'ensemble de ces données, ainsi que le fait que VirB10 possède, tout comme VirB6, un grand domaine périplasmique et une partie N-terminal dans la membrane interne, nous a donc mené à l'hypothèse que VirB6 pourrait interagir avec VirB10.

Cette première hypothèse a ainsi mené à l'investigation de l'interaction entre VirB6 et VirB10. La méthode de « phage display » a été utilisée afin d'obtenir un premier aperçu des potentiels sites d'interaction de VirB6 avec VirB10. Les résultats de l'essai « phage display » ont identifié la présence d'un site d'interaction possible à son N-terminal. La combinaison du BTH et du FRET a confirmé une interaction de VirB10 avec VirB6 via le N-terminal de cette dernière. Ces données ont montré pour la première fois une interaction entre VirB6 et VirB10. Dans cette première publication nous avons également pu localiser dans quel compartiment cellulaire se trouve le C-terminal de VirB6. Pour cela, son C-terminal a été fusionné à une

GFP ou à une glycophorineA-GFP, la glycophorineA servant à traverser la membrane. Puisque cette GFP n'émet de la lumière que dans le cytoplasme, cette étude a montré que VirB6 possède un C-terminal cytoplasmique, ce qui est cohérent avec la littérature (156). VirB6 et ses homologues posséderaient un nombre impair de domaines transmembranaires plaçant alors le N-terminal ainsi que la grande boucle dans l'espace périplasmique, permettant alors une interaction avec les domaines périplasmiques de VirB8 et VirB10.

Les structures des domaines périplasmiques de VirB8 et de VirB10 ayant été résolues par cristallographie, il serait intéressant d'étudier précisément les sites d'interactions de VirB6 sur ces deux protéines. Une fois ceux-ci identifiés, ils pourraient être modélisés dans la structure du T4SS ce qui mènerait à une meilleure compréhension de l'arrangement de ce trio dans le complexe (19). Il serait en particulier pertinent de connaître l'emplacement de VirB6 et de VirB8 au T4SS qui n'est pas encore connu.

Néanmoins, VirB6 étant une protéine transmembranaire il est difficile d'appliquer les méthodes utilisées précédemment, comme le « phage display », puisque celles-ci nécessitent que la protéine soit purifiée, stable et pure. De nouvelles avancées dans sa purification nous permettraient de mieux connaître son arrangement spatial et alors son emplacement potentiel dans l'enveloppe du T4SS₃₋₁₀ obtenue par microscopie électronique à transmission (19).

Ainsi comme nous l'avons décrit au chapitre des données supplémentaires, nous avons fait des avancées importantes quant à l'expression et la purification de VirB6b. La purification de VirB6 nous permettra de caractériser avec plus de précision cette protéine en exploitant par exemple les interactions *in vitro*, grâce notamment à l'utilisation de différentes techniques telles que le titrage calorimétrique isotherme (« isothermal titration calorimetry », ITC), la résonance plasmonique de surface (« surface plasmon resonance », SPR), la thermophorèse à micro-échelle (« microscale thermophoresis », MST) ou encore la co-immunoprécipitation. Bien que nous ayons déjà obtenu des données *in vitro* sur l'interaction VirB6/VirB10 grâce au FRET, celles-ci ne représentent que l'interaction entre un peptide de VirB6 et la partie périplasmique de VirB10. L'obtention de VirB6 entière serait nécessaire pour quantifier et confirmer les interactions préalablement observées dans des conditions plus proches de son

état naturel. Avec VirB6 purifiée nous pourrions exploiter de multiples techniques afin de déterminer à haute résolution son interaction avec VirB10 telles que la cristallographie, le SAXS ou la cryo-microscopie électronique. Également, pour faciliter la caractérisation des interactions, VirB6 et VirB10 pourraient être co-exprimées et co-purifiées. Ceci permettrait une meilleure stabilisation des protéines comme nous l'avons déjà observée dans le cas de l'étude d'autres protéines du T4SS au laboratoire (soumis à *PNAS* (**Annexe I**) et (213)). Enfin, nous pourrions exploiter la purification de VirB6 pour obtenir des données structurales qui seront nécessaires pour la compréhension de l'assemblage du T4SS et pour définir sa place dans ce système à multiples composants.

Cependant, le fait que VirB6 soit transmembranaire rend les analyses plus difficiles nécessitant que sa purification se fasse en présence de détergents qui posent de nombreux problèmes, par exemple lors des caractérisations structurales. Ainsi, des alternatives comme l'expression avec le plasmide SIMPLEx, l'utilisation des amphipoles ou des SMALPs pourraient aider à contourner ces problèmes (207,210). Des optimisations seront encore nécessaires, mais nos données préliminaires sur la purification de VirB6 ouvrent de nombreuses opportunités pour la résolution de sa structure, sa conformation et la détermination de son emplacement dans le T4SS.

De plus, les expériences réalisées pour le manuscrit soumis à *PNAS* (**Annexe I**) ont amené un autre niveau dans la résolution du complexe, VirB8 pouvant désormais être potentiellement placée dans le T4SS. Cette étude a également montré l'interaction de VirB8 avec VirB6 pour la première fois. Ces données pourraient mener à des expériences afin de résoudre la structure du co-complexe de ces deux protéines. Nous pourrions également intégrer VirB10 dans la co-expression et la co-purification avec VirB6/VirB8. Ainsi nous pourrions obtenir un complexe de ces trois composants et l'analyse par microscopie électronique permettrait de les placer par rapport au complexe du T4SS₃₋₁₀.

V.2 – Analyse du rôle fonctionnel des interactions de VirB6

Il est sans aucun doute important de connaître les détails moléculaires de l'interaction, mais il est également nécessaire de comprendre l'importance de l'interaction *in vivo* dans le contexte naturel. Déterminer l'impact fonctionnel nous permettrait de savoir si cette interaction est centrale à la formation du T4SS et si l'on pourra la cibler dans le futur par des inhibiteurs. Le but final étant de trouver un moyen de contrer la dissémination d'informations par les systèmes de sécrétion, l'identification d'un site d'interaction essentiel en ferait une cible de choix pour la recherche d'inhibiteurs. En effet, l'inhibition du T4SS n'affecterait pas directement la bactérie ce qui ne provoquera pas de pression environnementale pouvant entraîner des mutations menant à la résistance. De plus, cela empêchera également le passage de matériel génétique comme les gènes de résistances aux antibiotiques entre les cellules.

Pour cette raison, notre projet principal était d'étudier les effets de changements de l'interaction *in vivo* de VirB6 avec VirB10 sur la fonctionnalité du T4SS, ce qui a donné lieu au deuxième article de cette thèse. Ce travail a mis en relief l'importance de certains résidus du N-terminal de VirB6 pour son interaction avec VirB10 (**Figure V.1**). Les analyses de l'effet des changements suite à cette identification ont montré un impact sur la formation du pilus-T et par conséquent sur la fonctionnalité du T4SS.

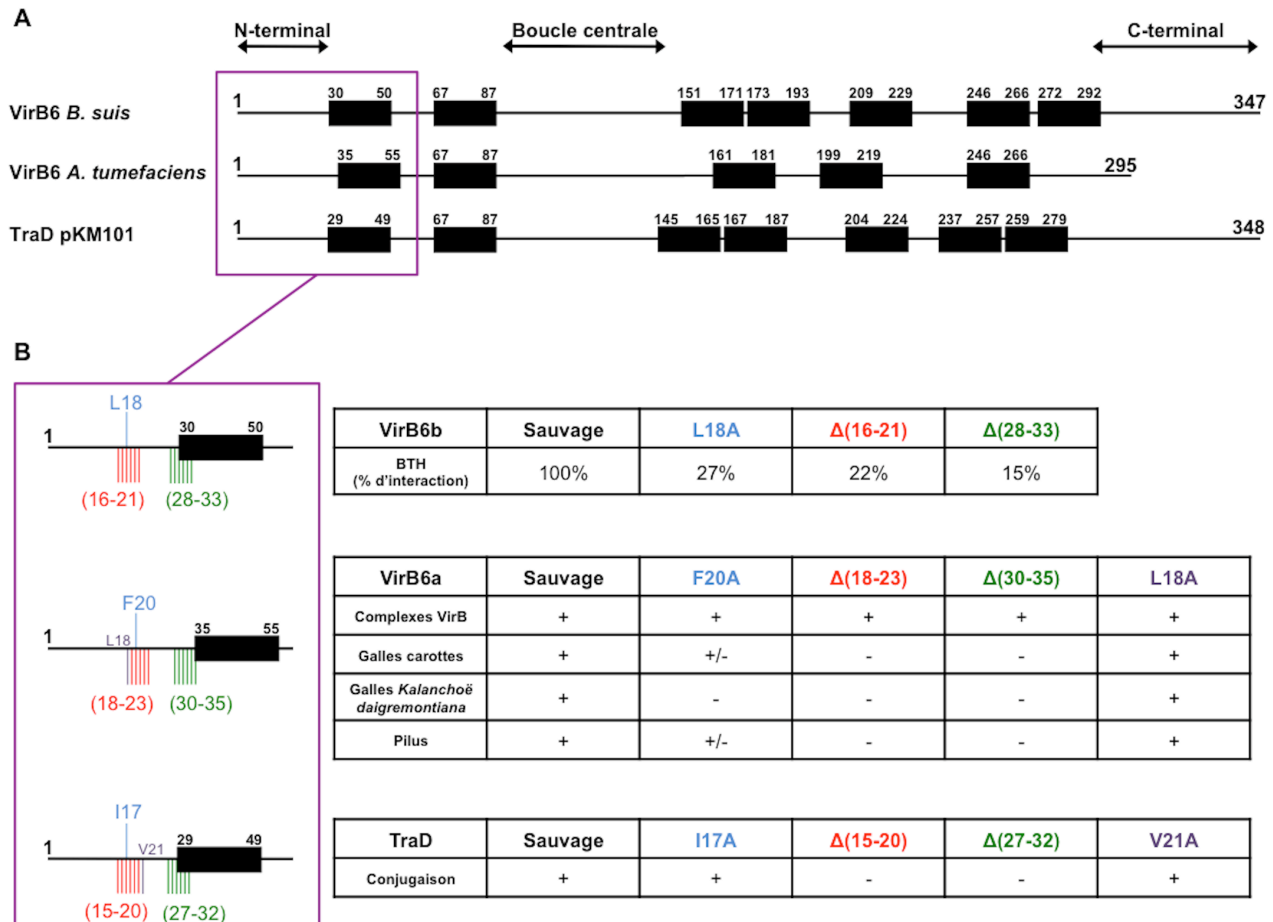


Figure V.1 : Figure récapitulative des résultats obtenus pour le deuxième article scientifique.

A) Représentation schématique des segments transmembranaires prédits en utilisant le serveur web TOPCONS (214). Les différents domaines transmembranaires sont représentés par des rectangles noirs avec les numéros de résidus. B) Résumé de l'effet des différents variants étudiés lors du second article de cette thèse. En bleu le résidu d'intérêt, en rouge ou en vert les délétions de six résidus et en violet le résidu contrôle, identifiés dans les différents organismes.

Le changement de l'acide aminé clé pour l'interaction, identifié lors du BTH, par une alanine (VirB6bL18A, VirB6aF20A et TraDI17A) n'a pas eu un impact drastique sur la fonctionnalité du T4SS (**Figure V.1**). Suite à l'infection avec la souche complémentée avec VirB6F20A nous avons constaté la présence de galles sur les carottes, mais les feuilles de *Kalanchoë daigremontiana* (moins sensibles) ne présentaient pas de galles et les protéines du pilus

(VirB2 et VirB5) étaient moins présentes que dans les échantillons de la souche sauvage. En plus de cet effet *in vivo*, nous avons pu observer que le changement d'un résidu contrôle proche de celui identifié ne provoquait aucune différence comparée à la protéine sauvage (**Figure V.1**). Tout ceci révélerait que F20 pourrait être impliqué de manière partielle, ces résultats étant supportés par les données BTH montrant une diminution de l'interaction moins importante que pour les variants avec les délétions (**Figure V.1**).

Il serait aussi intéressant de caractériser le site d'interaction sur VirB10 afin de savoir quels résidus pourraient accueillir le résidu identifié de VirB6. Ce résidu, correspondant à une leucine, une phénylalanine ou une isoleucine (selon l'organisme), est hydrophobe et va être généralement retrouvé à l'intérieur de la protéine. Ainsi nous pourrions nous attendre à ce que ce résidu soit retrouvé dans une poche hydrophobe présente dans VirB10. L'alanine est un résidu également hydrophobe mais en une beaucoup moindre mesure que les résidus sauvages, ainsi leurs remplacements par cette dernière pourraient réduire l'interaction d'une façon graduelle. La chaîne latérale de l'alanine est également plus courte que celle des résidus dans les protéines sauvages, ainsi certaines liaisons permettant le maintien de l'interaction pourraient être absentes. Dans le cas des variants raccourcis de six acides aminés, l'absence de plusieurs résidus du site d'interaction pourrait complètement abolir l'interaction de VirB6 avec VirB10. Ceci pourrait expliquer la différence observée entre la complémentation avec des variantes dans lesquels un seul acide aminé a été changé par rapport aux délétions de six acides aminés.

En effet, dans le cas de souches de *virB6/traD* délétés et les complémentations avec les variants raccourcis de six acides aminés de VirB6/TraD, nous n'avons pas détecté de conjugaison, de galles ou de pili (**Figure V.1**). Nous savons que dans la souche de délétion de *virB6* (CB1006) il y a une forte diminution de VirB5, une absence du pilus-T et de galles (deuxième article de cette thèse soumis à *JBC* et (186)). L'analyse des complémentations avec les protéines sans les six acides aminés montre un phénotype similaire à celui de la souche CB1006, mais l'accumulation des autres protéines VirB incluant VirB5 ainsi que la formation des complexes ne sont pas affectées (**Figure III.3 et Figure III.6**).

De plus, comme observé à la fois par microscopie à fluorescence et électronique, tous les variants de VirB6 sont exprimés dans les cellules. L'imagerie par fluorescence à super résolution nous a en plus permis de confirmer la localisation de la protéine sauvage et de ses variants préférentiellement sur un pôle de la cellule. Ces résultats ont confirmé que l'effet fonctionnel est dû à un effet sur la fonction de la protéine. Ceci nous a alors mené à la conclusion que l'absence de pilus-T est directement liée à l'absence d'interaction entre VirB6 et VirB10. Lors de précédentes études, il avait été montré que la délétion de résidus présents sur le N-terminal de VirB6 ($\Delta 1-30$, $\Delta 30-60$) abolissait le transfert du substrat à VirB2 et VirB9 et que la délétion de *virb10* bloquait également le transfert de VirB6/VirB8 à VirB2/VirB9, VirB10 n'interagissant pourtant pas avec le substrat (97,156,177). Ces résultats sont alors en concordance avec les nôtres ; dans les deux cas si l'interaction entre VirB6 et VirB10 n'est plus présente, VirB2 ne peut plus être recrutée.

