

Université de Montréal

Analyse structurale du pilus du système de sécrétion type IV
chez *Agrobacterium tumefaciens* et *Escherichia coli*

Par

Jaafar Amro

Département de biochimie et médecine moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur en Biochimie

option Biologie structurale

Mai 2022

© Jaafar Amro, 2022

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée

Analyse structurale du pilus du système de sécrétion type IV
chez *Agrobacterium tumefaciens* et *Escherichia coli*

Présenté par

Jaafar Amro

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

John Pascal

Président-rapporteur

Christian Baron

Directeur de recherche

Rikard Blunck

Membre du jury

Vincent Burrus

Examineur externe

Résumé

Le succès des antibiotiques à combattre les bactéries pathogènes a rendu leur utilisation excessive et sans contrôle dans plusieurs domaines, surtout dans l'agriculture et l'élevage des animaux, ce qui a favorisé l'apparition des gènes de résistance aux antibiotiques. Les bactéries résistantes aux antibiotiques représentent actuellement un problème majeur pour la santé publique et pour l'économie mondiale. Les bactéries peuvent échanger ou bien acquérir ces gènes de résistance par l'intermédiaire d'un système de sécrétion nommé type IV (T4SS). Chez les bactéries à Gram-négatif, le T4SS est composé de 12 protéines (VirB1 jusqu'à VirB11, et VirD4) qui forment un canal de translocation transmembranaire, une structure filamenteuse extracellulaire appelé pilus, et les ATPases.

Nous avons utilisé la microscopie cryo-électronique pour étudier le pilus du T4SS chez le pathogène des plantes *Agrobacterium tumefaciens* (pilus-T) et chez *Escherichia coli* provenant du plasmide conjugatif pKM101 (pilus-N). Les structures à haute résolution obtenues des pili -T et -N (3.2 Å et 3 Å respectivement) montrent qu'ils sont formés d'un assemblage sous forme hélicoïdale du complexe piline/phospholipide en une stœchiométrie de 1:1. Le lumen des pili -T et -N contient un acide aminé chargé positivement et la mutation de cet acide aminé chez *A. tumefaciens* (Arg91) entraîne une déstabilisation de la protéine et une perte de formation du pilus. La tête des phospholipides est exposée au lumen du pilus et nos résultats ont montré un effet des phospholipides sur la charge globale de l'intérieur du pilus, ce qui influence probablement le fonctionnement du pilus lors du transfert du substrat.

Le pilus est composé de la protéine piline VirB2 qui représente le composant majeure, et de la protéine VirB5 qui entre dans la composition du pilus et qui se localise sur le bout du pilus chez *A. tumefaciens*. Les protéines VirB5 font aussi partie du complexe de la membrane interne des T4SS et elles sont essentielles pour la biogenèse et l'élongation du pilus. Nous avons étudié la

protéine TraC, un homologue de VirB5 provenant du plasmide IncN pKM101 chez *E. coli*. Nous avons montré que les formes cellulaires et sécrétées de TraC sont des monomères, et nous avons détecté TraC dans des vésicules membranaires extracellulaires. En utilisant la microscopie à fluorescence à super résolution, nous avons localisé TraC sur le périmètre cellulaire et préférentiellement aux pôles. Nous avons également étudié l'effet de TraC purifiée sur l'infection des bactériophages et sur la conjugaison, vu sa localisation cellulaire et extracellulaire attachée au pilus. Aucun impact de TraC purifiée sur l'infection des bactériophages n'a été constaté, mais nous avons détecté une liaison de TraC aux cellules réceptrices et une complémentation partielle d'une souche n'exprimant pas TraC, suggérant que la protéine TraC contribue à la conjugaison.

Les études sur les T4SSs sont nécessaires pour comprendre le fonctionnement de ces systèmes dans le but de la recherche pour les inhibiteurs, qui vont ainsi limiter la propagation des gènes de résistances aux antibiotiques. De plus, le pilus du T4SS représente le site de reconnaissance et d'adsorption de plusieurs bactériophages avant d'infecter la cellule, d'où l'importance des études structurales sur les pili dans le développement d'une approche alternative pour combattre les bactéries pathogènes.

Mots-clés : Plasmides conjugatifs, conjugaison, système de sécrétion de type IV, résistance aux antibiotiques, pilus, pKM101, phospholipides, protéines de type VirB2, protéines de type VirB5, interaction protéine-protéine.

Abstract

The success of antibiotics in fighting pathogenic bacteria has made their use excessive and uncontrolled in many areas, especially in agriculture and animal husbandry, which has favored the appearance of antibiotic resistance genes. Antibiotic-resistant bacteria are currently a major global public health and an economic problem. Bacteria can exchange or acquire these resistance genes through a secretion system called type IV (T4SS). In Gram-negative bacteria, T4SS is composed of 12 proteins (VirB1 - VirB11, and VirD4) which form a transmembrane translocation channel, an extracellular filamentous structure called pilus, and ATPases.

We used cryo-electron microscopy to study the pilus of T4SS in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* (T-pilus) and in *Escherichia coli* from the conjugative plasmid pKM101 (N-pilus). The high-resolution structures obtained for the -T and -N pili (3.2 Å and 3 Å, respectively) show that they are formed from a helical assembly of the pilin/phospholipid complex in a 1:1 stoichiometry. The lumen of the -T and -N pili contains a positively charged amino acid and the mutation of this amino acid in *A. tumefaciens* (Arg91) leads to a destabilization of the protein and a loss of pilus formation. The phospholipid head is exposed to the pilus lumen and our results showed an effect of phospholipids on the overall charge of the interior of the pilus, which likely influences pilus function during substrate transfer.

The pilus is composed of the VirB2 pilin protein which represents the major component, and of the VirB5 protein, which enters into the composition of the pilus and localizes on the tip of the pilus in *A. tumefaciens*. VirB5 proteins are also part of the inner membrane complex of T4SS and are essential for the biogenesis and elongation of the pilus. We studied the TraC protein, a VirB5 homologue from the IncN pKM101 plasmid in *E. coli*. We showed that the cellular and secreted forms of TraC are monomers, and we detected TraC in extracellular membrane vesicles. Using super-resolution fluorescence microscopy, we localized TraC to the cell perimeter and preferentially to the poles. We also investigated the effect of purified TraC on bacteriophage

infection and conjugation, given its cellular and extracellular localization attached to the pilus. No impact of purified TraC on bacteriophage infection was found, but we detected binding of TraC to recipient cells and a partial complementation of a *traC* deletion strain, suggesting that TraC protein contributes to the conjugation.

Studies on T4SSs are necessary to understand the functioning of these systems in order to search for inhibitors, which will thus limit the spread of antibiotic resistance genes. In addition, the pilus of T4SS represents the site of recognition and adsorption of several bacteriophages before infecting the cell, hence the importance of structural studies on pili in the development of an alternative approach to combat pathogenic bacteria.

Keywords: Conjugative plasmids, conjugation, type IV secretion system, antibiotic resistance, pilus, pKM101, phospholipids, VirB2-like proteins, VirB5-like proteins, protein-protein interaction.

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	ix
Remerciements.....	xii
Chapitre 1 – Introduction.....	1
1.1 La résistance aux antibiotiques.....	1
1.2 Les systèmes de sécrétion de type IV (T4SSs).....	4
1.2.1 Classification des T4SSs.....	5
1.2.1.1 Classification type IVA et IVB	5
1.2.1.2 Classification fonctionnelle	6
1.2.1.3 Classification par incompatibilité des plasmides	8
1.2.2 Composition et architecture des T4SSs.....	11
1.2.2.1 Les ATPases	11
1.2.2.2 Le complexe de la membrane interne (IMC)	13
1.2.2.3 Le complexe de la membrane externe (OMC)	15
1.2.2.4 La protéine VirB1	18
1.2.2.5 Les protéines du pilus	19
1.2.3 Mécanisme d'assemblage des T4SSs	19
1.2.4 Mécanisme de transfert des substrats.....	23
1.2.4.1 Le transfert durant la conjugaison	23

1.2.4.2 Le transfert des protéines effectrices	26
1.3 Le pilus des T4SSs.....	27
1.3.1 La biogenèse du pilus des T4SSs	28
1.3.2 La structure du pilus conjugatif.....	31
1.3.3 Les bactériophages spécifiques au pilus conjugatif	33
1.4 Les protéines VirB5	36
1.5 Le T4SS chez <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
1.6 Inhibition des systèmes de sécrétion de type IV.....	42
1.7 Objectifs de la thèse	45
1.8 Justification de la méthodologie	47
Chapitre 2 – Article 1	51
Chapitre 3 – Article 2	94
Chapitre 4 – Discussion	131
Conclusion	142
Bibliographie.....	143

Liste des tableaux

Tableau 1. – Exemples des molécules inhibitrices des T4SSs.....	44
---	----

Liste des figures

Figure 1. –	L'émergence de la résistance aux antibiotiques.	2
Figure 2. –	Estimation du nombre de décès par la résistance aux antimicrobiens.....	3
Figure 3. –	Représentation schématique des T4ASS et T4BSS.....	6
Figure 4. –	Les diverses fonctions des T4SSs.....	8
Figure 5. –	La conservation des gènes codants pour les T4SSs de type P, F et I.....	10
Figure 6. –	Architecture et composition du T4ASS.	12
Figure 7. –	La structure <i>in vivo</i> des T4SSs des plasmides pKM101 et F.	16
Figure 8. –	La structure de l'OMC du plasmide pKM101	18
Figure 9. –	Modèle du mécanisme de l'assemblage du T4ASS	22
Figure 10. –	Mécanisme de sécrétion du substrat à travers le T4SS du plasmide F.	24
Figure 11. –	La voie de translocation de l'ADN-T par le T4SS chez <i>A. tumefaciens</i>	26
Figure 12. –	Mécanisme de la maturation de la piline TraA.	29
Figure 13. –	Modèle de la biogenèse du pilus F.....	32
Figure 14. –	Architecture du pilus F.	34
Figure 15. –	Adhésion des phages MS2 au pilus F.	35
Figure 16. –	Détection de VirB5 au pilus et à la surface cellulaire.....	37
Figure 17. –	Représentation en ruban de la structure cristallographique de TraC.....	39
Figure 18. –	Représentation schématique de la régulation du T4SS chez <i>A. tumefaciens</i>	41