Le trio VirB6/VirB8/VirB10 étant important dans le T4SS, il pourrait être intéressant de réaliser des expériences similaires à celles utilisées lors de ce doctorat sur la boucle périplasmique de VirB6. Cette boucle interagissant avec VirB8, nous pourrions déterminer les effets *in vivo* sur la complémentation, et voir si ceux-ci seraient similaires à ceux observés grâce à nos données ou si nous aurions d'autres phénotypes (160). En effet, si VirB6 passe le substrat à VirB8, il se pourrait alors que si l'on bloquait l'interaction, nous observions toujours la formation d'un pilus et que seul la formation de galles pourrait être affectée.

V.3 – Modèle d'assemblage des différents complexes du T4SS

Nos résultats ainsi que différentes hypothèses amenées par la littérature nous ont mené à l'élaboration d'un modèle d'assemblage du T4SS (**Figure III.9**). Grâce à nos données d'extraction de complexes avec un détergent nous n'avons observé aucun changement dans les sous-unités fonctionnelles séparées, selon VirB6 sauvage ou ses variants (**Figure III.6**). Ainsi, même si le T4SS n'est pas fonctionnel, l'assemblage de ces complexes a déjà eu lieu, notamment celui de VirB2/VirB5. VirB6 et VirB10 sont présentes dans deux complexes différents, d'environ 200 kDa et 500 kDa respectivement, que ce soit dans le cas des variants ou les contrôles positifs (souche sauvage et complémentation avec VirB6a sauvage) suggérant

l'assemblage d'un complexe « core » et l'assemblage d'un complexe de la membrane interne (deuxième article de cette thèse soumis à *JBC* et (186)). Pour les contrôles positifs, nous savons que le T4SS est normalement complet et fonctionnel permettant donc de supposer que ces complexes peuvent correspondre (a) soit à des complexes séparés qui mènent à un T4SS complet, (b) soit à un T4SS complet qui va être séparé lors de l'extraction par les détergents qui vont briser les interactions les plus fragiles, (c) soit les deux. Des interactions fragiles peuvent également refléter un assemblage séquentiel, avec des complexes très résistants préalablement assemblés qui vont s'associer à d'autres de manière plus transitoire. Peu importe l'étape d'assemblage, nous pouvons spéculer que dans le cas de complémentation avec nos variants les différents complexes sont toujours présents et stables, mais que le T4SS n'est pas fonctionnel du fait que l'interaction VirB6/VirB10 serait un point central pour le recrutement de VirB2/VirB5 et donc une étape importante de l'assemblage.

D'après notre modèle final (**Figure III.9**) nous supposons également que le complexe VirB4/VirB11 donne l'information d'assemblage au complexe de VirB6 en même temps qu'au complexe de VirB10, permettant alors le changement conformationnel de cette dernière. En effet, suite à l'activation de la transcription des gènes *vir* toutes les protéines VirB vont aller se localiser au pôle (seules ou recrutées par d'autres protéines) pour assembler le T4SS et ainsi permettre l'accueil du substrat (167). Ainsi, une fois les différents complexes associés, le complexe VirB4/VirB11 pourrait être à l'origine de la transmission de l'information menant à la formation du T4SS et du pilus. Plusieurs études ont démontré que ces protéines interviennent directement et indirectement dans la formation du pilus. En effet, elles agissent directement en permettant l'extraction des pilines de la membrane interne (129). Mais elles vont également agir indirectement puisqu'une délétion de *virB4* mène à l'absence de pili bien que VirB2 et VirB5 soient toujours présentes (128). Des changements dans VirB11 (comme la délétion de *virB11* ou des mutations spécifiques dans *virB11*) mènent également à une absence de pilus et ceci pourrait être dû à la perturbation d'interactions avec d'autres protéines VirB nécessaires à la biogenèse du pilus (115,131). Aussi, VirD4 et VirB11 permettent le transfert du substrat à VirB6/VirB8, et plus précisément à VirB6 qui le recevrait en premier, tout ceci nécessitant la présence de VirB4 (97,156). Le changement conformationnel de VirB10 est coordonné par VirD4 et VirB11 et enfin VirB10 interagit en plus avec VirB4 (139,150).

Toutes ces données montrent l'importance de VirB4/VirB11 pour VirB6 et VirB10. D'autres études sur la relation, voire l'interaction, de VirB4 ou VirB11 avec VirB6 pourraient également donner des informations sur le recrutement des protéines pour la formation du T4SS. Ceci aiderait en plus à placer VirB6 dans le complexe si nous pouvions observer une interaction avec VirB4 et étudier celle-ci *in vitro*. Une délétion dans le C-terminal ($\Delta 261-290$) de VirB6 abolit le transfert du substrat vers VirB2/VirB9, ainsi VirB4 pourrait agir à ce niveau et aider à la stabilisation de l'interaction VirB6/VirB10 (156).

VirB4 interagit en plus avec VirB8 et la stabilise. VirB8 fait partie de la membrane interne et interagit avec VirB6 et VirB10. Nous pouvons supposer que VirB8 et VirB10 pourraient former un site d'amarrage pour VirB6, possiblement déjà en complexe avec d'autres protéines VirB (comme VirB3 ou VirB5). L'ensemble pourrait alors être stabilisé par VirB4, qui est associée avec le complexe « core » (17,19,128). Des études sur VirB4, identifiant des sites d'interactions avec VirB8 et potentiellement VirB6, *in vivo* nous permettraient également de constater l'effet stabilisateur de VirB4 sur le reste du complexe.

Concernant VirB11, par son interaction avec VirB4 il a été proposé qu'elle induirait la production du pilus et par son interaction avec VirD4 qu'elle permettrait l'engagement du substrat. Tout ceci en fait une protéine de grande importance qui n'a cependant pas encore été placée dans l'enveloppe obtenue pour le T4SS₃₋₁₀ en microscopie électronique à transmission (19). Selon les auteurs de cet article les hexamères de VirB4 pourraient recruter VirD4 ou VirB11 ou être remplacés par celles-ci (19). VirD4 a par ailleurs été placée par la suite entre les hexamères de VirB4 (189). VirB11 est pourtant nécessaire pour les deux étapes principales du T4SS, c'est à dire la formation du pilus et le transfert du substrat. En effet, VirB11 assiste VirB4 lors de l'extraction des pilines de la membrane, la formation du pilus et elle est nécessaire pour le transfert du substrat. Il est alors difficile d'imaginer que VirB11 remplacerait VirB4, les deux étant nécessaires pour la formation du pilus et au transfert du substrat. Que VirB4 recrute VirB11 est plus probable, puisque leur interaction aiderait la formation du pilus et par le même temps le recrutement des complexes VirB6 et VirB10. Suite à l'arrivée de VirD4, VirB11 interagirait cette fois-ci avec elle pour permettre le passage du substrat à VirB6/VirB8.

Bien qu'il y ait une multitude de littérature sur les systèmes de sécrétion, il reste de nombreuses zones d'ombre et d'autres travaux seront nécessaires pour comprendre la complexité de ces systèmes. Les exemples, parmi d'autres, de VirB6, VirB8 et VirB11 nous montrent les directions à prendre dans le futur pour déterminer avec précision la mécanique d'assemblage et le fonctionnement du T4SS.

Chapitre VI – Conclusion

La résistance aux antibiotiques est un problème de santé mondial qui peut entraîner des maladies graves pouvant mener à la mort dans certains cas. Notre travail montre pour la première fois que l'interaction VirB6-VirB10 est cruciale pour la formation du pilus-T et pour le transfert de substrat. L'identification d'un tel site d'interaction pourra être utilisé comme une nouvelle cible dans la conception de médicaments pour combattre des bactéries qui utilisent des T4SSs pour propager leur virulence et échanger des informations codant par exemple pour la résistance contre les antibiotiques.

De plus, les protéines membranaires font partie d'une large variété de familles et permettent de réguler plusieurs transports cellulaires et l'échange de signaux entre cellules, elles sont donc centrales pour une multitude de processus. Ainsi leur rôle dans toutes ces diverses fonctions contribue au fait qu'elles comprennent plus de la moitié des cibles « druggable ». Mais malgré leur importance, les connaissances au sujet de la structure de ces protéines est moindre par rapport aux protéines solubles et ceci est dû à plusieurs facteurs, comme la difficulté de leur expression pouvant être provoquée par la toxicité cellulaire, l'encombrement des membranes et le repliement particulier de ces protéines.

Pour toutes ces raisons, VirB6 est une protéine centrale et fait partie des protéines dont les connaissances approfondies permettront des avancées en recherche d'inhibiteurs et en recherche sur les protéines membranaires.

Bibliographie

1. Prestinaci, F., Pezzotti, P., and Pantosti, A. (2015) Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health* **109**, 309-318
2. Zaman, S. B., Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., and Hossain, N. (2017) A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus* **9**, e1403
3. National Institutes of Health (US); Biological Sciences Curriculum Study. Bethesda (MD). (2007) Understanding Emerging and Re-emerging Infectious Diseases.
4. WHO. (2017) Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report - Early implementation 2016-2017.
5. Lee, C. R., Cho, I. H., Jeong, B. C., and Lee, S. H. (2013) Strategies to Minimize Antibiotic Resistance. *Int J Environ Res Public Health* **10**, 4274–4305
6. WHO. (2015) Global action plan on antimicrobial resistance.
7. Green, E. R., and Mecsas, J. (2016) Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol Spectr* **4**
8. Lasica, A. M., Ksiazek, M., Madej, M., and Potempa, J. (2017) The Type IX Secretion System (T9SS): Highlights and Recent Insights into Its Structure and Function. *Front Cell Infect Microbiol* **7**, 215
9. Grohmann, E., Christie, P. J., Waksman, G., and Backert, S. (2017) Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Molecular microbiology*
10. WHO. (2017) Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.
11. Fair, R. J., and Tor, Y. (2014) Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Medicin Chem* **6**, 25-64
12. Epanand, R. M., Walker, C., Epanand, R. F., and Magarvey, N. A. (2016) Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et biophysica acta* **1858**, 980-987
13. Fronzes, R., Christie, P. J., and Waksman, G. (2009) The structural biology of type IV secretion systems. *Nature reviews. Microbiology* **7**, 703-714
14. Trokter, M., Felisberto-Rodrigues, C., Christie, P. J., and Waksman, G. (2014) Recent advances in the structural and molecular biology of type IV secretion systems. *Current opinion in structural biology* **27**, 16-23
15. Christie, P. J., and Vogel, J. P. (2000) Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends in microbiology* **8**, 354-360
16. Voth, D. E., Broderdorf, L. J., and Graham, J. G. (2012) Bacterial Type IV secretion systems: versatile virulence machines. *Future microbiology* **7**, 241-257
17. Christie, P. J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S. J., and Cascales, E. (2005) Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol.* **59**, 451-485
18. Zhang, W., Rong, C., Chen, C., and Gao, G. F. (2012) Type-IVC secretion system: a novel subclass of type IV secretion system (T4SS) common existing in gram-positive genus *Streptococcus*. *PloS one* **7**, e46390

19. Low, H. H., Gubellini, F., Rivera-Calzada, A., Braun, N., Connery, S., Dujancourt, A., Lu, F., Redzej, A., Fronzes, R., Orlova, E. V., and Waksman, G. (2014) Structure of a type IV secretion system. *Nature* **508**, 550-553
20. Ghosal, D., Chang, Y. W., Jeong, K. C., Vogel, J. P., and Jensen, G. J. (2017) *In situ* structure of the *Legionella* Dot/Icm type IV secretion system by electron cryotomography. *EMBO Rep* **18**, 726-732
21. Christie, P. J., and Gordon, J. E. (2014) The *Agrobacterium* Ti Plasmids. *Microbiol Spectr.* **2**
22. Vigouroux, A., El Sahili, A., Lang, J., Aumont-Nicaise, M., Dessaux, Y., Faure, D., and Morera, S. (2017) Structural basis for high specificity of octopine binding in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. *Sci Rep* **7**, 18033
23. Gohlke, J., and Deeken, R. (2014) Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development. *Front Plant Sci* **5**, 155
24. Ilangovan, A., Connery, S., and Waksman, G. (2015) Structural biology of the Gram-negative bacterial conjugation systems. *Trends in microbiology* **23**, 301-310
25. Chandran Darbari, V., and Waksman, G. (2015) Structural Biology of Bacterial Type IV Secretion Systems. *Annu Rev Biochem* **84**, 603-629
26. Christie, P. J. (2004) Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochimica et biophysica acta* **1694**, 219-234
27. Gao, R., and Lynn, D. G. (2007) Integration of rotation and piston motions in coiled-coil signal transduction. *Journal of bacteriology* **189**, 6048-6056
28. Zhu, J., Oger, P. M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P. J., Farrand, S. K., and Winans, S. C. (2000) The Bases of Crown Gall Tumorigenesis. *Journal of bacteriology* **182**, 3885-3895
29. Nagai, H., and Kubori, T. (2011) Type IVB Secretion Systems of *Legionella* and Other Gram-Negative Bacteria. *Frontiers in microbiology* **2**, 136
30. Hubber, A., and Roy, C. R. (2010) Modulation of host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**, 261-283
31. Isaac, D. T., and Isberg, R. (2014) Master manipulators: an update on *Legionella pneumophila* Icm/Dot translocated substrates and their host targets. *Future microbiology* **9**, 343-359
32. Juhas, M., Crook, D. W., Dimopoulou, I. D., Lunter, G., Harding, R. M., Ferguson, D. J., and Hood, D. W. (2007) Novel type IV secretion system involved in propagation of genomic islands. *Journal of bacteriology* **189**, 761-771
33. Juhas, M., Crook, D. W., and Hood, D. W. (2008) Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cellular microbiology* **10**, 2377-2386
34. Juhas, M. (2015) Type IV secretion systems and genomic islands-mediated horizontal gene transfer in *Pseudomonas* and *Haemophilus*. *Microbiol Res* **170**, 10-17
35. Bhatti, M., Laverde Gomez, J. A., and Christie, P. J. (2013) The Expanding Bacterial Type IV Secretion Lexicon. *Res Microbiol* **164**, 620-639
36. Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B., and Guédon, G. (2002) Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Molecular microbiology* **46**, 601-610
37. Alvarez-Martinez, C. E., and Christie, P. J. (2009) Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **73**, 775-808

38. Smillie, C., Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P., and de la Cruz, F. (2010) Mobility of plasmids. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **74**, 434-452
39. Burrus, V., and Waldor, M. K. (2004) Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res Microbiol* **155**, 376-386
40. Seth-Smith, H., and Croucher, N. J. (2009) Genome watch: breaking the ICE. *Nature reviews. Microbiology* **7**, 328-329
41. Sakalis, P. A., van Heusden, G. P., and Hooykaas, P. J. (2014) Visualization of VirE2 protein translocation by the *Agrobacterium* type IV secretion system into host cells. *Microbiologyopen* **3**, 104-117
42. Atmakuri, K., Ding, Z., and Christie, P. J. (2003) VirE2, a type IV secretion substrate, interacts with the VirD4 transfer protein at cell poles of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular microbiology* **49**, 1699-1713
43. Jurik, A., Hausser, E., Kutter, S., Pattis, I., Prassl, S., Weiss, E., and Fischer, W. (2010) The coupling protein Cagbeta and its interaction partner CagZ are required for type IV secretion of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Infection and immunity* **78**, 5244-5251
44. Lavigne, J. P., Botella, E., and O'Callaghan, D. (2006) Type IV secretion system and their effectors: an update. *Pathologie-biologie* **54**, 296-303
45. Cascales, E., and Christie, P. J. (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nature reviews. Microbiology* **1**, 137-149
46. Fernandez-Gonzalez, E., and Backert, S. (2014) DNA transfer in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol* **49**, 594-604
47. Gold, V. A., Salzer, R., Averhoff, B., and Kuhlbrandt, W. (2015) Structure of a type IV pilus machinery in the open and closed state. *Elife* **4**
48. Novick, R. P. (1987) Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev* **51**, 381-395
49. Lawley, T. D., Klimke, W. A., Gubbins, M. J., and Frost, L. S. (2003) F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS microbiology letters* **224**, 1-15
50. Wang, Y. A., Yu, X., Silverman, P. M., Harris, R. L., and Egelman, E. H. (2009) The structure of F-pili. *Journal of molecular biology* **385**, 22-29
51. Silverman, P. M. (1997) Towards a structural biology of bacterial conjugation. *Molecular microbiology* **23**, 423-429
52. Christie, P. J. (2001) Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Molecular microbiology* **40**, 294-305
53. Frost, L. S., Ippen-Ihler, K., and Skurray, R. A. (1994) Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiol Rev* **58**, 162-210
54. Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lai, E. M., Lurz, R., Kado, C. I., and Lanka, E. (1999) Conjugative pili of IncP plasmids, and the Ti plasmid T pilus are composed of cyclic subunits. *The Journal of biological chemistry* **274**, 22548-22555
55. Barton, I. S., Fuqua, C., and Platt, T. G. (2018) Ecological and evolutionary dynamics of a model facultative pathogen: *Agrobacterium* and crown gall disease of plants. *Environ Microbiol* **20**, 16-29
56. Hwang, H. H., Gelvin, S. B., and Lai, E. M. (2015) Editorial: "Agrobacterium biology and its application to transgenic plant production". *Front Plant Sci* **6**, 265
57. Nester, E. W. (2014) *Agrobacterium*: nature's genetic engineer. *Front Plant Sci* **5**, 730

58. Shaw, C. H. (1991) Swimming against the tide: chemotaxis in *Agrobacterium*. *Bioessays* **13**, 25-29
59. Hawes, M. C., and Smith, L. Y. (1989) Requirement for chemotaxis in pathogenicity of *Agrobacterium tumefaciens* on roots of soil-grown pea plants. *Journal of bacteriology* **171**, 5668-5671
60. Chesnokova, O., Coutinho, J. B., Khan, I. H., Mikhail, M. S., and Kado, C. I. (1997) Characterization of flagella genes of *Agrobacterium tumefaciens*, and the effect of a bald strain on virulence. *Molecular microbiology* **23**, 579-590
61. Guo, M., Huang, Z., and Yang, J. (2017) Is there any crosstalk between the chemotaxis and virulence induction signaling in *Agrobacterium tumefaciens*? *Biotechnol Adv* **35**, 505-511
62. McCullen, C. A., and Binns, A. N. (2006) *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 101-127
63. Gao, R., and Lynn, D. G. (2005) Environmental pH sensing: resolving the VirA/VirG two-component system inputs for *Agrobacterium* pathogenesis. *Journal of bacteriology* **187**, 2182-2189
64. Cangelosi, G. A., Ankenbauer, R. G., and Nester, E. W. (1990) Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 6708-6712
65. Lee, Y. W., Jin, S., Sim, W. S., and Nester, E. W. (1996) The sensing of plant signal molecules by *Agrobacterium*: genetic evidence for direct recognition of phenolic inducers by the VirA protein. *Gene* **179**, 83-88
66. Winans, S. C. (1991) An *Agrobacterium* two-component regulatory system for the detection of chemicals released from plant wounds. *Molecular microbiology* **5**, 2345-2350
67. Huang, M. L., Cangelosi, G. A., Halperin, W., and Nester, E. W. (1990) A chromosomal *Agrobacterium tumefaciens* gene required for effective plant signal transduction. *J Bacteriol.* **172**, 1814-1822
68. He, F., Nair, G. R., Soto, C. S., Chang, Y., Hsu, L., Ronzone, E., DeGrado, W. F., and Binns, A. N. (2009) Molecular basis of ChvE function in sugar binding, sugar utilization, and virulence in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology* **191**, 5802-5813
69. Peng, W. T., Lee, Y. W., and Nester, E. W. (1998) The phenolic recognition profiles of the *Agrobacterium tumefaciens* VirA protein are broadened by a high level of the sugar binding protein ChvE. *Journal of bacteriology* **180**, 5632-5638
70. Nair, G. R., Lai, X., Wise, A. A., Rhee, B. W., Jacobs, M., and Binns, A. N. (2011) The integrity of the periplasmic domain of the VirA sensor kinase is critical for optimal coordination of the virulence signal response in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology* **193**, 1436-1448
71. Chang, C. H., and Winans, S. C. (1992) Functional roles assigned to the periplasmic, linker, and receiver domains of the *Agrobacterium tumefaciens* VirA protein. *Journal of bacteriology* **174**, 7033-7039

72. Toyoda-Yamamoto, A., Shimoda, N., and Machida, Y. (2000) Genetic analysis of the signal-sensing region of the histidine protein kinase VirA of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet* **263**, 939-947
73. Jin, S. G., Prusti, R. K., Roitsch, T., Ankenbauer, R. G., and Nester, E. W. (1990) Phosphorylation of the VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: essential role in biological activity of VirG. *Journal of bacteriology* **172**, 4945-4950
74. Roitsch, T., Wang, H., Jin, S. G., and Nester, E. W. (1990) Mutational analysis of the VirG protein, a transcriptional activator of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes. *Journal of bacteriology* **172**, 6054-6060
75. Czarnecka-Verner, E., Salem, T. A., and Gurley, W. B. (2016) Adaptation of the *Agrobacterium tumefaciens* VirG response regulator to activate transcription in plants. *Plant Mol Biol* **90**, 217-231
76. Tamamoto, S., Aoyama, T., Takanami, M., and Oka, A. (1990) Binding of the regulatory protein VirG to the phased signal sequences upstream from virulence genes on the hairy-root-inducing plasmid. *Journal of molecular biology* **215**, 537-547
77. Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Quorollo, B., Goldman, B. S., Cao, Y., Askenazi, M., Halling, C., Mullin, L., Houmiel, K., Gordon, J., Vaudin, M., Iartchouk, O., Epp, A., Liu, F., Wollam, C., Allinger, M., Doughty, D., Scott, C., Lappas, C., Markelz, B., Flanagan, C., Crowell, C., Gurson, J., Lomo, C., Sear, C., Strub, G., Cielo, C., and Slater, S. (2001) Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**, 2323-2328
78. Platt, T. G., Morton, E. R., Barton, I. S., Bever, J. D., and Fuqua, C. (2014) Ecological dynamics and complex interactions of *Agrobacterium* megaplasmids. *Front Plant Sci* **5**, 635
79. Wood, D. W., Setubal, J. C., Kaul, R., Monks, D. E., Kitajima, J. P., Okura, V. K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G. E., Almeida, N. F., Woo, L., Chen, Y., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Karp, P. D., Bovee, D. S., Chapman, P., Clendenning, J., Deatherage, G., Gillet, W., Grant, C., Kutuyavin, T., Levy, R., Li, M. J., McClelland, E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimmachak, C., Wu, Z., Romero, P., Gordon, D., Zhang, S., Yoo, H., Tao, Y., Biddle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Gordon-Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao, Z. Y., Dolan, M., Chumley, F., Tingey, S. V., Tomb, J. F., Gordon, M. P., Olson, M. V., and Nester, E. W. (2001) The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**, 2317-2323
80. Cook, D. M., Li, P. L., Ruchaud, F., Padden, S., and Farrand, S. K. (1997) Ti plasmid conjugation is independent of vir: reconstitution of the tra functions from pTiC58 as a binary system. *Journal of bacteriology* **179**, 1291-1297
81. Zambryski, P. (1992) Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* **43**, 465-490
82. Piper, K. R., Beck Von Bodman, S., Hwang, I., and Farrand, S. K. (1999) Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Molecular microbiology* **32**, 1077-1089
83. Li, P. L., and Farrand, S. K. (2000) The Replicator of the Nopaline-Type Ti Plasmid pTiC58 Is a Member of the *repABC* Family and Is Influenced by the TraR-Dependent Quorum-Sensing Regulatory System. *Journal of bacteriology* **182**, 179-188

84. Pinto, U. M., Pappas, K. M., and Winans, S. C. (2012) The ABCs of plasmid replication and segregation. *Nature reviews. Microbiology* **10**, 755-765
85. Zhang, L., Murphy, P. J., Kerr, A., and Tate, M. E. (1993) Agrobacterium conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones. *Nature* **362**, 446-448
86. Piper, K. R., Beck von Bodman, S., and Farrand, S. K. (1993) Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature* **362**, 448-450
87. Farrand, S. K., Hwang, I., and Cook, D. M. (1996) The tra region of the nopaline-type Ti plasmid is a chimera with elements related to the transfer systems of RSF1010, RP4, and F. *Journal of bacteriology* **178**, 4233-4247
88. Li, P. L., Hwang, I., Miyagi, H., True, H., and Farrand, S. K. (1999) Essential Components of the Ti Plasmid trb System, a Type IV Macromolecular Transporter. *Journal of bacteriology* **181**, 5033-5041
89. Li, P. L., Everhart, D. M., and Farrand, S. K. (1998) Genetic and Sequence Analysis of the pTiC58 trb Locus, Encoding a Mating-Pair Formation System Related to Members of the Type IV Secretion Family. *Journal of bacteriology* **180**, 6164-6172
90. White, C. E., and Winans, S. C. (2007) Cell-cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **362**, 1135-1148
91. Lacroix, B., and Citovsky, V. (2015) Nopaline-type Ti plasmid of *Agrobacterium* encodes a VirF-like functional F-box protein. *Sci Rep* **5**, 16610
92. Atmakuri, K., Cascales, E., Burton, O. T., Banta, L. M., and Christie, P. J. (2007) *Agrobacterium* ParA/MinD-like VirC1 spatially coordinates early conjugative DNA transfer reactions. *The EMBO journal* **26**, 2540-2551
93. Ghai, J., and Das, A. (1989) The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid encodes a DNA-relaxing enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 3109-3113
94. Pansegrau, W., Schoumacher, F., Hohn, B., and Lanka, E. (1993) Site-specific cleavage and joining of single-stranded DNA by VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids: analogy to bacterial conjugation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 11538-11542
95. Lin, T. S., and Kado, C. I. (1993) The *virD4* gene is required for virulence while *virD3* and *orf5* are not required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular microbiology* **9**, 803-812
96. Wang, Y., Zhang, S., Huang, F., Zhou, X., Chen, Z., Peng, W., and Luo, M. (2018) VirD5 is required for efficient *Agrobacterium* infection and interacts with Arabidopsis VIP2. *New Phytol* **217**, 726-738
97. Cascales, E., and Christie, P. J. (2004) Definition of a Bacterial Type IV Secretion Pathway for a DNA Substrate. *Science* **304**, 1170-1173
98. Zhao, Z., Sagulenko, E., Ding, Z., and Christie, P. J. (2001) Activities of *virE1* and the VirE1 Secretion Chaperone in Export of the Multifunctional VirE2 Effector via an *Agrobacterium* Type IV Secretion Pathway. *Journal of bacteriology* **183**, 3855-3865

99. Vergunst, A. C., van Lier, M. C., den Dulk-Ras, A., and Hooykaas, P. J. (2003) Recognition of the *Agrobacterium tumefaciens* VirE2 translocation signal by the VirB/D4 transport system does not require VirE1. *Plant Physiol* **133**, 978-988
100. Garcia-Rodriguez, F. M., Schrammeijer, B., and Hooykaas, P. J. (2006) The *Agrobacterium* VirE3 effector protein: a potential plant transcriptional activator. *Nucleic acids research* **34**, 6496-6504
101. Otten, L., Salomone, J. Y., Helfer, A., Schmidt, J., Hammann, P., and De Ruffray, P. (1999) Sequence and functional analysis of the left-hand part of the T-region from the nopaline-type Ti plasmid, pTiC58. *Plant Mol Biol* **41**, 765-776
102. Zhang, Y., Lee, C. W., Wehner, N., Imdahl, F., Svetlana, V., Weiste, C., Droge-Laser, W., and Deeken, R. (2015) Regulation of oncogene expression in T-DNA-transformed host plant cells. *PLoS pathogens* **11**, e1004620
103. Körber, H., Strizhov, N., Staiger, D., Feldwisch, J., Olsson, O., Sandberg, G., Palme, K., Schell, J., and Koncz, C. (1991) T-DNA gene 5 of *Agrobacterium* modulates auxin response by autoregulated synthesis of a growth hormone antagonist in plants. *The EMBO journal* **10**, 3983-3991
104. Barry, G. F., Rogers, S. G., Fraley, R. T., and Brand, L. (1984) Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 4776-4780
105. Broer, I., Dröge-Laser, W., Barker, R. F., Neumann, K., Klipp, W., and Pühler, A. (1995) Identification of the *Agrobacterium tumefaciens* C58 T-DNA genes e and f and their impact on crown gall tumour formation. *Plant Molecular Biology* **27**, 41-57
106. Messens, E., Lenaerts, A., Van Montagu, M., and Hedges, R. W. (1985) Genetic basis for opine secretion from crown gall tumour cells. *Mol Gen Genet* **199**, 344-348
107. Ryder, M. H., Tate, M. E., and Jones, G. P. (1984) Agrocinoipine A, a tumor-inducing plasmid-coded enzyme product, is a phosphodiester of sucrose and L-arabinose. *The Journal of biological chemistry* **259**, 9704-9710
108. Dessaux, Y., Petit, A., Tempé, J., Demarez, M., Legrain, C., and Wiame, J. M. (1986) Arginine catabolism in *Agrobacterium* strains: role of the Ti plasmid. *Journal of bacteriology* **166**, 44-50
109. Kim, H. S., Yi, H., Myung, J., Piper, K. R., and Farrand, S. K. (2008) Opine-Based *Agrobacterium* Competitiveness: Dual Expression Control of the Agrocinoipine Catabolism (*acc*) Operon by Agrocinoipines and Phosphate Levels. *Journal of bacteriology* **190**, 3700-3711
110. Beck von Bodman, S., Hayman, G. T., and Farrand, S. K. (1992) Opine catabolism and conjugal transfer of the nopaline Ti plasmid pTiC58 are coordinately regulated by a single repressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 643-647
111. Kim, H., and Farrand, S. K. (1997) Characterization of the *acc* operon from the nopaline-type Ti plasmid pTiC58, which encodes utilization of agrocinoipines A and B and susceptibility to agrocino 84. *Journal of bacteriology* **179**, 7559-7572
112. Marincs, F., and White, D. W. (1994) The NocR repressor-activator protein regulates expression of the *nocB* and *nocR* genes of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet* **244**, 367-373