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

A. tumefaciens : *Agrobacterium tumefaciens*

AS: Acétosyringone

Brucella spp. : *Brucella* species

Cag : Cytotoxin associated gene

Cryo-EM : Cryo-Electron Microscopy

DSS : Disuccinimidyl Suberate

Dot/Icm : Defective in organelle trafficking / Intracellular multiplication

E. coli : *Escherichia coli*

EMDB : Electron Microscopy Data Bank

H. pylori : *Helicobacter pylori*

ICE : Integrative and conjugative elements

Inc : Incompatibility group

L. pneumophila : *Legionella pneumophila*

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

OMS : Organisation mondiale de la Santé

PDB : Protein Data Bank

pH : Potentiel hydrogène

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

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis

SIM : Structural illumination microscopy

Tra : Transfert

T4ASS : système de sécrétion de type IVA

T4BSS : système de sécrétion de type IVB

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

T4SS : système de sécrétion de type IV

TrIP : Transfer DNA immunoprecipitation - Immunoprécipitation de l'ADN-T

Vir : Virulence

Je n'ai pas échoué. J'ai juste trouvé 10 000 solutions qui ne fonctionnent pas.

Thomas Edison

À ma famille et mes amis.

Remerciements

Ce travail de doctorat n'a pas pu être réalisé sans la contribution et le soutien d'un grand nombre de personnes qui 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 accueilli au sein de son laboratoire. En dirigeant ce travail, il m'a initié à la recherche et m'a fait bénéficier de ses compétences et de son esprit d'analyse, tout en me laissant une grande autonomie.

J'adresse également mes sincères remerciements aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens à remercier tous les collaborateurs scientifiques qui m'ont aidé à mener à bien ce doctorat : Dr. Khanh Huy Bui et Corbin Black de l'université McGill, Dr. Matthieu Ruiz et Caroline Daneault de l'institut de cardiologie de Montréal. Je remercie également Dr. Antonio Nanci et Aurélien Fouillen pour l'accès à la plateforme de microscopie électronique ainsi que pour leur soutien scientifique. Je remercie également Dr. Nicolas Stifani et Monique Vasseur de la plateforme de microscopie à fluorescence, pour leur conseil et aide précieuse dans le cadre du travail. Je les remercie également pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Merci à tous les employés du département de biochimie et médecine moléculaire, qui nous apportent une aide considérable tout au long de notre doctorat.

Je suis très reconnaissant envers les membres de mon laboratoire, passés et présents, avec qui j'ai partagé des années très importantes de ma vie. Un lieu où tout le monde se sent très proche grâce aux nombreuses sorties, aux séminaires internes et aux anecdotes venant de tous les coins du monde. Je pense notamment à Zakaria, Bastien, Charline, Flore, Benoit, Mahzad, Tarun, Nathan, Claire, Vijay et Véronique.

Et finalement, je tiens à remercier ceux qui prennent une place très importante, mes parents, ma famille et mes amis qui ont toujours été mes meilleurs supports pendant toute ma vie.

Chapitre 1 – Introduction

1.1 La résistance aux antibiotiques

La découverte des antibiotiques dans les années 1940, représente une avancée médicale majeure qui a transformé la médecine. Les antibiotiques ont montré une efficacité remarquable contre les infections bactériennes, sauvant des millions de vies chaque année. La plupart de ces molécules antimicrobiennes sont produites naturellement par des micro-organismes, notamment des champignons et des bactéries (i.e. pénicilline, streptomycine), ou bien de leurs dérivés (exemple: ampicilline, méticilline), et peu sont entièrement synthétiques (i.e. les sulfamides et les fluoroquinolones) (1). Aujourd'hui, l'abondance des antibiotiques a rendu leur utilisation très répandue et souvent sans contrôle, surtout dans l'agriculture et l'élevage des animaux. La majorité des antibiotiques vendus aux États-Unis (70%) sont pour usage sur les animaux (2). Alors qu'il y a près de 20 familles d'antibiotiques (3), leur utilisation inappropriée a favorisé une sélection des bactéries de plus en plus résistantes aux différentes classes d'antibiotiques existants (Fig. 1) (4).

Les gènes de résistances aux antibiotiques existent depuis des centaines de millions d'années (i.e. les enzymes β -lactamases) grâce aux mécanismes d'évolutions naturelles des bactéries en présence de nombreuses substances toxiques dans leurs milieux de vie (5), bien avant la découverte du premier antibiotique. Généralement, ces gènes de résistance codent pour des protéines permettant : 1- d'empêcher l'entrée des molécules antimicrobiennes dans la bactérie, 2- de favoriser leur exportation en dehors de la cellule, 3- leur destruction ou bien 4- leur modification, ainsi que 5- la modification de leurs cibles (6).

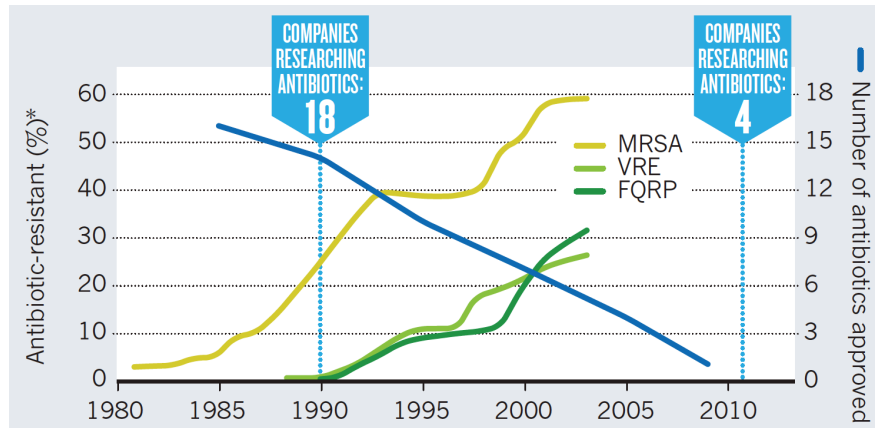


Figure 1. – L'émergence de la résistance aux antibiotiques.

Représentation graphique du pourcentage d'isolats cliniques résistants aux antibiotiques et le nombre des antibiotiques approuvés, entre les années 1980 et 2010. MRSA, *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline. VRE, *Enterococcus* résistantes à la vancomycine. FQRP, *Pseudomonas aeruginosa* résistantes aux fluoroquinolones. Figure adaptée de (7).

L'utilisation excessive des antibiotiques par l'homme a créé une forte pression sélective sur les bactéries, ce qui a accéléré le processus du développement de la résistance aux différentes molécules antimicrobiennes. La consommation mondiale d'antibiotiques a augmenté de 36% entre les années 2000 et 2010 (8). Effectivement, 30% des isolats des bactéries pathogènes en 2019 étaient résistants aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de troisième génération (9), et actuellement, les infections causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques constituent une menace majeure pour la santé publique mondiale (2). En Europe, les pathogènes résistants ont été à l'origine de plus de 280,000 décès en 2019, et à l'échelle mondiale, le nombre des victimes a été estimé à 5 millions (9). Ce nombre pourrait augmenter à 10 millions par an vers 2050, avec un coût annuel de 100,000 milliards de dollars (Fig. 2) (2, 10).

La lutte contre la résistance aux antibiotiques est l'un des plus grands défis confrontant les soins de santé mondiaux. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plusieurs mesures sont nécessaires pour maintenir l'efficacité des antibiotiques, telles que la réglementation renforcée de l'utilisation des antibiotiques, l'amélioration de l'hygiène chez le public et dans les milieux

hospitaliers pour limiter la propagation des infections, ainsi que l'investissement à grande échelle pour la recherche des nouveaux antimicrobiens (Fig. 2) (2).

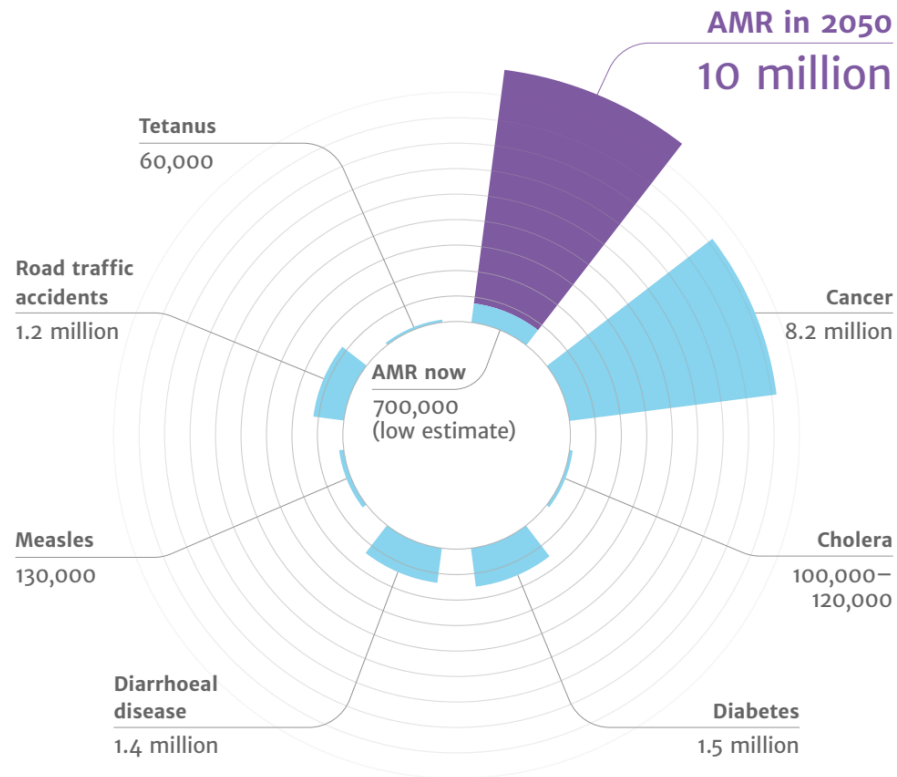


Figure 2. – Estimation du nombre de décès par la résistance aux antimicrobiens.