113. Schardl, C. L., and Kado, C. I. (1983) Ti plasmid and chromosomal ornithine catabolism genes of *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Journal of bacteriology* **155**, 196-202
114. Sans, N., Schröder, G., and Schröder, J. (1987) The Noc region of Ti plasmid C58 codes for arginase and ornithine cyclodeaminase. *Eur J Biochem* **167**, 81-87
115. Atmakuri, K., Cascales, E., and Christie, P. J. (2004) Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Molecular microbiology* **54**, 1199-1211
116. Ripoll-Rozada, J., Zunzunegui, S., de la Cruz, F., Arechaga, I., and Cabezón, E. (2013) Functional interactions of VirB11 traffic ATPases with VirB4 and VirD4 molecular motors in type IV secretion systems. *Journal of bacteriology* **195**, 4195-4201
117. Dang, T. A., and Christie, P. J. (1997) The VirB4 ATPase of *Agrobacterium tumefaciens* is a cytoplasmic membrane protein exposed at the periplasmic surface. *Journal of bacteriology* **179**, 453-462
118. Middleton, R., Sjölander, K., Krishnamurthy, N., Foley, J., and Zambryski, P. (2005) Predicted hexameric structure of the *Agrobacterium* VirB4 C terminus suggests VirB4 acts as a docking site during type IV secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 1685-1690
119. Shirasu, K., Koukolíková-Nicola, Z., Hohn, B., and Kado, C. I. (1994) An inner-membrane-associated virulence protein essential for T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants exhibits ATPase activity and similarities to conjugative transfer genes. *Molecular microbiology* **11**, 581-588
120. Arechaga, I., Peña, A., Zunzunegui, S., del Carmen Fernández-Alonso, M., Rivas, G., and de la Cruz, F. (2008) ATPase activity and oligomeric state of TrwK, the VirB4 homologue of the plasmid R388 type IV secretion system. *Journal of bacteriology* **190**, 5472-5479
121. Walldén, K., Williams, R., Yan, J., Lian, P. W., Wang, L., Thalassinou, K., Orlova, E. V., and Waksman, G. (2012) Structure of the VirB4 ATPase, alone and bound to the core complex of a type IV secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 11348-11353
122. Durand, E., Oomen, C., and Waksman, G. (2010) Biochemical dissection of the ATPase TraB, the VirB4 homologue of the *Escherichia coli* pKM101 conjugation machinery. *Journal of bacteriology* **192**, 2315-2323
123. Durand, E., Waksman, G., and Receveur-Brechot, V. (2011) Structural insights into the membrane-extracted dimeric form of the ATPase TraB from the *Escherichia coli* pKM101 conjugation system. *BMC Struct Biol* **11**, 4
124. Pena, A., Matilla, I., Martín-Benito, J., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L., de la Cruz, F., Cabezón, E., and Arechaga, I. (2012) The hexameric structure of a conjugative VirB4 protein ATPase provides new insights for a functional and phylogenetic relationship with DNA translocases. *The Journal of biological chemistry* **287**, 39925-39932
125. Fullner, K. J., Stephens, K. M., and 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**, 704-715
126. Berger, B. R., and Christie, P. J. (1993) The *Agrobacterium tumefaciens* virB4 gene product is an essential virulence protein requiring an intact nucleoside triphosphate-binding domain. *Journal of bacteriology* **175**, 1723-1734

127. Rabel, C., Grahn, A. M., Lurz, R., and Lanka, E. (2003) The VirB4 Family of Proposed Traffic Nucleoside Triphosphatases: Common Motifs in Plasmid RP4 TrbE Are Essential for Conjugation and Phage Adsorption. *Journal of bacteriology* **185**, 1045-1058
128. Yuan, Q., Carle, A., Gao, C., Sivanesan, D., Aly, K. A., Hoppner, C., Krall, L., Domke, N., and Baron, C. (2005) Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *The Journal of biological chemistry* **280**, 26349-26359
129. Kerr, J. E., and 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. *Journal of bacteriology* **192**, 4923-4934
130. Cascales, E., Atmakuri, K., Sarkar, M. K., and Christie, P. J. (2013) DNA Substrate-Induced Activation of the *Agrobacterium* VirB/VirD4 Type IV Secretion System. *Journal of bacteriology* **195**, 2691-2704
131. Sagulenko, E., Sagulenko, V., Chen, J., and Christie, P. J. (2001) Role of *Agrobacterium* VirB11 ATPase in T-pilus assembly and substrate selection. *Journal of bacteriology* **183**, 5813-5825
132. Savvides, S. N., Yeo, H. J., Beck, M. R., Blaesing, F., Lurz, R., Lanka, E., Buhrdorf, R., Fischer, W., Haas, R., and Waksman, G. (2003) VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies: new insights into bacterial type IV secretion. *The EMBO journal* **22**, 26349-26359
133. Ripoll-Rozada, J., Garcia-Cazorla, Y., Getino, M., Machon, C., Sanabria-Rios, D., de la Cruz, F., Cabezon, E., and Arechaga, I. (2016) Type IV traffic ATPase TrwD as molecular target to inhibit bacterial conjugation. *Molecular microbiology* **100**, 912-921
134. Hare, S., Bayliss, R., Baron, C., and Waksman, G. (2006) A large domain swap in the VirB11 ATPase of *Brucella suis* leaves the hexameric assembly intact. *Journal of molecular biology* **360**, 56-66
135. Yeo, H. J., Savvides, S. N., Herr, A. B., Lanka, E., and Waksman, G. (2000) Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Mol Cell* **6**, 1461-1472
136. Kumar, R. B., and Das, A. (2002) Polar location and functional domains of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer protein VirD4. *Molecular microbiology* **43**, 1523-1532
137. Gomis-Rüth, F. X., de la Cruz, F., and Coll, M. (2002) Structure and role of coupling proteins in conjugal DNA transfer. *Res Microbiol* **153**, 199-204
138. Lai, E. M., Chesnokova, O., Banta, L. M., and Kado, C. I. (2000) Genetic and environmental factors affecting T-pilin export and T-pilus biogenesis in relation to flagellation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology* **182**, 3705-3716
139. Cascales, E., and Christie, P. J. (2004) *Agrobacterium* VirB10, an ATP energy sensor required for type IV secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 17228-17233
140. Llosa, M., Zunzunegui, S., and de la Cruz, F. (2003) Conjugative coupling proteins interact with cognate and heterologous VirB10-like proteins while exhibiting specificity for cognate relaxosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 10465-10470

141. Hormaeche, I., Alkorta, I., Moro, F., Valpuesta, J. M., Goni, F. M., and De La Cruz, F. (2002) Purification and properties of TrwB, a hexameric, ATP-binding integral membrane protein essential for R388 plasmid conjugation. *The Journal of biological chemistry* **277**, 46456-46462
142. Hormaeche, I., Iloro, I., Arrondo, J. L., Goni, F. M., de la Cruz, F., and Alkorta, I. (2004) Role of the transmembrane domain in the stability of TrwB, an integral protein involved in bacterial conjugation. *The Journal of biological chemistry* **279**, 10955-10961
143. Matilla, I., Alfonso, C., Rivas, G., Bolt, E. L., de la Cruz, F., and Cabezon, E. (2010) The conjugative DNA translocase TrwB is a structure-specific DNA-binding protein. *The Journal of biological chemistry* **285**, 17537-17544
144. Hormaeche, I., Segura, R. L., Vecino, A. J., Goni, F. M., de la Cruz, F., and Alkorta, I. (2006) The transmembrane domain provides nucleotide binding specificity to the bacterial conjugation protein TrwB. *FEBS letters* **580**, 3075-3082
145. Vecino, A. J., Segura, R. L., Ugarte-Urbe, B., Aguila, S., Hormaeche, I., de la Cruz, F., Goni, F. M., and Alkorta, I. (2010) Reconstitution in liposome bilayers enhances nucleotide binding affinity and ATP-specificity of TrwB conjugative coupling protein. *Biochimica et biophysica acta* **1798**, 2160-2169
146. Tato, I., Zunzunegui, S., de la Cruz, F., and Cabezon, E. (2005) TrwB, the coupling protein involved in DNA transport during bacterial conjugation, is a DNA-dependent ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 8156-8161
147. Tato, I., Matilla, I., Arechaga, I., Zunzunegui, S., de la Cruz, F., and Cabezon, E. (2007) The ATPase activity of the DNA transporter TrwB is modulated by protein TrwA: implications for a common assembly mechanism of DNA translocating motors. *The Journal of biological chemistry* **282**, 25569-25576
148. Gomis-Rüth, F. X., Moncalián, G., Pérez-Luque, R., González, A., Cabezón, E., de la Cruz, F., and Coll, M. (2001) The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature* **409**, 637-641
149. Baron, C., Llosa, M., Zhou, S., and 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. *Journal of bacteriology* **179**, 1203-1210
150. Ward, D. V., Draper, O., Zupan, J. R., and Zambryski, P. C. (2002) Peptide linkage mapping of the *Agrobacterium tumefaciens* vir-encoded type IV secretion system reveals protein subassemblies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 11493-11500
151. Zupan, J., Hackworth, C. A., Aguilar, J., Ward, D., and Zambryski, P. (2007) VirB1* promotes T-pilus formation in the vir-Type IV secretion system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology* **189**, 6551-6563
152. Berger, B. R., and Christie, P. J. (1994) Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* virB operon: virB2 through virB11 are essential virulence genes. *Journal of bacteriology* **176**, 3646-3660
153. Llosa, M., Zupan, J., Baron, C., and Zambryski, P. (2000) The N- and C-terminal portions of the *Agrobacterium* VirB1 protein independently enhance tumorigenesis. *Journal of bacteriology* **182**, 3437-3445

154. Mossey, P., Hudacek, A., and Das, A. (2010) *Agrobacterium tumefaciens* Type IV Secretion Protein VirB3 Is an Inner Membrane Protein and Requires VirB4, VirB7, and VirB8 for Stabilization. *Journal of bacteriology* **192**, 2830–2838
155. Hapfelmeier, S., Domke, N., Zambryski, P. C., and Baron, C. (2000) VirB6 Is Required for Stabilization of VirB5 and VirB3 and Formation of VirB7 Homodimers in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology* **182**, 4505-4511
156. Jakubowski, S. J., Krishnamoorthy, V., Cascales, E., and Christie, P. J. (2004) *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 domains direct the ordered export of a DNA substrate through a type IV secretion System. *Journal of molecular biology* **341**, 961-977
157. Villamil Giraldo, A. M., Mary, C., Sivanesan, D., and Baron, C. (2015) VirB6 and VirB10 from the *Brucella* type IV secretion system interact via the N-terminal periplasmic domain of VirB6. *FEBS letters* **589**, 1883–1889
158. Karnholz, A., Hoefler, C., Odenbreit, S., Fischer, W., Hofreuter, D., and Haas, R. (2006) Functional and topological characterization of novel components of the *comB* DNA transformation competence system in *Helicobacter pylori*. *Journal of bacteriology* **188**, 882-893
159. Jakubowski, S. J., Krishnamoorthy, V., and Christie, P. J. (2003) *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 Protein Participates in Formation of VirB7 and VirB9 Complexes Required for Type IV Secretion. *Journal of bacteriology* **185**, 2867-2878
160. Villamil Giraldo, A. M., Sivanesan, D., Carle, A., Paschos, A., Smith, M. A., Plesa, M., Coulton, J., and 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**, 3881-3890
161. Bailey, S., Ward, D., Middleton, R., Grossmann, J. G., and Zambryski, P. C. (2006) *Agrobacterium tumefaciens* VirB8 structure reveals potential protein-protein interaction sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 2582-2587
162. Terradot, L., Bayliss, R., Oomen, C., Leonard, G. A., Baron, C., and Waksman, G. (2005) Structures of two core subunits of the bacterial type IV secretion system, VirB8 from *Brucella suis* and ComB10 from *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 4596-4601
163. Casu, B., Smart, J., Hancock, M. A., Smith, M., Sygusch, J., and Baron, C. (2016) Structural Analysis and Inhibition of TraE from the pKM101 Type IV Secretion System. *The Journal of biological chemistry* **291**, 23817-23829
164. Das, A., and Xie, Y. H. (2000) The *Agrobacterium* T-DNA transport pore proteins VirB8, VirB9, and VirB10 interact with one another. *Journal of bacteriology* **182**, 758-763
165. Sivanesan, D., and Baron, C. (2011) The dimer interface of *Agrobacterium tumefaciens* VirB8 is important for type IV secretion system function, stability, and association of VirB2 with the core complex. *Journal of bacteriology* **193**, 2097-2106
166. Paschos, A., Patey, G., Sivanesan, D., Gao, C., Bayliss, R., Waksman, G., O'Callaghan, D., and Baron, C. (2006) Dimerization and interactions of *Brucella suis* VirB8 with VirB4 and VirB10 are required for its biological activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 7252–7257

167. Judd, P. K., Kumar, R. B., and Das, A. (2005) Spatial location and requirements for the assembly of the *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion apparatus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 11498-11503
168. Fernandez, D., Spudich, G. M., Zhou, X. R., and Christie, P. J. (1996) The *Agrobacterium tumefaciens* VirB7 lipoprotein is required for stabilization of VirB proteins during assembly of the T-complex transport apparatus. *Journal of bacteriology* **178**, 3168-3176
169. Fernandez, D., Dang, T. A., Spudich, G. M., Zhou, X. R., Berger, B. R., and 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. *Journal of bacteriology* **178**, 3156-3167
170. Fronzes, R., Schafer, E., Wang, L., Saibil, H. R., Orlova, E. V., and Waksman, G. (2009) Structure of a type IV secretion system core complex. *Science* **323**, 266-268
171. Spudich, G. M., Fernandez, D., Zhou, X. R., and Christie, P. J. (1996) Intermolecular disulfide bonds stabilize VirB7 homodimers and VirB7/VirB9 heterodimers during biogenesis of the *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 7512-7517
172. Baron, C., Thorstenson, Y. R., and Zambryski, P. C. (1997) The lipoprotein VirB7 interacts with VirB9 in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology* **179**, 1211-1218
173. Anderson, L. B., Hertzell, A. V., and Das, A. (1996) *Agrobacterium tumefaciens* VirB7 and VirB9 form a disulfide-linked protein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 8889-8894
174. Jakubowski, S. J., Cascales, E., Krishnamoorthy, V., and 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. *Journal of bacteriology* **187**, 3486-3495
175. Bayliss, R., Harris, R., Coutte, L., Monier, A., Fronzes, R., Christie, P. J., Driscoll, P. C., and Waksman, G. (2007) NMR structure of a complex between the VirB9/VirB7 interaction domains of the pKM101 type IV secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 1673-1678
176. Oliveira, L. C., Souza, D. P., Oka, G. U., Lima, F. D. S., Oliveira, R. J., Favaro, D. C., Wienk, H., Boelens, R., Farah, C. S., and Salinas, R. K. (2016) VirB7 and VirB9 Interactions Are Required for the Assembly and Antibacterial Activity of a Type IV Secretion System. *Structure* **24**, 1707-1718
177. Jakubowski, S. J., Kerr, J. E., Garza, I., Krishnamoorthy, V., Bayliss, R., Waksman, G., and Christie, P. J. (2009) *Agrobacterium* VirB10 domain requirements for type IV secretion and T pilus biogenesis. *Molecular microbiology* **71**, 779-794
178. Chandran, V., Fronzes, R., Duquerroy, S., Cronin, N., Navaza, J., and Waksman, G. (2009) Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature* **462**, 1011-1015
179. Christie, P. J., and Cascales, E. (2005) Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review). *Mol Membr Biol* **22**, 51-61
180. Jones, A. L., Lai, E. M., Shirasu, K., and Kado, C. I. (1996) VirB2 is a processed pilin-like protein encoded by the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Journal of bacteriology* **178**, 5706-5711

181. Lai, E. M., Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lanka, E., and Kado, C. I. (2002) Biogenesis of T Pili in *Agrobacterium tumefaciens* Requires Precise VirB2 Propilin Cleavage and Cyclization. *Journal of bacteriology* **184**, 327-330
182. Lai, E. M., and Kado, C. I. (2002) The *Agrobacterium tumefaciens* T pilus composed of cyclic T pilin is highly resilient to extreme environments. *FEMS microbiology letters* **210**, 111-114
183. Yeo, H. J., Yuan, Q., Beck, M. R., Baron, C., and Waksman, G. (2003) Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM101. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 15947-15952
184. Aly, K. A., and Baron, C. (2007) The VirB5 protein localizes to the T-pilus tips in *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiology* **153**, 3766-3775
185. Winans, S. C., and Walker, G. C. (1985) Conjugal transfer system of the IncN plasmid pKM101. *Journal of bacteriology* **161**, 402-410
186. Krall, L., Wiedemann, U., Unsin, G., Weiss, S., Domke, N., and Baron, C. (2002) Detergent extraction identifies different VirB protein subassemblies of the type IV secretion machinery in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 11405-11410
187. Rivera-Calzada, A., Fronzes, R., Savva, C. G., Chandran, V., Lian, P. W., Laeremans, T., Pardon, E., Steyaert, J., Remaut, H., Waksman, G., and Orlova, E. V. (2013) Structure of a bacterial type IV secretion core complex at subnanometre resolution. *The EMBO journal* **32**, 1195-1204
188. Christie, P. J. (2016) The Mosaic Type IV Secretion Systems. *EcoSal Plus* **7**
189. Redzej, A., Ukleja, M., Connery, S., Trokter, M., Felisberto-Rodrigues, C., Cryar, A., Thalassinou, K., Hayward, R. D., Orlova, E. V., and Waksman, G. (2017) Structure of a VirD4 coupling protein bound to a VirB type IV secretion machinery. *The EMBO journal* **36**, 3080-3095
190. Padavannil, A., Jobichen, C., Qinghua, Y., Seetharaman, J., Velazquez-Campoy, A., Yang, L., Pan, S. Q., and Sivaraman, J. (2014) Dimerization of VirD2 Binding Protein Is Essential for *Agrobacterium* Induced Tumor Formation in Plants. *PLoS pathogens* **10**, e1003948
191. Guo, M., Jin, S., Sun, D., Hew, C. L., and Pan, S. Q. (2007) Recruitment of conjugative DNA transfer substrate to *Agrobacterium* type IV secretion apparatus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 20019-20024
192. Guo, M., Hou, Q., Hew, C. L., and Pan, S. Q. (2007) *Agrobacterium* VirD2-binding protein is involved in tumorigenesis and redundantly encoded in conjugative transfer gene clusters. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 1201-1212
193. Vergunst, A. C., Schrammeijer, B., den Dulk-Ras, A., de Vlaam, C. M., Regensburg-Tuïnk, T. J., and Hooykaas, P. J. (2000) VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science* **290**, 979-982
194. Trokter, M., and Waksman, G. (2018) Translocation through the conjugative Type 4 secretion system requires unfolding of its protein substrate. *Journal of bacteriology*
195. Citovsky, V., Wong, M. L., and Zambryski, P. (1989) Cooperative interaction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single-stranded DNA: implications for the T-DNA

- transfer process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 1193-1197
196. Abu-Arish, A., Frenkiel-Krispin, D., Fricke, T., Tzfira, T., Citovsky, V., Wolf, S. G., and Elbaum, M. (2004) Three-dimensional reconstruction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single-stranded DNA. *The Journal of biological chemistry* **279**, 25359-25363
 197. Ziemienowicz, A., Merkle, T., Schoumacher, F., Hohn, B., and Rossi, L. (2001) Import of *Agrobacterium* T-DNA into plant nuclei: two distinct functions of VirD2 and VirE2 proteins. *Plant Cell*. **13**, 369-383
 198. Tzfira, T., and Citovsky, V. (2002) Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends Cell Biol* **12**, 121-129
 199. Lacroix, B., Loyter, A., and Citovsky, V. (2008) Association of the *Agrobacterium* T-DNA-protein complex with plant nucleosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 15429–15434
 200. Wolterink-van Loo, S., Escamilla Ayala, A. A., Hooykaas, P. J., and van Heusden, G. P. (2015) Interaction of the *Agrobacterium tumefaciens* virulence protein VirD2 with histones. *Microbiology* **161**, 401-410
 201. Lacroix, B., Loyter, A., and Citovsky, V. (2008) Association of the *Agrobacterium* T-DNA-protein complex with plant nucleosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 15429-15434
 202. Lacroix, B., Vaidya, M., Tzfira, T., and Citovsky, V. The VirE3 protein of *Agrobacterium* mimics a host cell function required for plant genetic transformation. *The EMBO journal* **24**, 428-437
 203. Tzfira, T., Vaidya, M., and Citovsky, V. (2004) Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by *Agrobacterium*. *Nature* **431**, 87-92
 204. Judd, P. K., Kumar, R. B., and Das, A. (2005) The type IV secretion apparatus protein VirB6 of *Agrobacterium tumefaciens* localizes to a cell pole. *Molecular microbiology* **55**, 115-124
 205. Judd, P. K., Mahli, D., and Das, A. (2005) Molecular characterization of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer protein VirB6. *Microbiology* **151**, 3483-3492
 206. Sreerama, N., and Woody, R. W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical biochemistry* **287**, 252-260
 207. Skrzypek, R., Iqbal, S., and Callaghan, R. (2018) Methods of reconstitution to investigate membrane protein function. *Methods*
 208. Popot, J. L., Althoff, T., Bagnard, D., Baneres, J. L., Bazzacco, P., Billon-Denis, E., Catoire, L. J., Champeil, P., Charvolin, D., Cocco, M. J., Cremel, G., Dahmane, T., de la Maza, L. M., Ebel, C., Gabel, F., Giusti, F., Gohon, Y., Goormaghtigh, E., Guittet, E., Kleinschmidt, J. H., Kuhlbrandt, W., Le Bon, C., Martinez, K. L., Picard, M., Pucci, B., Sachs, J. N., Tribet, C., van Heijenoort, C., Wien, F., Zito, F., and Zoonens, M. (2011) Amphipols from A to Z. *Annu Rev Biophys* **40**, 379-408
 209. Parmar, M., Rawson, S., Scarff, C. A., Goldman, A., Dafforn, T. R., Muench, S. P., and Postis, V. L. G. (2018) Using a SMALP platform to determine a sub-nm single particle cryo-EM membrane protein structure. *Biochimica et biophysica acta* **1860**, 378-383

210. Mizrachi, D., Chen, Y., Liu, J., Peng, H. M., Ke, A., Pollack, L., Turner, R. J., Auchus, R. J., and DeLisa, M. P. (2015) Making water-soluble integral membrane proteins *in vivo* using an amphipathic protein fusion strategy. *Nature communications* **6**, 6826
211. Smith, M. A., Coincon, M., Paschos, A., Jolicoeur, B., Lavallee, P., Sygusch, J., and Baron, C. (2012) Identification of the binding site of *Brucella* VirB8 interaction inhibitors. *Chemistry & biology* **19**, 1041-1048
212. Studier, F. W. (2005) Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein expression and purification* **41**, 207-234
213. Smart, J., Fouillen, A., Casu, B., Nanci, A., and Baron, C. (2017) Cag-delta (Cag3) protein from the *Helicobacter pylori* 26695 cag type IV secretion system forms ring-like supramolecular assemblies. *FEMS microbiology letters* **364**
214. Tsirigos, K. D., Peters, C., Shu, N., Kall, L., and Elofsson, A. (2015) The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic acids research* **43**, W401-407

Annexe I

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

Bastien Casu¹, **Charline Mary**¹, Aleksandr Sverzhinsky¹, Aurélien Fouillen^{1,2}, Antonio Nanci^{1,2} and Christian Baron^{1*}

¹Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

²Laboratory 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

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) (1-3). 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 (4).

The well-characterized *Agrobacterium tumefaciens* system serves as example of the typical composition of T4SSs that are generally composed of 12 proteins (1, 2). 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 (5-7). VirB8 homologs are thought to be assembly factors that interact with many other T4SS components in a mostly transient fashion (8-16). They are membrane proteins of typically 25 kDa comprising a short N-terminal cytoplasmic region of about 40 amino acids, one transmembrane α -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 α -helix make important contributions to protein structure and function (17-20). 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 (13, 21-23). 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 (24). 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 (25, 26). 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) (27).

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 (8, 10). 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 (8). 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 \AA and the normalized pairwise distance distribution of the curve $P(R)$ (Fig. 4b) shows a maximum distance (D_{\max}) of 137 \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 χ^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 (His₆-TraD) and we also co-expressed His₆-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 His₆-TraD from the IMAC column, suggesting that these proteins interact and analysis by SEC shows that they form a complex of approximately 200 kDa (Fig. 5a), while no-tagged TraE alone did not bind to the column. To assess whether His₆-TraD and the His₆-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), His₆-TraD (Fig. 5b) as well as His₆-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, His₆-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 (8-10, 13, 28), but interactions of full-length VirB8 homologs were also shown using the bacterial and the yeast two-hybrid systems (12, 14, 29-31). 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 (29-31). 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* (24).

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 (6, 7, 32). 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 T4SS₃₋₁₀ (Fig. S5) (7). 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 (9). 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) (7). 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 T4SS₃₋₁₀ (7). 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 (24). 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 (33). 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 (34) 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* (17), *Agrobacterium* (18) and TraE from pKM101 (8) 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 (9). The interactions with structural components such as VirB10 (11, 14) may link VirB8 complexes to the central substrate translocation pore that may be formed by VirB6 (13, 24). 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 α 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* (35).

Small scale membrane protein expression and solubilization tests

For protein overproduction, *E. coli* strain BL21star (λ DE3) carrying expression plasmids was grown under aerobic conditions at 37°C in LB to exponential phase (OD₆₀₀ 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- β -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 MgCl₂, 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 (λ DE3) harboring pHTTraE, pHTTraD, pETDuetTraDTraE were grown in LB supplemented with 50 μ g/ml kanamycin or 100 μ g/ml ampicillin only for pETDuetTraDTraE. Overnight pre-cultures in LB were used to inoculate 1 L cultures (37°C) until they reached an OD₆₀₀ 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 μ 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 (27) 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⁻¹.cm⁻¹ (with 6x-His-tag) and of 89,270 M⁻¹.cm⁻¹ (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^{-1} and 0.118 ml.g^{-1} , 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 (36). 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 His₆-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 μl of SEC-purified sample at 2 ng/ μl for 1 min and stained with 5 μl 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 μm on a FEI Eagle 4k x 4k CCD camera at a magnification of $\sim 67,000 \times$, with

pixel size of 1.64 Å. For TraE, image processing was performed using the EMAN2 package (37). 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 (38). 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 H₂O. 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 μm on a FEI Eagle 4k x 4k CCD camera at a range of magnification between ~67,000 x and ~1,000,000 x.

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⁻¹. Data were analyzed, integrated and averaged with RAW software package version 1.0.1(39). 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_g) estimation were performed in Primus and confirmed by automatic analysis using AutoRG (40). The largest dimension of the molecule, D_{\max} , and the Porod volume were calculated using GNOM (41). The pair distribution function $P(R)$ and forward scattering $I(0)$ were computed with AutoGNOM (42) and compared with those determined in Primusqt (40). GASBOR (43) 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 (43). To fit the SAXS envelope with X-ray and EM structures, MultiFit add-on from UCSF Chimera was used (45) 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, SASDB#75).

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.

References

1. Trokter M, Felisberto-Rodrigues C, Christie PJ, & Waksman G (2014) Recent advances in the structural and molecular biology of type IV secretion systems. *Current opinion in structural biology* 27C:16-23.
2. Chandran Darbari V & Waksman G (2015) Structural Biology of Bacterial Type IV Secretion Systems. *Annu Rev Biochem* 84:603-629.
3. Burkinshaw BJ & Strynadka NC (2014) Assembly and structure of the T3SS. *Biochim Biophys Acta* 1843(8):1649-1663.
4. Winans SC & Walker GC (1985) Conjugal transfer system of the N incompatibility plasmid pKM101. *J. Bacteriol.* 161:402-410.
5. Fronzes R, Christie PJ, & Waksman G (2009) The structural biology of type IV secretion systems. *Nature reviews. Microbiology* 7(10):703-714.
6. Fronzes R, *et al.* (2009) Structure of a type IV secretion system core complex. *Science* 323(5911):266-268.
7. Low HH, *et al.* (2014) Structure of a type IV secretion system. *Nature* 508(7497):550-553.
8. Casu B, *et al.* (2016) Structural analysis and inhibition of TraE from the pKM101 type IV secretion system. *J Biol. Chem.* 291:23817-23829.
9. Yuan Q, *et al.* (2005) Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *J. Biol. Chem.* 280:26349-26359.
10. Paschos A, *et al.* (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.
11. Sivanesan D, Hancock MA, Villamil Giraldo AM, & 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.
12. Sivanesan D & Baron C (2011) 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.
13. Villamil Giraldo AM, *et al.* (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.
14. 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.
15. Aguilar J, Zupan J, Cameron TA, & Zambryski PC (2010) *Agrobacterium* type IV secretion system and its substrates form helical arrays around the circumference of virulence-induced cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(8):3758-3763.
16. Aguilar J, Cameron TA, 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.