Représentation schématique du nombre de décès par la résistance aux antimicrobiens (AMR) en 2016, avec une estimation de ce nombre en 2050 si la situation ne change pas. Le nombre de décès par les principales maladies en 2016 est aussi indiqué. Figure adaptée de (2).

Les bactéries ont développé plusieurs stratégies convenables pour contourner les nombreux facteurs qu'elles subissent dans leurs environnements. Par exemple, elles pourraient acquérir la résistance aux antibiotiques par des mutations chromosomiques qui altèrent les cibles directes des antibiotiques, ou bien via la réception des gènes de résistance de l'extérieur. Cette dernière pourrait avoir lieu par : 1- une transformation par absorption de l'ADN extracellulaire, 2- une transduction par des bactériophages, ou bien 3- une conjugaison par transfert direct des matériels génétiques à partir d'une autre bactérie (11). La conjugaison permet aux bactéries

d'avoir des échanges efficaces des matériels génétiques souvent bénéfiques à leur survie. Ce phénomène joue un rôle important dans la dissémination des gènes de résistances et dans l'apparition des « *superbugs* » ; les bactéries résistantes à tous les antibiotiques disponibles (12) (13).

Un blocage de la conjugaison entre les bactéries permettrait de réduire la vitesse de propagation des gènes de résistance et de prolonger par la suite la durée de vie des antibiotiques. De plus, cette approche qui ne touche pas aux fonctions vitales intrinsèques de la bactérie permet d'éviter le développement encore une fois de la résistance (14). Au niveau moléculaire, la conjugaison chez les bactéries est assurée par un système de sécrétion appelé de type IV (T4SS). En plus de la conjugaison, certaines bactéries utilisent les T4SSs pour injecter des protéines effectrices dans leurs milieux hôtes ou bien directement dans les cellules cibles (15). Étudier les T4SSs est indispensable afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de ces systèmes au cours de la propagation des gènes des résistances aux antibiotiques.

1.2 Les systèmes de sécrétion de type IV (T4SSs)

La pathogénicité de la plupart des bactéries, ainsi que d'autres fonctions qui maintiennent leur adaptation à un milieu hôte, sont assurées par l'intermédiaire des systèmes de sécrétion (16). Les substrats sécrétés, qui peuvent être de l'ADN ou bien des protéines et des molécules effectrices, se trouvent exposés à la surface cellulaire, libérés dans le milieu extracellulaire ou bien injectés directement dans les cellules cibles (17).

Les T4SSs sont parmi les systèmes de sécrétion qui se trouvent chez les bactéries à Gram-négatif et les bactéries à Gram-positif (18). Ils traversent la membrane interne et externe et ils sont uniques par leur pouvoir de sécréter à la fois de l'ADN et des protéines effectrices. Certaines bactéries pathogènes utilisent les T4SSs comme : *Legionella pneumophila* (la légionellose), *Coxiella burnetti* (la fièvre Q), *Helicobacter pylori* (ulcère de l'estomac) et *Agrobacterium tumefaciens* (responsable de la formation des tumeurs chez les plantes), mais le rôle le plus répandu des T4SSs reste le transfert de l'ADN entre les bactéries, et surtout la dissémination des

gènes de résistance aux antibiotiques (19-22). De plus, certains T4SSs peuvent servir à capter et absorber de l'ADN du milieu extracellulaire ce qui contribue à l'évolution génomique (23).

Selon la nomenclature chez *Agrobacterium tumefaciens*, les T4SSs les plus simples sont généralement composés de 12 protéines, nommées VirB1 à VirB11 et VirD4 (VirB/D4) (18). Les sections suivantes discutent en détailles les fonctions, la composition et l'architecture des T4SSs pour mettre en contexte les projets de recherche présentés dans cette thèse qui visent à améliorer la connaissance sur les T4SSs.

1.2.1 Classification des T4SSs

Les T4SSs sont structurellement et fonctionnellement très variés. Ils ont évolué à travers le temps et les différentes populations bactériennes, pour leurs permettre à s'adapter à diverses situations. Pour cela, il existe plusieurs classifications qui regroupent les T4SSs selon leurs phylogénie, leurs complexité ou bien leurs fonction (19).

1.2.1.1 Classification type IVA et IVB

Les T4SSs se divisent en deux sous-groupes, nommés types A (T4ASSs) et types B (T4BSSs), selon la complexité et la similarité de leurs compositions.

Le type A représenté par le T4SS VirB/D4 d'*A. tumefaciens*, une bactérie pathogène des plantes, est considéré comme la forme la plus simple. Ce type regroupe aussi les T4SSs des plasmides conjugatifs pKM101, R388 et RP4 (24). Généralement, les T4ASSs sont composés de 12 sous-unités, VirB1-VirB11 et VirD4, qui forment le canal de transfert et le pilus sur la surface de la cellule, et une relaxosome responsable de la préparation et du recrutement des substrats (Fig. 3). En plus des orthologues de ces 12 sous-unité, le T4SS du plasmide conjugatif F et le T4SS Cag (Cytotoxin-associated genes) d'*H. pylori* possèdent plusieurs sous-unités supplémentaires pour leur propre fonctionnement (25).

Les T4SSs type B (T4BSSs) sont plus complexes et ils nécessitent beaucoup plus des protéines pour leur assemblage. Ils sont représentés par le T4SS Dot/Icm (*Defective for organelle trafficking / Intracellular multiplication*) de *Legionella pneumophila*, et sont présents chez plusieurs autres bactéries pathogènes comme *Coxiella burnetii* et *Rickettsiella grylli* (26). Les T4BSS sont

composés d'environ 25 protéines qui présentent très peu de similarité de séquence avec les 12 protéines des T4ASSs, et ils sont utilisés pour la sécrétion de plus de 300 protéines effectrices responsables pour la survie des plusieurs pathogènes dans les cellules eucaryotes (27). Les plasmides conjugatifs R64 et Collb-P9 sont considérés parmi les T4BSS qui assurent le transfert des matériels génétiques dans les cellules hôtes (Fig. 3) (28)

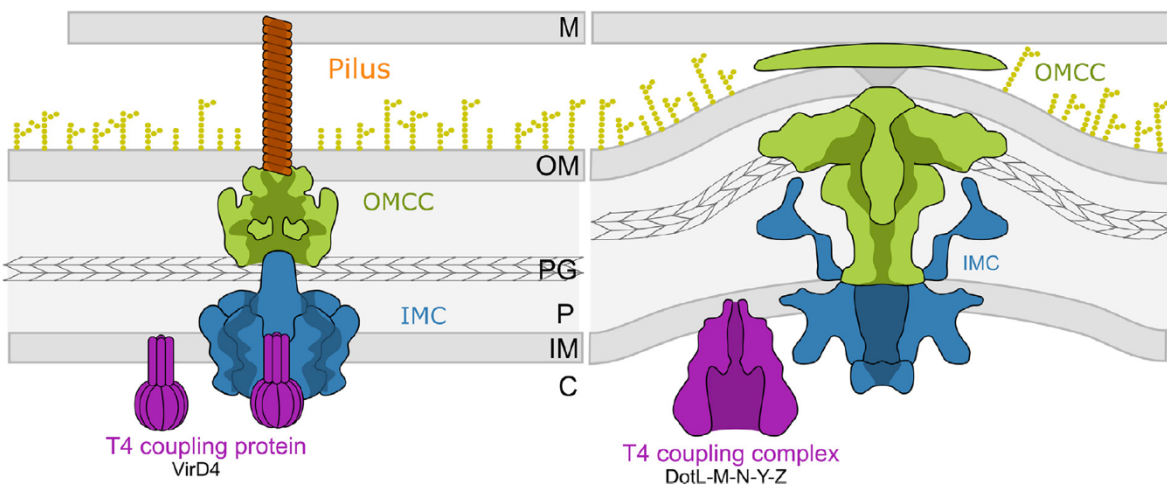


Figure 3. – Représentation schématique des T4ASS et T4BSS.

Illustration de la vue latérale du T4ASS chez *A. tumefaciens* (à gauche) et du T4BSS chez *L. pneumophila* (à droite). Les deux modèles sont basés sur structures obtenues par cristallographie et cryo-EM. M = la membrane de la cellule cible, OM = la membrane externe ; P = le périplasme ; IM = la membrane interne ; C = le cytosol. Figure adaptée de (29).

1.2.1.2 Classification fonctionnelle

Les T4SSs ont été étudié depuis la découverte de la conjugaison chez les *E. coli* il y 70 ans (30). Depuis, les T4SSs ont été trouvés responsables de trois fonctions chez les bactéries : 1- le transfert de l'ADN entre les bactéries par conjugaison, 2- l'absorption ou bien la libération de l'ADN dans

le milieu extracellulaire et 3- la sécrétion des nucléoprotéines et des protéines effectrices dans les cellules cibles (Fig. 4) (31).

La conjugaison représente la fonction la plus répandue des T4SSs, durant laquelle des matériels génétiques seront transférés dans un sens unique d'une bactérie donneuse à une autre receveuse après un contact direct (32). Ce phénomène est assuré par des plasmides conjugatifs ou bien des éléments intégratifs et conjugatifs (ICE, *integrative and conjugative elements*), et les matériels génétiques transférés sont souvent bénéfiques pour la survie des bactéries receveuses, comme les gènes de résistance aux antibiotiques (33, 34). Celles-ci incluent les plasmides conjugatifs qui assurent leur propre transfert en codant pour les différents composants du T4SS, d'autres éléments génétiques extrachromosomiques ou bien de l'ADN chromosomique. En outre, le plasmide pTi chez *A. tumefaciens*, et les plasmides conjugatifs F, pKM101, R388 et RP4, se trouvent dans cette catégorie (35-37).

L'échange de l'ADN avec le milieu extracellulaire par l'intermédiaire des T4SSs existe aussi sans le besoin d'un contact direct. Ce phénomène de libération ou bien d'absorption de l'ADN se trouve chez plusieurs bactéries pathogènes, comme chez *Neisseria gonorrhoeae* (libération) et le T4SS ComB chez *H. pylori* (absorption) (38) (39).

La virulence de plusieurs bactéries est directement reliée à la présence des T4SSs qui permettent la sécrétion des protéines effectrices souvent directement dans le cytoplasme des cellules procaryotes et eucaryotes. La bactérie pathogène des plantes *Xanthomonas citri* et la pathogène de l'homme *Stenotrophomonas maltophilia* injectent des protéines toxiques dans le cytoplasme des bactéries cibles concurrentes provoquant leur mort (40, 41). Les protéines effectrices souvent perturbent les processus physiologiques de la cellule hôte, permettant la colonisation et la propagation des bactéries pathogènes. Chez l'homme, plusieurs maladies sont reliées à des protéines effectrices sécrétés par les T4SSs, comme : la coqueluche (*Bordetella pertussis*), la brucellose (*Brucella spp.*), la légionellose (*L. pneumophila*) la coxiellose (*C. burnetii*) et l'ulcère et le cancer de l'estomac (*H. pylori*) (19, 28, 42).

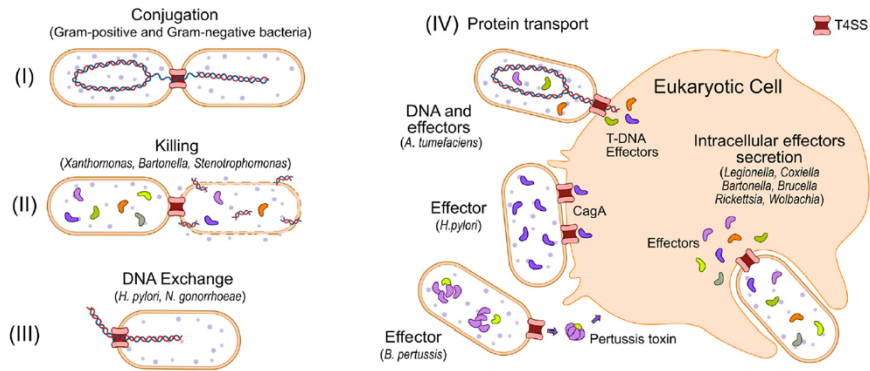


Figure 4. – Les diverses fonctions des T4SSs.

Représentation schématique des diverses fonctions du T4SS telles que (I) la translocation de l'ADN vers une cellule bactérienne receveuse (la conjugaison), (II) l'injection des protéines effectrices dans une cellule bactérienne voisine (destruction bactérienne), (III) l'importation/exportation d'ADN dans le milieu extracellulaire, et (IV) la translocation d'ADN ou des protéines effectrices dans une cellule eucaryote cible. Figure adaptée de (29).

1.2.1.3 Classification par incompatibilité des plasmides

L'incompatibilité plasmidique se définit par l'incapacité de deux plasmides à coexister de manière stable pendant un certain nombre de générations dans la même lignée cellulaire bactérienne. La raison la plus fréquente pour deux plasmides étant incompatibles, c'est qu'ils partagent un ou plusieurs éléments responsables de leur propre réplication, ou bien à cause d'une perturbation du contrôle sur le nombre de leurs copies dans la cellule (43). Les plasmides incompatibles sont placés dans le même groupe et il existe des systèmes de classification bien établis pour certains hôtes où les tests d'incompatibilité ont été effectués. Du point de vue historique, la conjugaison était la fonction principale des T4SSs, et donc un classement de ces systèmes de sécrétion a été proposé selon l'incompatibilité des plasmides conjuguatifs. Les T4SSs d'un même groupe d'incompatibilité partagent certaines caractéristiques, notamment la morphologie du pilus qui représentait la seule structure visible des T4SSs par microscopie électronique (35, 44). Dans ce classement on trouve les T4SSs de type F, P et I (Fig. 5).

Les T4SSs de type F se distinguent par un pilus long (jusqu'à 20 μm), flexible et rétractable, et ils transfèrent principalement de l'ADN. Les groupes d'incompatibilités IncF, IncH, IncT et la famille SXT/R391 des éléments intégratifs et conjugatifs (ICE) (autrefois considérés d'être des plasmides de groupe IncJ (45)) sont parmi les T4SSs de type F, et l'exemple le plus étudié parmi ce groupe est celui du plasmide conjugatif F chez *E. coli* (46-48).

Par contre, les T4SSs de type P possèdent un pilus plus court ($< 1 \mu\text{m}$) et rigide, peu efficace pour la conjugaison en milieu liquide. Ils incluent les plasmides conjugatifs IncP, IncN et IncW. Les plasmides Ti (chez *A. tumefaciens*), IncN pKM101 et IncW R388 (chez *E. coli*) représentent les exemples les mieux étudiés de ce groupe (35).

Les T4SSs de type I sont représentés par le plasmide IncII R64 et ils expriment les deux types de pilus du groupe F et P. Ils sont efficaces en milieu liquide et solide et ils sécrètent plusieurs facteurs de virulence (49).

Dans cette thèse nous étudions le T4SS chez *A. tumefaciens* et *E. coli*, et donc le reste de l'introduction décrit les T4SSs chez les bactéries à Gram-négatif.



Figure 5. – La conservation des gènes codants pour les T4SSs de type P, F et I.

Le système VirB/VirD4 chez *A. tumefaciens* est considéré le système de référence. La fonction enzymatique et la localisation de chaque sous unité sont indiquées au-dessus de chaque gène. Les gènes liés aux système VirB/VirD4 sont codés par couleur. Pour le type F, les gènes codant pour le pilus F et sa rétraction sont colorés en gris sombre, et ceux responsables pour la stabilisation de la jonction durant la conjugaison ou bien pour l'exclusion de surface sont colorés en gris clair. Les lettres en majuscules sont des gènes *tra*, les lettres en minuscules sont des gènes *trb*. Les gènes uniques aux systèmes de type I codant pour les protéines de la membrane interne sont en beige, et les gènes codant pour des sous-unités qui interagissent fonctionnellement avec la protéine de couplage DotL T4CP sont en violet clair.

IMC = le complexe de la membrane interne ; OMC = le complexe de la membrane externe ; PG = peptidoglycane. Figure adaptée de (18)

1.2.2 Composition et architecture des T4SSs

Les T4SSs sont des larges complexes protéiques qui traversent la membrane des bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif. La nomenclature de ses composants est assez diversifiée selon les souches bactériennes et les plasmides codant pour ce système (50). Le T4SS VirB/VirD4 chez *A. tumefaciens* est l'un des plus étudiés, et il est considéré le modèle représentant tous les T4SSs (51). Chez les bactéries à Gram-négatif les T4SSs sont constitués de 12 protéines qui représentent quatre parties principales : 1- la protéine de couplage VirD4 ou bien T4CP (*type IV coupling protein*), 2- le complexe de la membrane interne IMC (*inner membrane complex*), composé des protéines VirB3, VirB4, VirB6, VirB8 et VirB11, 3- le complexe de la membrane externe OMC (*outer membrane complex*) composé des protéines VirB7, VirB9 et VirB10, 4- le pilus sur la surface de la cellule formé principalement de la protéine piline VirB2 et un composant mineur, la protéine VirB5, localisée sur le bout du pilus (52). IMC et OMC sont reliés par une structure en forme de tige de composition inconnue, et ils forment le canal transmembranaire responsable du transfert des substrats (53). L'hydrolase VirB1 facilite l'assemblage du T4SS dans la membrane par son activité de dégradation de la couche de peptidoglycanes (Fig. 6) (54).

1.2.2.1 Les ATPases

Les T4SSs possèdent trois ATPases : VirB4, VirB11 et VirD4, qui fournissent l'énergie nécessaire pour l'assemblage et le fonctionnement du T4SS.

-VirB4 : est l'ATPase la plus conservée et elle est essentielle pour la fonction du T4SS et la formation du pilus (55). Généralement, VirB4 est localisée dans la membrane interne avec plusieurs domaines transmembranaires (polytopique), mais elle existe aussi sous forme soluble, comme la protéine VirB4/TrwK du plasmide R388 (56-58). VirB4 interagit avec plusieurs composants du T4SS, comme VirB3, VirB8, VirB10, VirB11, VirD4 et aussi avec des substrats (59). L'état oligomérique de VirB4 n'est pas bien défini, et des formes monomériques, dimériques et hexamériques ont déjà été observés (58, 60, 61). La résolution de la structure par microscopie

électronique du complexe purifié regroupant les dix protéines VirB du T4SS, VirB3 à VirB10 (VirB₃₋₁₀), provenant du plasmide R388, a donné plus de détails concernant la position et l'oligomérisation de VirB4 dans le T4SS (Fig. 6) (53). Cette structure, qui représente la partie transmembranaire entière du T4SS, montre l'assemblage de VirB4 en trimères de dimères qui forment deux tonneaux, chacun contenant six copies de VirB4 (12 copies en totale). La structure du complexe VirB₃₋₁₀ montre aussi que le coté N-terminal de VirB4 se trouve dans la membrane interne et que son coté C-terminal est positionné dans le cytoplasme (53). La structure *in vivo* du T4SS pour les plasmides conjugatifs F et pKM101 a été récemment résolue par cryo-tomographie électronique. La structure montre la présence de six dimères de VirB4 en forme d'un anneau situé dans la partie cytoplasmique de l'IMC (Fig. 7) (62, 63).