17. Terradot L, *et al.* (2005) 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.
18. Bailey S, Ward D, Middleton R, Grossmann JG, & Zambryski P (2006) *Agrobacterium tumefaciens* VirB8 structure reveals potential protein-protein interactions sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:2582-2587.
19. Gillespie JJ, *et al.* (2015) Structural Insight into How Bacteria Prevent Interference between Multiple Divergent Type IV Secretion Systems. *MBio* 6(6).
20. Goessweiner-Mohr N, *et al.* (2013) The 2.5 Å structure of the enterococcus conjugation protein TraM resembles VirB8 type IV secretion proteins. *The Journal of biological chemistry* 288(3):2018-2028.
21. Jakubowski SJ, Krishnamoorthy V, Cascales E, & Christie PJ (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.
22. Judd PK, Kumar RB, & Das A (2005) The type IV secretion apparatus protein VirB6 of *Agrobacterium tumefaciens* localizes to a cell pole. *Mol. Microbiol.* 55:115-124.
23. Villamil Giraldo AM, 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 letters* 589(15):1883-1889.
24. Cascales E & Christie PJ (2004) Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science* 304:1170-1173.
25. Kloppmann E, Punta M, & Rost B (2012) Structural genomics plucks high-hanging membrane proteins. *Current opinion in structural biology* 22(3):326-332.
26. Overington JP, Al-Lazikani B, & Hopkins AL (2006) How many drug targets are there? *Nature reviews. Drug discovery* 5(12):993-996.
27. Ndongo S, *et al.* (2008) [Autoimmune cholangitis or seronegative biliary cirrhosis: report of one case]. *Dakar medical* 53(2):127-130.
28. Fercher C, *et al.* (2016) VirB8-like protein TraH is crucial for DNA transfer in *Enterococcus faecalis*. *Sci Rep* 6:24643.
29. Patey G, Qi Z, Bourg G, Baron C, & O'Callaghan D (2006) Swapping of periplasmic domains between *Brucella suis* VirB8 and pSB102 VirB8 homologue allows heterologous complementation. *Infect. Immun.* 74(4945-4949).
30. 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.
31. 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 letters* 585(15):2431-2436.
32. Chandran V, *et al.* (2009) Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature* 462(7276):1011-1015.

33. Kuroda T, *et al.* (2015) Molecular and structural analysis of Legionella DotI gives insights into an inner membrane complex essential for type IV secretion. *Sci Rep* 5:10912.
34. Schraidt O & Marlovits TC (2011) Three-dimensional model of Salmonella's needle complex at subnanometer resolution. *Science* 331(6021):1192-1195.
35. 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.
36. Yuan Q, *et al.* (2005) Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *The Journal of biological chemistry* 280(28):26349-26359.
37. Tang G, *et al.* (2007) EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *J Struct Biol* 157(1):38-46.
38. Hohn M, *et al.* (2007) SPARX, a new environment for Cryo-EM image processing. *J Struct Biol* 157(1):47-55.
39. Nielsen SS, *et al.* (2009) BioXTAS RAW, a software program for high-throughput automated small-angle X-ray scattering data reduction and preliminary analysis. *J Appl Crystallogr* 42:959-964.
40. Konarev PV, Volkov VV, Sokolova AV, Koch MHJ, & Svergun DI (2003) PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr* 36:1277-1282.
41. Svergun DI (1992) Determination of the Regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria. *J Appl Crystallogr* 25:495-503.
42. Petoukhov MV, Konarev PV, Kikhney AG, & Svergun DI (2007) ATSAS 2.1 - towards automated and web-supported small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr* 40:S223-S228.
43. Svergun DI, Petoukhov MV, & Koch MHJ (2001) Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophysical journal* 80(6):2946-2953.
44. Pettersen EF, *et al.* (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry* 25(13):1605-1612.
45. Lasker K, Topf M, Sali A, & Wolfson HJ (2009) Inferential optimization for simultaneous fitting of multiple components into a CryoEM map of their assembly. *Journal of molecular biology* 388(1):180-194.

Figure Legends

Fig. 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. 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. 3. EM analysis of the TraE structure.

(a) A typical negative stain micrograph of the TraE complex showing uniform particles of ~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. 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. 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 (His₆-TraD), SDS-PAGE and Coomassie blue staining shows the purity of the complex. (b) Purified His₆-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 His₆-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 His₆-TraD; (d) purified His₆-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. 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 ~ 60 Å and ~ 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.

Figures

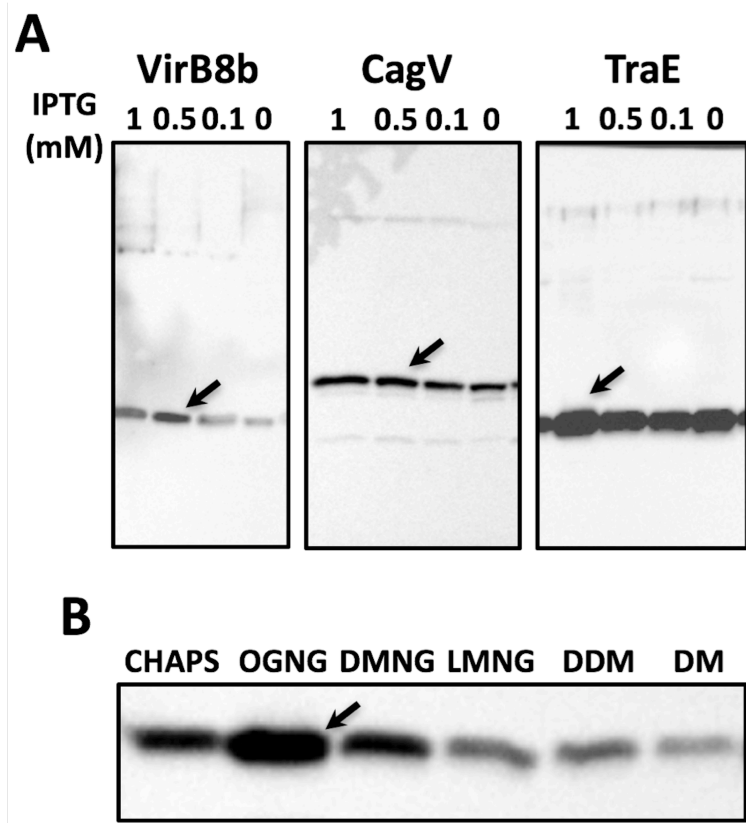


Fig. 1. Overexpression and detergent solubilization of VirB8-like full length proteins.

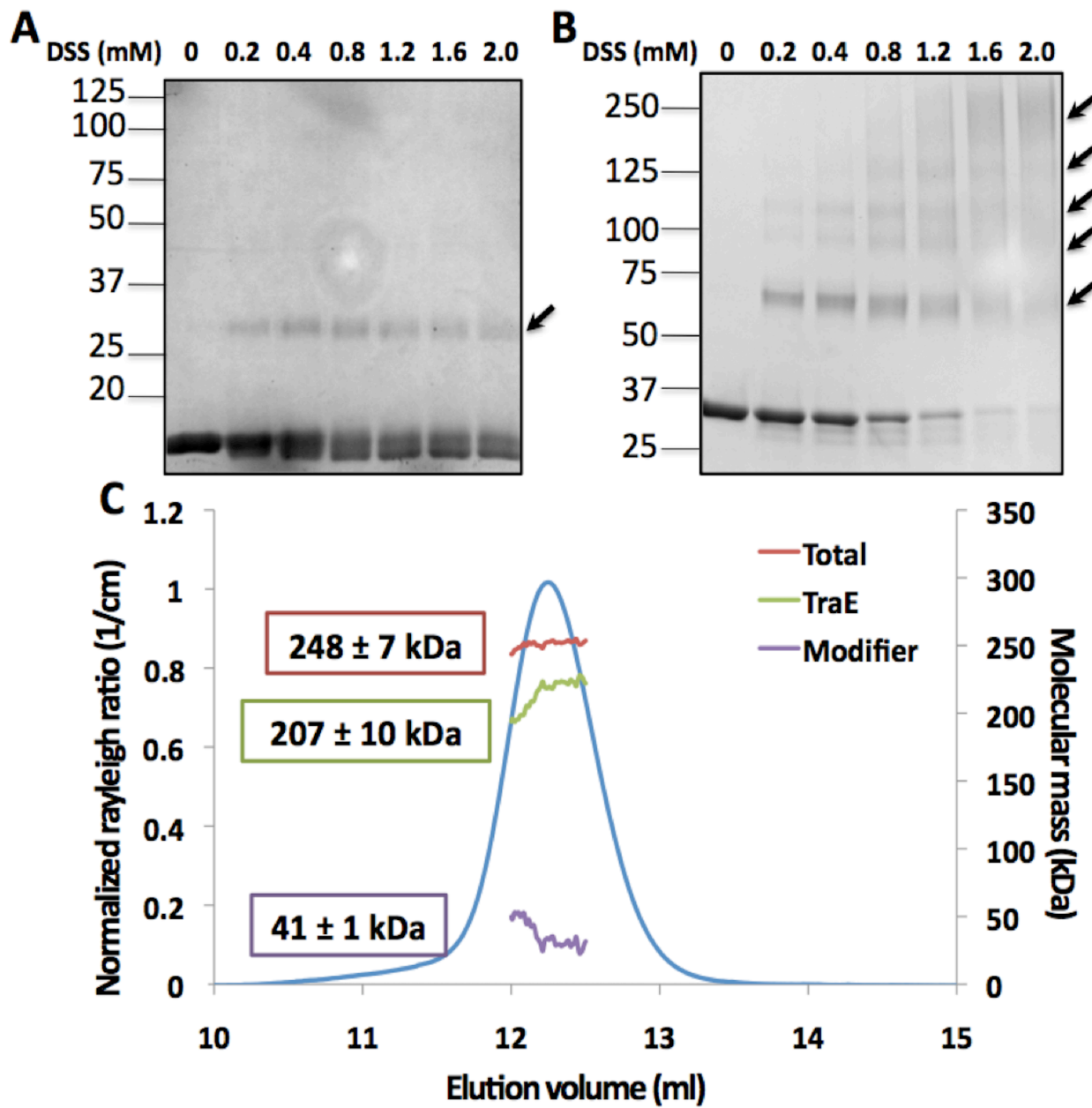


Fig. 2. Analysis of the oligomerization state of TraE.

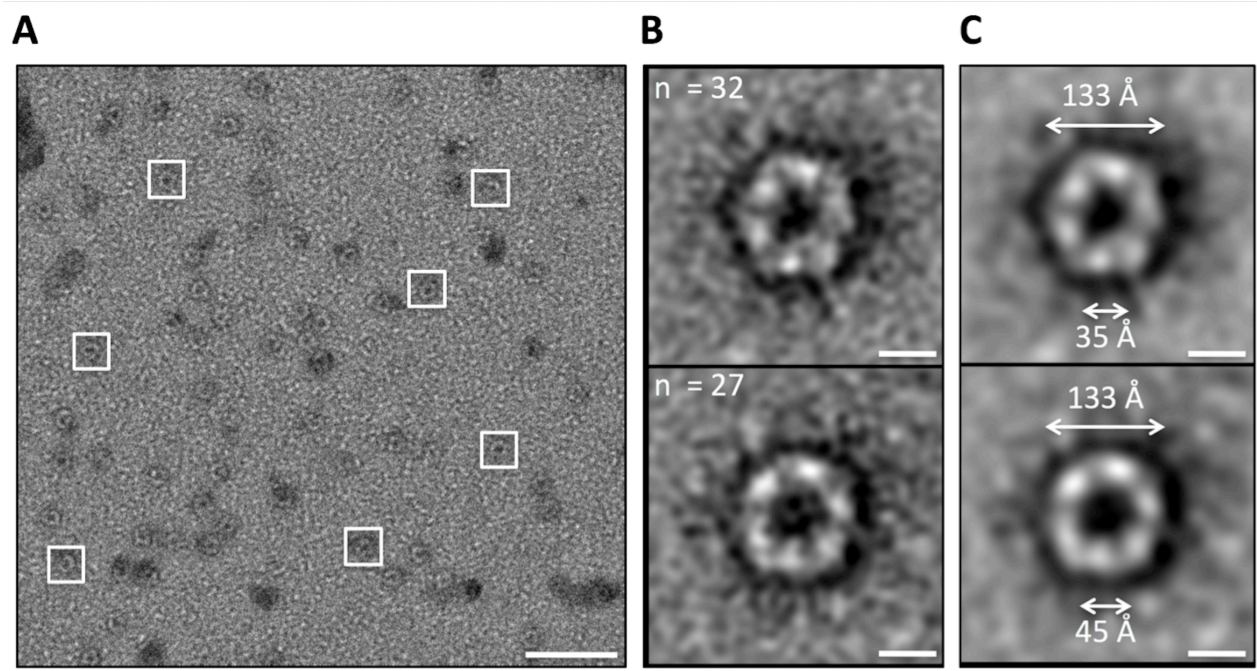


Fig. 3. EM analysis of the TraE structure.