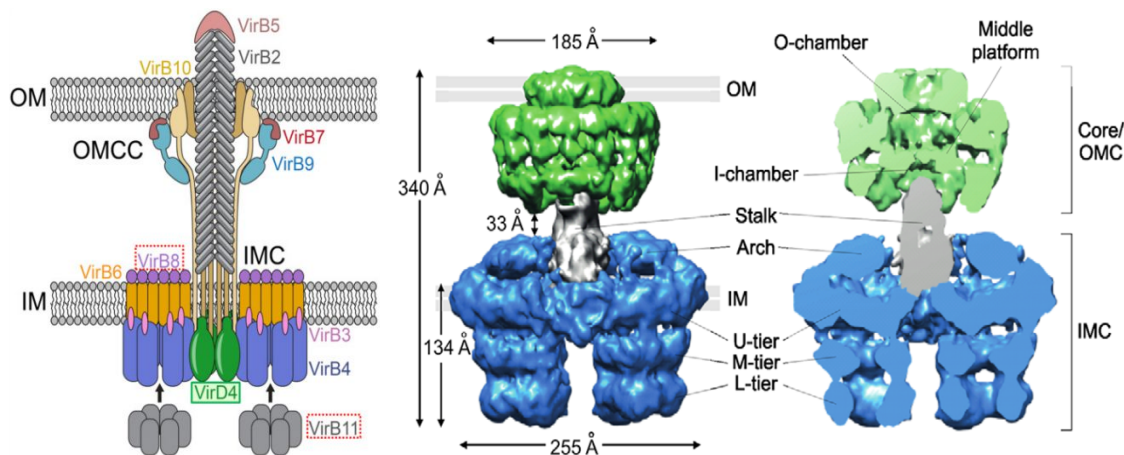


Figure 6. – Architecture et composition du T4ASS.

(A) Représentation schématique du T4ASS montrant l'emplacement de chaque VirB/VirD4 sous unité. Les flèches représentent les interactions dynamiques de la protéine VirB11 durant la conjugaison. (B) Reconstruction de la structure du complexe VirB₃₋₁₀ T4SS du plasmide R388 par microscopie électronique en coloration négative (EMD-2557), montrant le OMC (en vert) le IMC (en bleu) et la tige (en gris). OM, la membrane externe ; IM, la membrane externe ; OMCC, le noyau du complexe de la membrane externe ; IMC, le complexe de la membrane interne ; U-tier, la partie supérieure ; M-tier, la partie moyenne ; L-tier, la partie inférieure. Figure adaptée de (64) (A) et (36) (B).

-VirB11 : est une ATPase essentielle pour la formation du T4SS et le transfert des substrats (65). Elle se localise dans le cytoplasme en association avec la membrane interne et interagit avec les deux autres ATPases VirB4 et VirD4 (66). Son activité d'hydrolyse d'ATP augmente à la suite de l'interaction avec les phospholipides (66). La structure cristallographique de plusieurs homologues de VirB11 (*CagA* d'*H. pylori* et VirB11 de *B. suis*) montre qu'elle forme un hexamère et que le dynamique de son assemblage est régulé par son activité d'hydrolyse de l'ATP (67, 68).

-VirD4 : se trouve dans presque tous les T4SSs, et l'existence des gènes codants pour des homologues des VirD4 dans un génome donné pourrait être un indice de la présence des T4SSs (69). VirD4 est considérée la protéine de couplage du T4SS, ou bien T4CP (Type IV Coupling Protein) vue son rôle dans le recrutement des substrats vers le T4SS (70, 71). En générale, T4CP est localisée dans la membrane interne et possède un domaine transmembranaire du côté N-terminal, essentiel pour la stabilité de son activité (72), et un domaine cytoplasmique du côté C-terminal responsable de la reconnaissance et la liaison avec les substrats en plus de l'activité d'hydrolyse d'ATP pour fournir l'énergie nécessaire pour le transfert des substrats à travers le T4SS (72-74). VirD4 n'est pas nécessaire pour la formation du pilus, et la structure de TrwB du plasmide R388, la protéine la plus étudiée parmi les homologues de VirD4, montre qu'elle forme un hexamère (75, 76). Récemment, la structure du complexe VirB₃₋₁₀ + VirD4 du plasmide R388 a été résolue par microscopie électronique. Contrairement à VirB11, la structure de VirD4 n'a pas montré un hexamère, mais plutôt deux dimères qui se localisent entre les deux tonneaux formés par VirB4 (77). Néanmoins, VirD4 peut former des hexamères seulement en présence de l'ADN, et donc la différence dans l'état d'oligomérisation observée peut être expliqué par l'absence de l'ADN du complexe purifié (77, 78).

1.2.2.2 Le complexe de la membrane interne (IMC)

En plus des ATPases VirB4, VirB11 et VirD4, l'IMC est formé des protéines VirB3, VirB6 et VirB8 (55). La structure du complexe purifié VirB₃₋₁₀ du plasmide R388 révèle une forme d'arche constitué de 12 copies de VirB3, VirB4, VirB5, VirB8, et 24 copies de VirB6. VirB10, qui est un

composant majeur du complexe de la membrane externe, entre aussi dans la composition de l'IMC par son extrémité N-terminale en 14 copies (79, 80). L'arche se localise en dessus des deux tonneaux formés par des hexamères de VirB4 (Fig. 6) (53).

-VirB3 : est une des protéines les moins étudiées parmi les composants du T4SS. VirB3 se localise dans la membrane interne avec deux extrémités cytoplasmiques, et elle joue un rôle dans la stabilisation de VirB4, VirB6, VirB7 et VirB8 (81, 82). VirB3 interagit avec VirB5, et contribue à l'insertion de VirB4 dans la membrane interne (53, 83).

-VirB6 : est composée de 5 ou plus domaines transmembranaires traversant la membrane interne, et une boucle périplasmique qui interagit avec l'ADN transféré et possiblement avec VirB8 (84). Son extrémité N-terminale se situe dans le périplasme alors que son extrémité C-terminale se trouve dans le cytoplasme favorisant une interaction avec VirB6. Cette interaction est essentielle pour le transfert des substrats à travers le T4SS et pour le recrutement de VirB2 et VirB5 durant l'assemblage du pilus (85-87). VirB6 stabilise VirB5 et affecte l'état multimérique de VirB7 et VirB9 (81, 88).

-VirB8 est une protéine transmembranaire nécessaire pour l'activité du T4SS. Elle est composée d'un domaine transmembranaire, une courte extrémité N-terminale cytoplasmique et une longue extrémité périplasmique (89-91). L'interaction de VirB8 avec la majorité des autres composants du T4SS (VirB1, VirB4, VirB5, VirB6, VirB9, VirB10 et VirB11) indique son rôle essentiel dans l'assemblage du T4SS au niveau de la membrane interne (84, 89, 91-96). Les structures du domaine périplasmique de plusieurs protéines de la famille de VirB8 montrent que ce domaine conserve la même structure formée de plusieurs feuillets beta et 5 hélices alpha (97-101). VirB8 généralement forme un dimère, et le site de dimérisation représente la cible pour plusieurs molécules inhibitrices (102-104). Une étude récente a montré que TraE du plasmide conjugatif pKM101 (homologue de VirB8) forme un hexamère lorsqu'elle est exprimée sous sa forme entière (105), et que la structure *in vivo* du T4SS pour le plasmides pKM101 identifie une densité sous forme d'un collier dans la partie périplasmique de l'IMC convenable à un hexamère de TraE (Fig. 7) (62). Cette différence dans l'état d'oligomérisation entre la forme entière de TraE et son

domaine périplasmique seul indique l'importance du domaine transmembranaire et cytoplasmique dans l'assemblage et la fonction de TraE (105).

1.2.2.3 Le complexe de la membrane externe (OMC)

Appelé aussi le complexe central, l'OMC est composé de 14 copies des protéines VirB7, VirB9 et VirB10, qui forment deux anneaux superposés : la couche externe O (*outer*) et la couche interne I (*intern*). La couche externe O est composée de l'extrémité C – terminale de VirB10 et de VirB9, et de la petite protéine VirB7 qui se situe sur la surface externe de VirB9 (Fig. 8). VirB10 possède deux hélices dans son extrémité C-terminale qui se projettent vers l'extérieure de la couche O. Les deux hélices, appelées aussi des antennes AP (*antennae projection*), provenant de 14 copies de VirB10 forme un canal hélicoïdale associé à la membrane externe. La couche interne I est formée par l'extrémité N-terminale de VirB9 entourée par le domaine N-terminal allongé de VirB10 qui s'étend jusqu'à la membrane interne (Fig. 8) (80, 106, 107). Récemment, la structure de l'OMC de la souche *Xanthomonas citri*, a été résolue à 3.3 Å par microscopie cryo-électronique, et elle montre la présence de plusieurs régions de liaison (*linkers*) dans la structure de VirB10 et VirB9 qui relient les différents domaines de chaque protéine et possiblement jouent un rôle dans la flexibilité et le mouvement d'une façon indépendante des couches I et O (108).