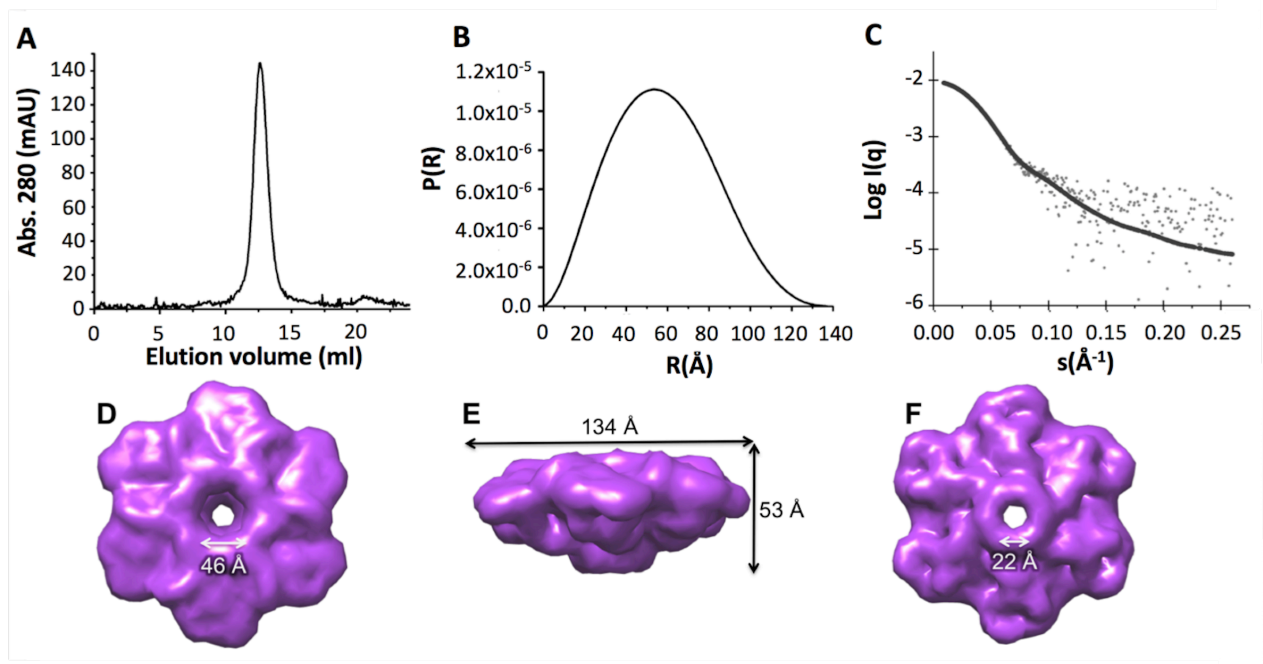


Fig. 4. SEC-SAXS analysis of TraE.

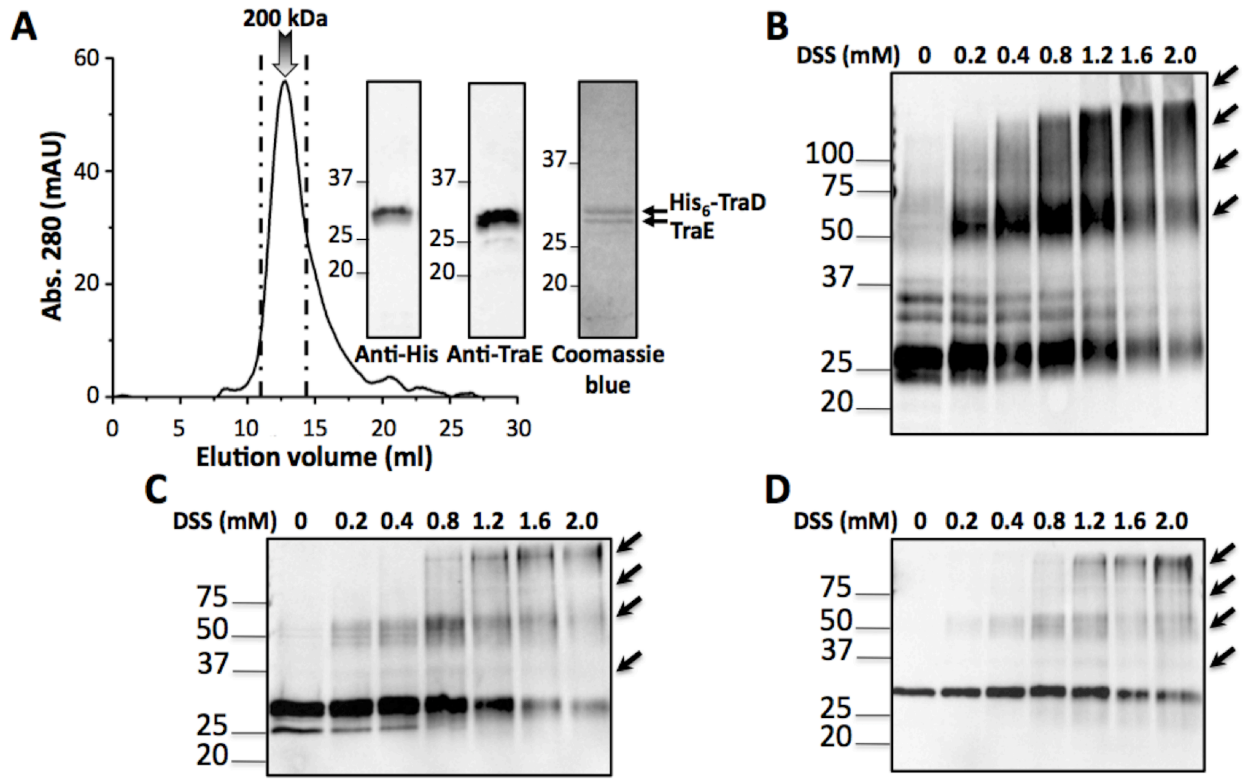


Fig. 5 Size exclusion chromatography and cross-linking analysis of TraD and of the TraD-TraE complex.

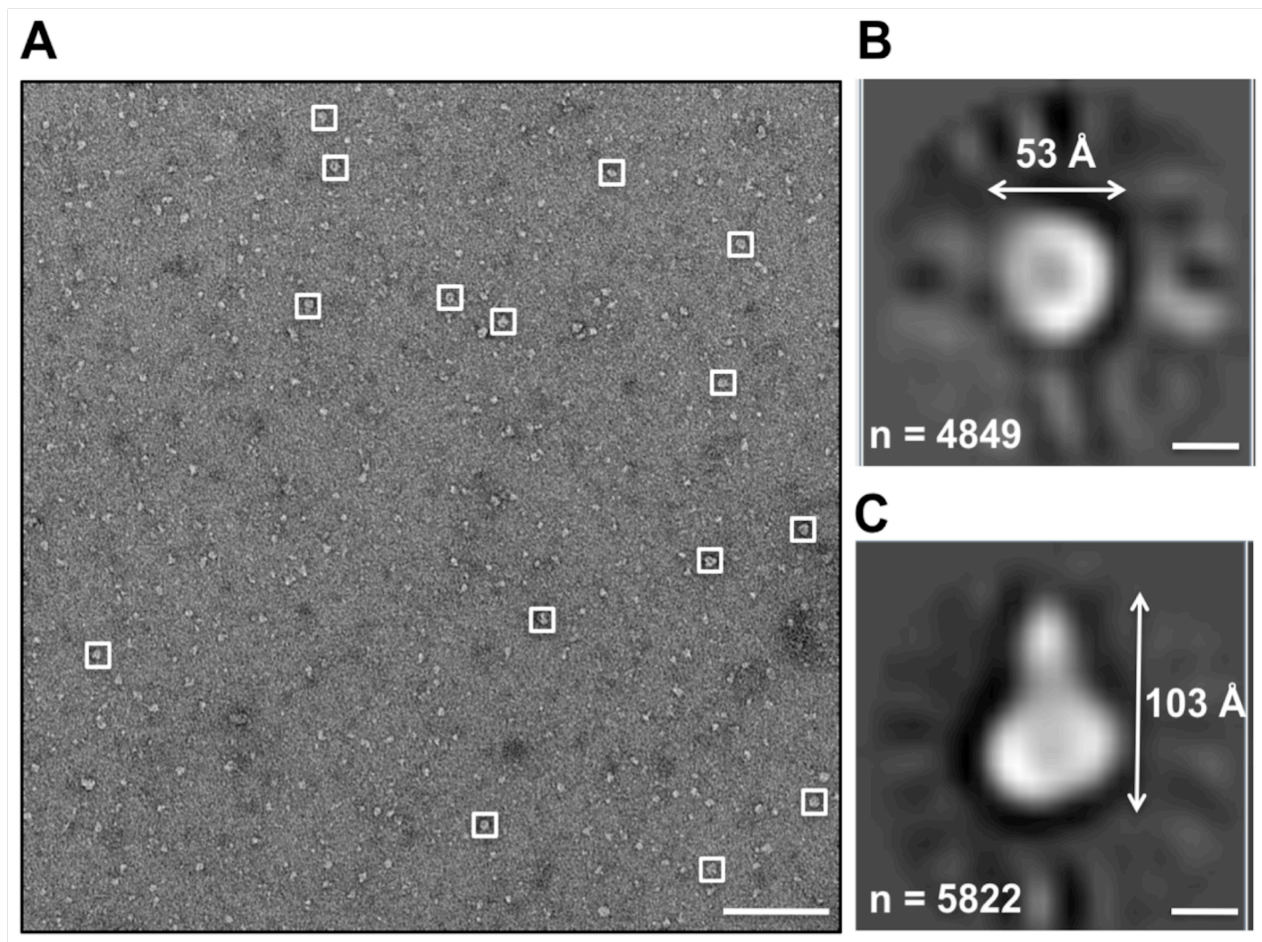


Fig. 6. EM analysis of the TraD-TraE structure.

Supplementary information

SI figure legends

Fig. S1. 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. 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. S3. 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. S4. Negative-stain EM gold bead labeling of the TraD-TraE complex.

(a) Typical negative stain micrograph of the His₆-TraD-TraE complex showing uniform white protein particles and black gold beads. His₆ 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 His₆-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. S5. Superposition of the TraE structure on T4SS and T3SS complex structures.

(a) T4SS₃₋₁₀-EM structure (EMD#2567, grey) (1) superposed with two TraE envelopes (SASDB#75, pink and purple). (b) T3SS-EM structure (EMD#1875, yellow) (2) superposed with one TraE envelope (purple).

Fig. S6. 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#5I97) (3) 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) (4) and dimers then multimerize to form an hexameric complex (SASDB#75).

SI figure

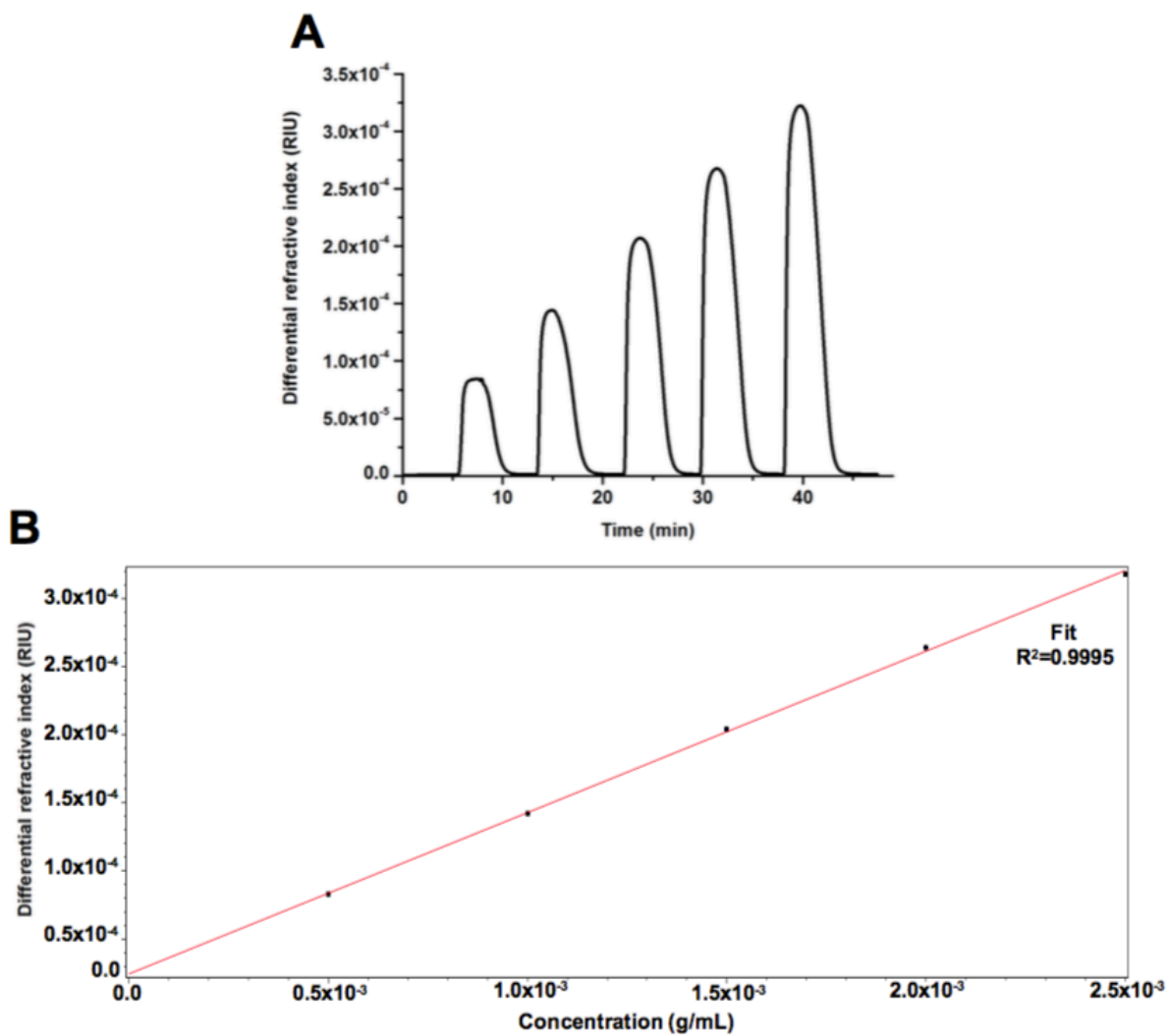


Fig. S1. Refractive index increment of OGNG.