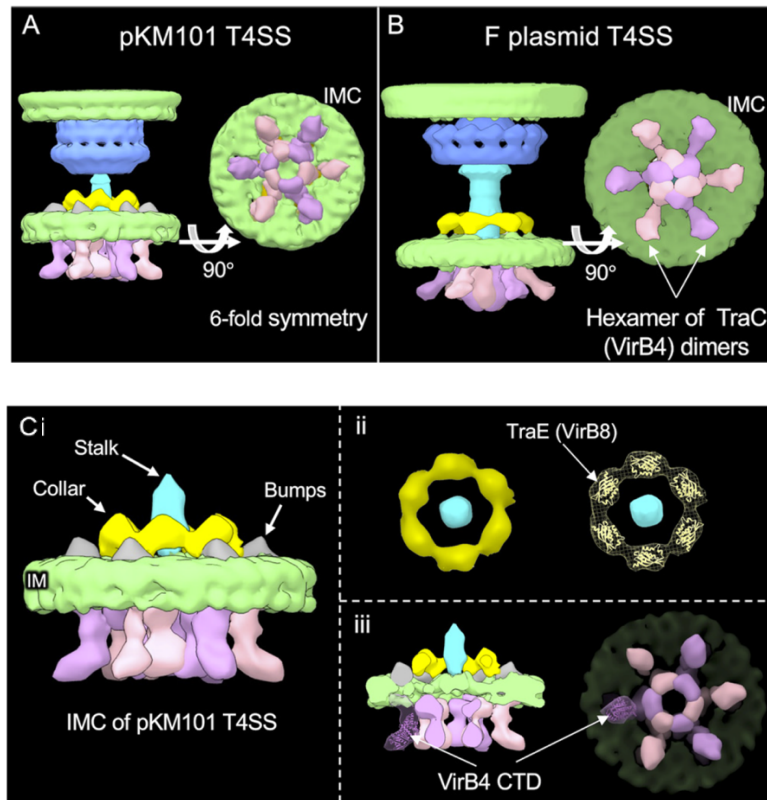


Figure 7. – La structure *in vivo* des T4SSs des plasmides pKM101 et F.

(A et B) Une comparaison de la structure résolue par tomographie cryo-électronique (Cryo-ET) des T4SSs codés par les plasmides pKM101 (T4SSpKM101) et F (T4SSF), montrant la présence d'un trimère de dimère (hexamère) des homologues de VirB4 dans la partie cytoplasmique du complexe de la membrane interne (IMC). (Ci) Vue rapprochée de la structure de l'IMC du T4SSpKM101 montrant ses différentes parties : la tige (en bleu), le collier (en jaune), les bosses (en gris) et les six copies de l'homologue de VirB4 (TraB) en rose et violet. (ii) La structure cristallographique de la partie périplasmique de l'homologue de VirB8 codé par le plasmide pKM101 (TraE – numéro d'accès PDB : 5I97) positionnée dans les six lobes du collier. (iii) La structure cristallographique du domaine C-terminal (CTD) de l'homologue de VirB4 chez *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* (numéro d'accès PDB : 4AG5) positionnée dans l'un de six « bras » de l'hexamère de TraB. Figure adaptée de (62).

-VirB7 est une petite lipoprotéine localisée dans la membrane externe. Son extrémité N-terminal subit une lipodation après le clivage de sa signal peptide (109). Cette lipodation est essentielle pour le ciblage de l'OMC vers la membrane externe et pour la stabilité de T4SS (107, 110). Le côté N-terminal de VirB7 se trouve inséré dans la membrane externe et le reste de la protéine est périplasmique et interagit avec VirB9 (111, 112). Chez *A. tumefaciens*, VirB7 a été détectée aussi à l'extérieure de la cellule, associée au pilus (113).

-VirB9 possède deux domaines (N-terminal et C-terminal) et elle se localise dans le périplasme où elle joue un rôle dans la sélection des substrats et la biogenèse du pilus (114, 115). VirB9 interagit avec VirB7 et VirB10 et forme la gaine extérieure du complexe de la membrane externe qui est stabilisé par la lipoprotéine VirB7 (116).

-VirB10 est la seule protéine parmi les composants du T4SS qui traverse la membrane interne et externe. Elle se localise au niveau de la partie intérieure de l'OMC et s'étend jusqu'à la membrane interne formant l'anneau inférieur de l'IMC (106). Cette protéine bitopique se compose d'une courte région cytoplasmique à son extrémité N-terminale, un domaine transmembranaire inséré dans la membrane interne, une région périplasmique flexible et riche en proline et un domaine globulaire à l'extrémité C-terminale qui s'insère dans la membrane externe par une double hélice formant une projection sous forme d'une antenne (Fig. 8) (79, 106). Chez *A. tumefaciens*, la région riche en proline joue un rôle dans la sécrétion des substrats et dans la biogenèse du pilus (79). VirB10 relie les différentes parties du T4SS en interagissant avec VirB9 et VirB7 dans l'OMC ainsi qu'avec plusieurs autres protéines dans l'IMC et les ATPases du T4SS à travers son domaine transmembranaire N-terminal (95, 115). VirB10 n'interagit pas avec le substrat durant le transfert mais elle subit un changement de conformation suite à l'interaction avec les ATPases, probablement permettant la formation d'une connexion entre l'IMC et l'OMC durant l'assemblage du T4SS (117).

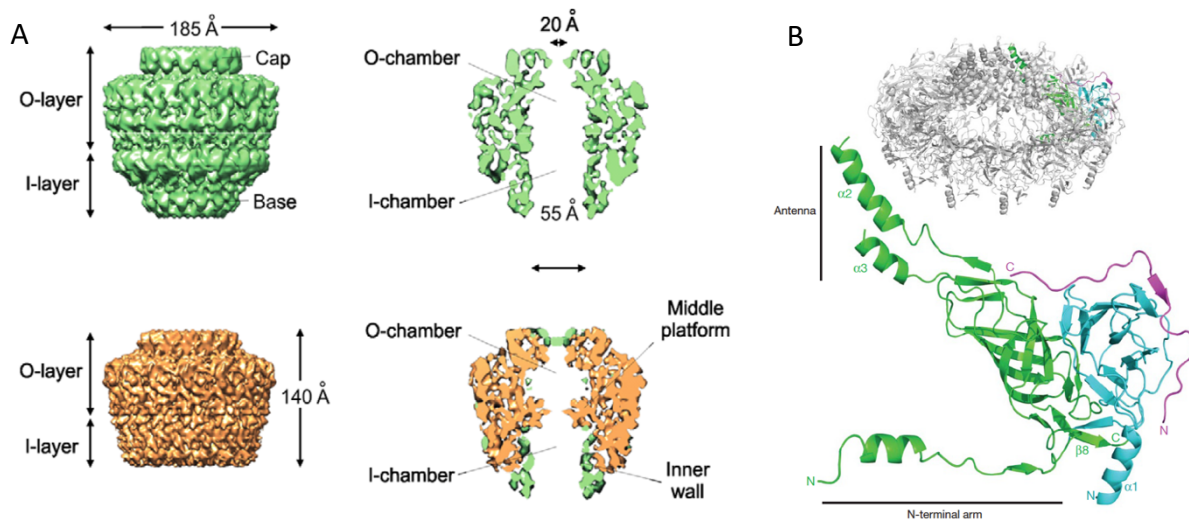


Figure 8. – La structure de l’OMC du plasmide pKM101

(A) Une comparaison de la structure par microscopie cryo-électronique du complexe de la membrane externe (OMC) du T4SS codé par le plasmide pKM101, avec (couleur orange - EMD-2232) et sans (couleur verte - EMD-2233) la partie N-terminale de la protéine TraF. (B) Représentation en ruban de la structure cristallographique de la couche externe (O-layer) de l’OMC, montrant un complexe tétradécamérique composé par le domaine C-Terminal de TraF (en vert), le domaine C-Terminal de TraO (en cyan) et la protéine TraN (en magenta). Figure adaptée de (36) (A) et (106) (B).

1.2.2.4 La protéine VirB1

VirB1 est une protéine non essentielle pour la sécrétion des substrats, mais elle est importante pour l’assemblage efficace du T4SS (118). Cette protéine est une transglycosylase lytique qui dégrade les couches de peptidoglycanes facilitant ainsi l’incorporation du T4SS dans la membrane (119). Le domaine C-terminal de VirB1 est clivé dans le périplasme pour être ensuite sécrété à l’extérieur de la cellule où il joue un rôle essentiel dans la biogenèse du pilus chez *A. tumefaciens* (54, 118). VirB1 interagit avec VirB8, VirB9 et VirB11, et la délétion de son domaine N-terminal ou bien C-terminal, chez *A. tumefaciens*, réduit d’une façon significative la pathogénicité (96, 120).

1.2.2.5 Les protéines du pilus

Le pilus représente la partie extracellulaire du T4SS et il est constitué par l'assemblage des milliers de copies de VirB2 qui forment une structure filamenteuse sur la surface de la cellule. La protéine VirB5 est aussi un composant du pilus, mais beaucoup moins abondant que VirB2, et elle a été localisée sur le bout du pilus (Fig. 6) (121).

Cette thèse est axée sur l'étude du pilus du T4SS et de la protéine VirB5. La composition, la biogenèse et la structure du pilus des T4SSs ainsi que les protéines VirB5 feront l'objet d'une description détaillée dans les prochaines sections.

1.2.3 Mécanisme d'assemblage des T4SSs

L'ensemble des diverses études faites sur les T4SSs ont contribué à l'élaboration des hypothèses sur le mécanisme d'assemblage des T4SSs, notamment les études sur les interactions entre les composants du T4SS, la localisation cellulaire des plusieurs protéines du T4SSs par microscopie à fluorescence, et la résolution des structures de l'OMC et du complexe VirB₃₋₁₀ par microscopie électronique (37, 53, 80, 106, 107, 122). Malgré toutes les données disponibles, un modèle de la biogenèse et de l'assemblage des T4SSs n'est toujours pas bien défini. Plusieurs protéines du T4SS ont été localisées sur le pôle de la cellule, et cela est dans certain cas dépendant (VirB6, VirB7, VirB9 et VirB10) ou bien indépendant (VirB3, VirB8 et les trois ATPases) des autres sous unités du T4SS (91, 122). La localisation polaire ne reflète pas nécessairement le lieu d'assemblage du T4SS. En effet, une étude a même montré une localisation hélicoïdale du T4SS autour de la cellule (37).

La purification et la résolution de la structure de l'OMC par cristallographie à rayons-X montre qu'il peut se former d'une façon spontanée et indépendamment de l'IMC, suggérant que son assemblage durant la biogenèse du T4SS précède celui de l'IMC (107). L'activité transglycosylase de VirB1 est nécessaire en premier temps pour dégrader la couche de peptidoglycane, facilitant ainsi tout assemblage du complexe (119). De plus, l'insertion de l'OMC dans la membrane externe par les doubles hélices de VirB10, dépend de la lipitation de VirB7 (107). Les extrémités N-terminales des 14 copies de VirB10 qui s'étendent jusqu'à la membrane interne par leurs domaines transmembranaires, représentent probablement le site de nucléation de l'IMC (Fig. 6 et 9) (35).

L'ATPase VirB4 peut s'associer à l'OMC sans la présence des protéines de l'IMC, et cette interaction est probablement nécessaire pour le recrutement de VirB8 (93, 123). Cependant, VirB4 nécessite l'intervention de VirB3 pour son assemblage sous une forme stœchiométrique de 12 copies dans l'IMC. Ainsi, VirB4 peut représenter la sous unité initiale pour la formation de l'IMC, surtout qu'elle interagit avec VirB6 et VirB8 dans l'IMC (53). Alors que la purification de l'OMC a montré que la protéine VirB8 est co-exprimée avec VirB7, VirB9 et VirB10, la structure finale montre un assemblage de VirB7, VirB9 et VirB10 en 14 copies sans la présence de VirB8, suggérant ainsi que VirB8 n'interagit pas d'une façon stable avec les autres composants de l'OMC (Fig. 8) (107).

Bien que la résolution obtenue de la structure du complexe purifié VirB₃₋₁₀ ne permet pas la localisation des protéines de l'IMC (VirB3-VirB4-VirB5-VirB6 et VirB8), la structure montre une forme de tige reliant l'IMC à l'OMC et qui peut être formée par la protéine VirB5 (Fig. 6) (53). Pendant la biogenèse et l'assemblage du pilus, VirB4 et VirB11 jouent un rôle dans l'extraction de la lipoprotéine VirB2 de la membrane interne pour qu'elle s'associe ensuite à VirB5 probablement au niveau de la tige (voire la section : Le pilus des T4SSs) (124) (35). Tous les T4SSs de conjugaison chez les bactéries à Gram-négatif produisent un pilus sur leur surface qui peut s'étendre jusqu'à 20 µm (125). Le pilus pourrait favoriser le contact entre la cellule donneuse et la cellule receveuse durant la conjugaison, mais il peut aussi servir comme un canal pour le transfert de l'ADN en absence de contact directe entre les cellules (126). Cependant, plusieurs mutants qui n'expriment pas le pilus, ont montré que le T4SS reste fonctionnel sans cette structure extracellulaire, et l'assemblage du pilus dépend de tous les composants du T4SS, à l'exception de VirD4 (114, 127). Cela montre que le T4SS peut fonctionner comme une machine pour l'assemblage du pilus, et un système pour le transfert du substrat.

Récemment, le T4SS des plasmides conjuguatifs F et pKM101 chez *E. coli*, ainsi que le T4SS Cag chez *H. pylori*, ont été visualisés *in vivo* par la cryo-tomographie électronique (62, 63, 128). Cette technique permet d'étudier les structures cellulaires dans leur état natif et de capturer les étapes d'assemblage des complexes cellulaires (129). Les résultats montrent que les T4SSs *in vivo* adaptent une architecture générale assez similaire qui ressemble bien à la structure du T4SS *in*

in vitro (le complexe VirB₃₋₁₀ purifié), surtout dans la partie OMC et par la présence de la tige qui relie l'OMC à l'IMC (Fig. 7) (53).

L'OMC du T4SS codé par le plasmide F (T4SS_F) représente une symétrie de 13 copies, et il se relie avec l'IMC par un canal central visible dans la structure. Par contre, l'OMC du T4SS provenant du plasmide pKM101 (T4SS_{pKM101}) a une symétrie de 14 copies et la tige centrale reliant l'OMC à l'IMC est dépourvue d'un canal (62). L'IMC du T4SS_{pKM101} et du T4SS_F est très symétrique et il se compose de six dimères de VirB4 sous forme d'un anneau bien visible, au contraire des deux tonneaux présents à la base du T4SS *in vitro* (VirB₃₋₁₀) et qui peuvent représenter un état transitoire de l'assemblage de l'IMC (Fig. 6 et 7) (62). Le côté périplasmique de l'IMC du T4SS_{pKM101} présente une densité sous forme d'un collier central qui ressemble bien à la densité d'un hexamère de TraE récemment résolue (105). D'autres densités périplasmiques sont visibles et peuvent indiquer la présence de VirB6 qui possède un large domaine périplasmique, ainsi que la protéine VirB5 et le domaine périplasmique de VirB10 qui probablement entrent tous dans la composition de la tige centrale (53, 87).

Les structures des T4SSs *in vivo* de plusieurs mutants montrent que VirD4 n'entre pas dans la composition de l'IMC comme ce qu'il a été montré dans une structure du complexe VirB₃₋₁₀ + VirD4 purifié (77), et que l'ATPase VirB11 de pKM101 semble jouer un rôle dans la régulation de la conformation de l'IMC et de la tige qui relie l'IMC avec l'OMC. En effet, la structure *in vivo* d'un mutant du T4SS_{pKM101} n'exprimant pas l'ATPase VirB11 montre que la tige centrale est plus longue (62), suggérant qu'une liaison de VirB11 avec VirB4, provoque un changement structural dans la tige centrale pour préparer le passage des substrats. Une autre étude montre aussi que VirB11 induit le passage du T4SS de l'état de la biogenèse du pilus à l'état de transfert du substrat (Fig. 9) (130).

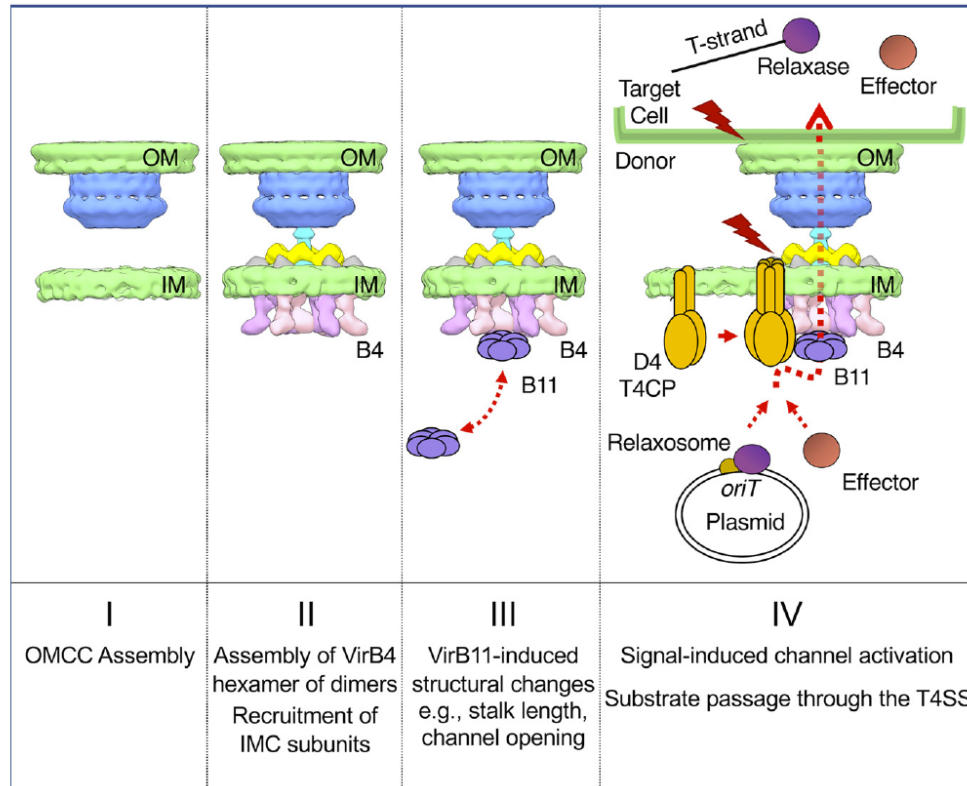


Figure 9. – Modèle du mécanisme de l'assemblage du T4ASS

Modèle de travail illustrant les contributions des ATPases VirB4 aux premiers stades de l'assemblage du T4SS, et du transfert du substrat vers la cellule cible. (Étape I) L'OMCC s'assemble en une sous-structure intrinsèquement stable indépendamment des contributions des ATPases T4SS. (Étape II) VirB4 est recruté à l'OMCC par des contacts avec les domaines N-terminal cytoplasmique et transmembranaire de VirB10. VirB4 s'assemble en un hexamère de dimères à la face cytoplasmique de la membrane interne (IM), où il recrute et stabilise d'autres constituants du complexe de la membrane interne (IMC) et de la tige. (Étape III) VirB4 sert de site d'amarrage pour l'ATPase VirB11. VirB11 régule ensuite les transitions structurales nécessaires à l'activation du canal. (Étape IV) La protéine de couplage VirD4 (T4CP) s'oligomérisse et hydrolyse l'ATP en réponse à la liaison aux substrats. Le complexe VirD4-substrat s'engage et active le canal du transfert du T4SS. Les trois ATPases: VirB4, VirB11 et VirD4 coordonnent le traitement et la livraison des substrats à travers le lumen de l'hexamère de VirB4 et dans le canal de translocation. Les éclairs rouges indiquent des signaux qui activent le T4SS pour le transfert. Figure adaptée de (62).