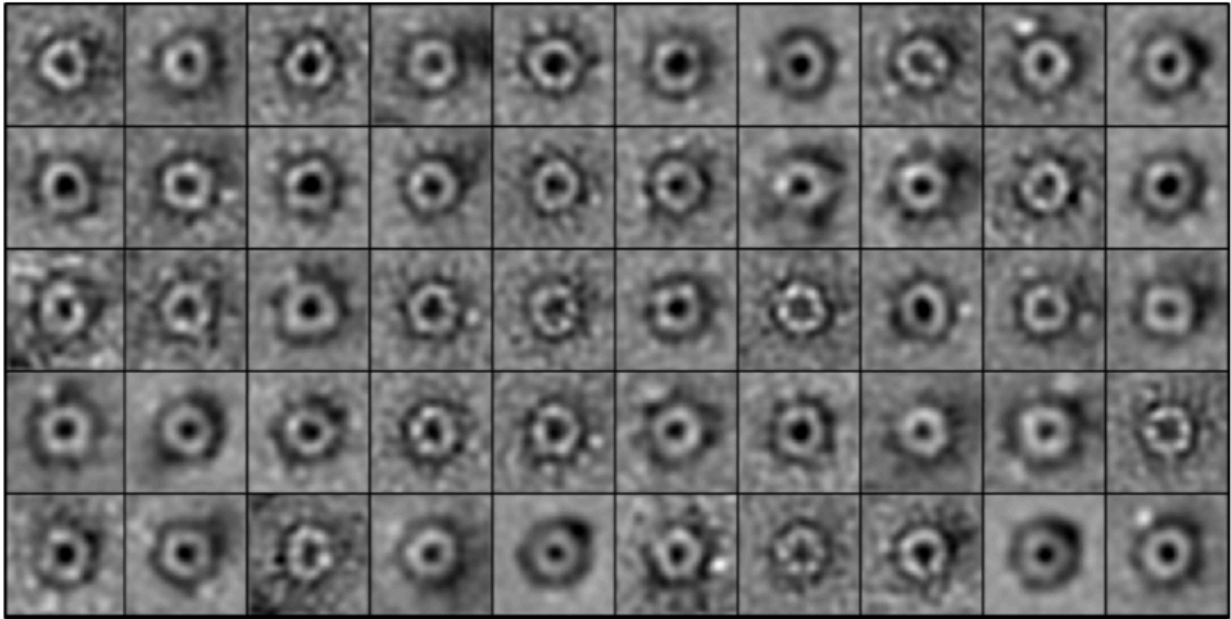


Fig. S2. Negative-stain EM 2D class averages of TraE.

|

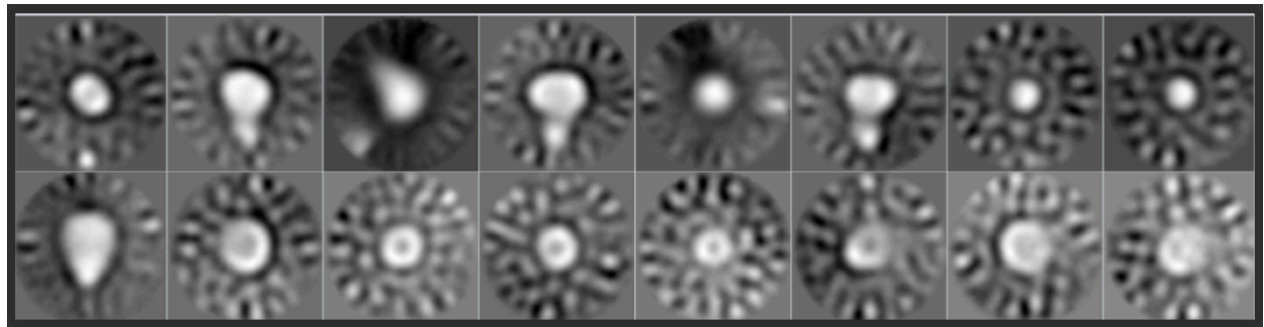


Fig. S3. Negative-stain EM 2D class averages of the TraD-TraE complex.

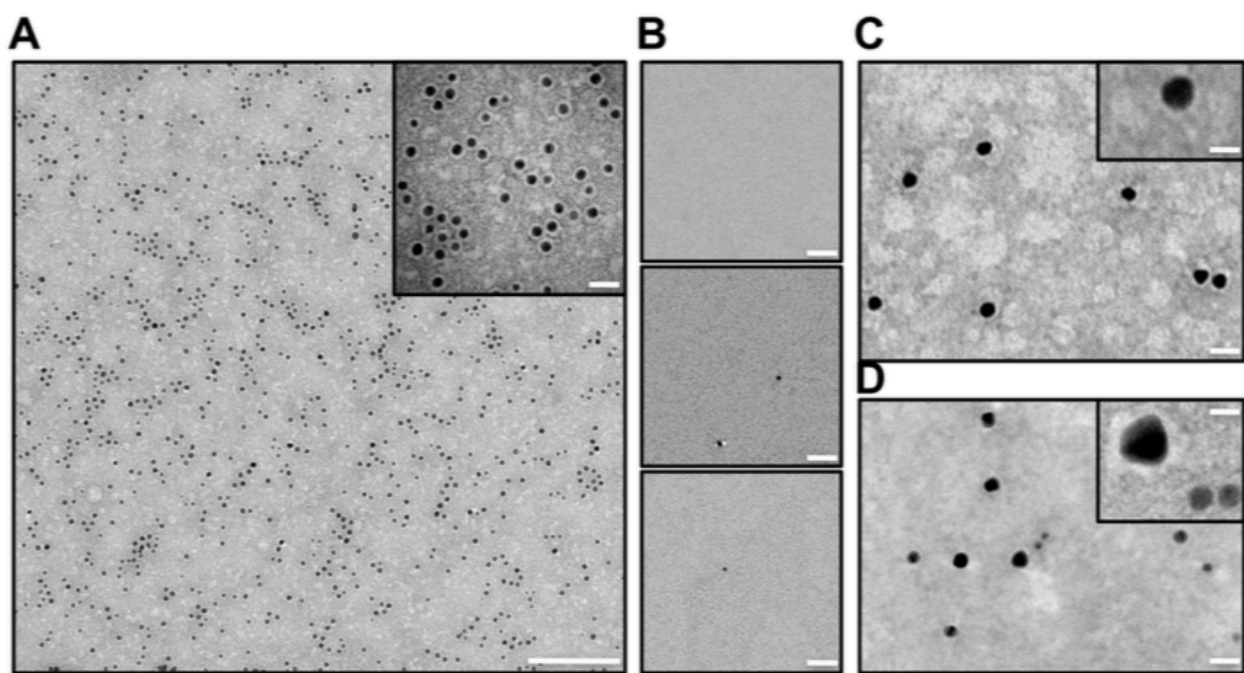


Fig. S4. Negative-stain EM gold bead labeling of the TraD-TraE complex.

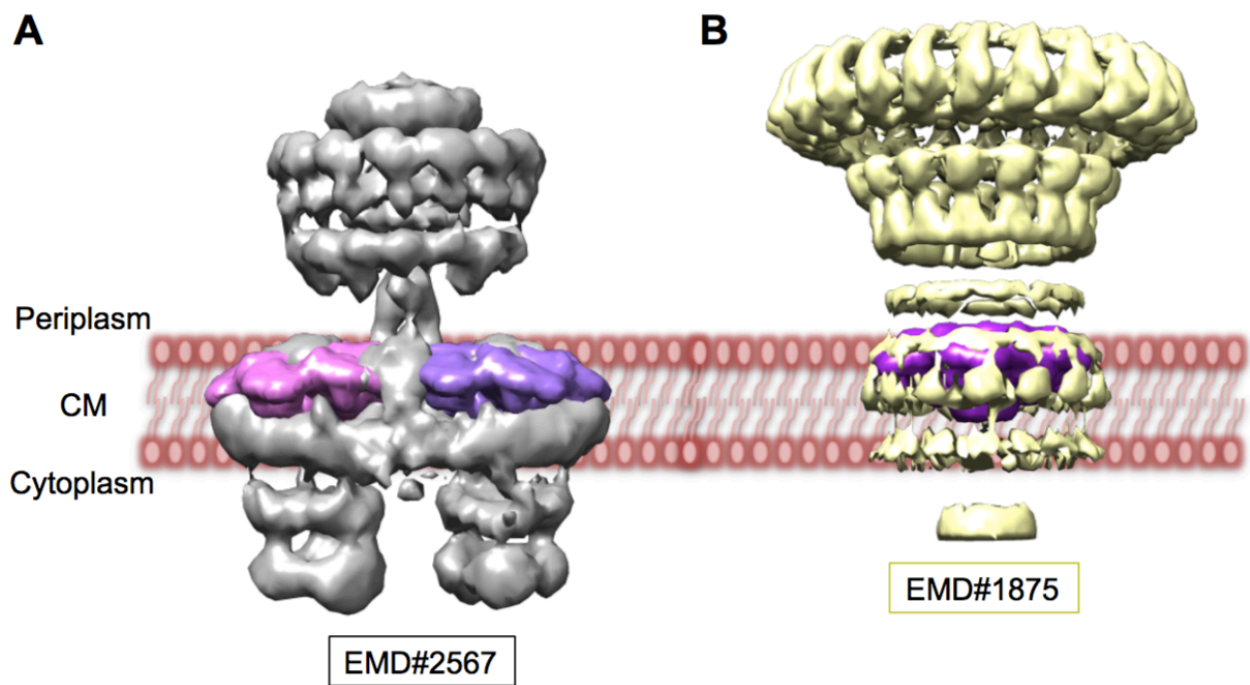


Fig. S5. Superposition of the TraE structure on T4SS and T3SS complex structures.

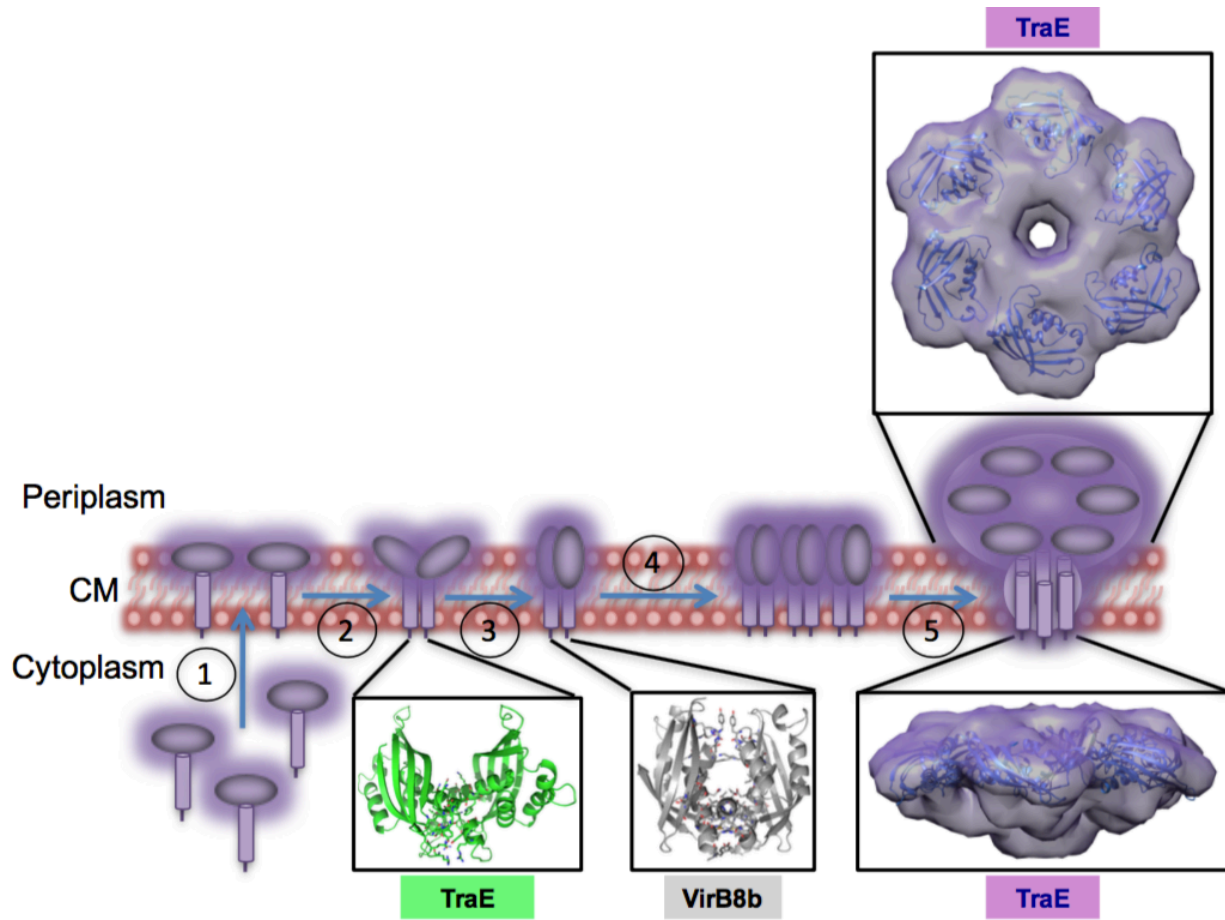


Fig. S6. Model of the assembly of VirB8-like proteins.

SI Table

Table S1. Bacterial strains and plasmids.

Strain	Genotype or Description	Source or Reference
DH5 α	<i>F</i> ⁻ Φ 80 <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</i> λ ⁻ <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
Plasmids		
pHT	kan ^r pET24d derivative T7 expression vector with N-terminal 6xHis-tag and TEV protease cleavage site	(5)
pHTVirB8b	kan ^r T7 promoter vector for the expression of 6xHis-tagged full-length domain of <i>B. suis</i> VirB8	This Work
pHTTraE	kan ^r T7 promoter vector for the expression of 6xHis-tagged full-length domain of <i>pKM101</i> TraE	This Work
pHTCagV	kan ^r T7 promoter vector for the expression of 6xHis-tagged full-length domain of <i>H. pylori</i> CagV	This Work
pHTTraD	kan ^r T7 promoter vector for the expression of 6xHis-tagged TraD from <i>pKM101</i>	This Work
pETDuetTraDTraE	amp ^r T7 promoter vector for the expression of 6xHis-tagged TraD from <i>pKM101</i> expressed from into the MCSG1 site and full-length TraE from <i>pKM101</i> expressed from the MCSG2 site	This Work

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

Sample	TraE
<i>Data collection parameters</i>	
Beamline	G1
Beam geometry (μm)	250 x 250
Wavelength (\AA)	1.245
q range (\AA^{-1})	0.008 - 0.8
Exposure time per frame (s) ^a	2
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	23

<i>Structural parameters</i>	
$I(0)$ (from Guinier) (\pm SE)	0.94E-02 \pm 0.28E-04
R_g (Å) (from Guinier) (\pm SE)	44.35 \pm 0.12
D_{max} (Å) (\pm 10% [estimated range])	137 \pm 14
χ^2 (SASREF)	1.16
Porod volume [from $P(r)$] (nm ³)	360
<i>Software employed</i>	
Primary data reduction	RAW
Data processing	PRIMUS
Modeling	GASBOR

Supplementary References:

1. Low HH, et al. (2014) Structure of a type IV secretion system. *Nature* 508(7497):550-553.
2. Schraidt O & Marlovits TC (2011) Three-dimensional model of Salmonella's needle complex at subnanometer resolution. *Science* 331(6021):1192-1195.
3. Casu B, et al. (2016) Structural analysis and inhibition of TraE from the pKM101 type IV secretion system. *J Biol. Chem.* 291:23817-23829.
4. Terradot L, et al. (2005) 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.
5. Smith MA, et al. (2012) Identification of the Binding Site of *Brucella* VirB8 Interaction Inhibitors. *Chem Biol* 19(8):1041-1048.