1.2.4 Mécanisme de transfert des substrats

1.2.4.1 Le transfert durant la conjugaison

Durant la conjugaison, de l'ADN simple brin couplé à une protéine appelée la relaxase est transféré à travers le T4SS vers une cellule receveuse (32). Le recrutement du substrat commence par l'association d'un complexe de protéines de transfert et de réplication de l'ADN, appelé le relaxosome, qui se lie à une séquence spécifique de l'ADN, l'origine de transfert (*oriT*), pour ensuite couper l'ADN de transfert (ADN-T) via la relaxase au niveau de la séquence *nic* (*nicking site*) (Fig. 10). Une fois l'ADN coupé, la relaxase reste attachée à l'ADN-T par son extrémité 5' (34).

Récemment, la structure de la relaxase Tral du plasmide F en liaison avec une séquence de l'ADN du site *nic*, était résolue par cryo-microscopie électronique (Fig. 10) (131). La structure montre que l'ADN se lie longitudinalement à travers toute la structure de Tral qui est composée de trois domaines : 1- un domaine trans-estérase N-terminal qui catalyse le coupage de l'ADN, 2- un domaine hélicase vestigiale qui représente un site de liaison à l'ADN-T, et 3- un domaine hélicase actif qui sert à dérouler l'ADN dans le sens 5' à 3' (131, 132). Pas inclus dans la structure résolue, Tral contient un quatrième domaine à son extrémité C-terminale qui probablement joue un rôle dans le recrutement du relaxosome (132). La relaxase, attachée à l'ADN-T, sera ensuite liée à la protéine du couplage VirD4 par l'intermédiaire d'un ou de deux signaux de transfert présents souvent à l'extrémité C-terminale de la relaxase, pour être ensuite acheminée vers le T4SS (18).

Le mécanisme de recrutement et de translocation du substrat à travers le T4SS n'est pas bien défini, cependant un modèle de translocation était proposé à partir des résultats obtenus par précipitation de l'ADN de transfert (TrIP, *Transfer DNA immunoprecipitation*) (Fig. 11) (133). Cette méthode permet de détecter l'interaction entre l'ADN-T et les protéines VirB du T4SS par « *cross-linking* ».

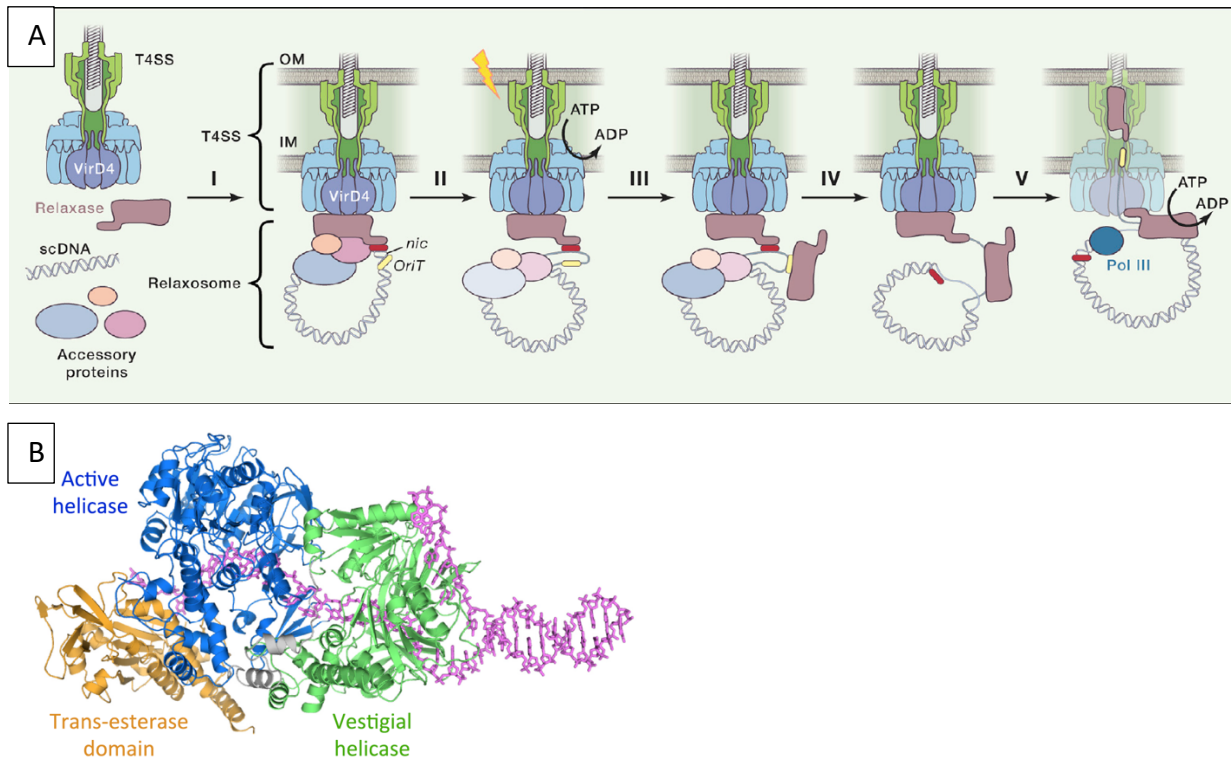


Figure 10. – Mécanisme de sécrétion du substrat à travers le T4SS du plasmide F.

(A) Mécanisme de sécrétion du complexe relaxase-ADN_(simple brin - sb) durant la conjugaison par le T4SS de type F. Le relaxosome est composé de la relaxase et de plusieurs protéines accessoires. La sécrétion commence par la formation d'un complexe T4SS-relaxosome (étape I), qui reste dormant jusqu'à ce qu'il soit stimulé par le contact du pilus avec une cellule réceptrice. Lors de la stimulation (représentée par un éclair), les ATPases seront activées, qui à leur tour activent le relaxosome entraînant la formation d'une bulle d'ADN simple brin (étape II). Une deuxième relaxase peut ensuite se lier sur la bulle d'ADN_{sb} via ses domaines d'hélicase (étape III). Simultanément, la première relaxase clive l'origine de transfert (OriT) au site de clivage (nic), et s'attache de manière covalente au phosphate-5' de l'ADN de transfert (étape IV). Enfin, la relaxase liée à l'ADN_{sb} sera transportée, tandis que la deuxième relaxase continue à dérouler l'ADN et à pomper l'ADN_{sb} résultant à travers le système du T4SS. Pendant que l'ADN_{sb} est transféré dans la cellule receveuse, le brin complémentaire restant dans la cellule donneuse subit une réplication via Pol III. La relaxase doit être présente dans la cellule réceptrice pour catalyser la recircularisation de l'ADN une fois qu'une copie du plasmide entier a été transférée. (B) Représentation en ruban de la structure par cryo-EM de l'ADN_{sb} attaché à la relaxase de type F (TraI-ADN_{sb}) montrant les trois domaines de la relaxase: la transestérase, l'hélicase active et l'hélicase résiduelle. L'ADN double brin est modélisé pour montrer le lieu de séparation des brins pendant le déroulement médié par TraI. Figure adaptée de (19) (A) et (131) (B).

Les résultats montrent que l'ADN-T interagit d'abord avec VirD4, d'une façon indépendante des autres protéines du T4SS. Ensuite, l'ADN-T entre en contact avec l'ATPase VirB11 avant qu'il soit transféré à VirB6 et VirB8 dans la membrane cytoplasmique sous contribution des trois ATPases. Le passage de l'ADN-T de VirD4 à VirB11 nécessite la présence de VirB7, sans que l'ADN interagisse directement avec VirB7 qui se situe dans l'OMC. Le substrat est ensuite transféré à VirB9 et VirB2 d'une façon dépendante des protéines de l'IMC, VirB3 et VirB5, et la protéine VirB10 de l'OMC. Bien que VirB10 est exposée à l'intérieure de l'OMC, aucun contact entre l'ADN-T et VirB10 n'est détecté (133). VirB2 est le composant majeur du pilus et son interaction avec l'ADN-T était inattendu. En effet, le site d'interaction entre VirB2 et l'ADN-T peut être à l'intérieur du pilus, et dans ce cas ce dernier devrait s'assembler à l'intérieure de l'OMC (133). Le lieu de la biogenèse du pilus reste inconnu, mais les études structurales sur les T4SSs (*in vitro* et *in vivo*) montrent une forme de tige à l'intérieure du T4SS qui relie l'IMC à l'OMC et qui peut représenter le site de nucléation du pilus (53, 62). Le passage du substrat à travers l'OMC n'est pas encore bien défini, mais plusieurs études suggèrent que le transfert du complexe relaxase + ADN-T est assuré par l'intermédiaire du pilus (126, 134). Le diamètre de l'intérieur du pilus (2.8 nm pour le pilus F) peut supporter de l'ADN simple brin, mais il n'est pas suffisamment large pour laisser passer des protéines repliées comme la relaxase (135). Cependant, il a été montré que la relaxase sera dépliée après son contact avec VirD4, et elle se replie de nouveau dès son passage à l'intérieur de la cellule receveuse où elle catalyse la recircularisation de l'ADN-T (136).

avant d'être sécrété par le T4SS, comme la protéine VirJ chez *Brucella spp.* qui a été montrée d'interagir avec VirB5 et VirB8 dans le périplasme (141, 142). En effet, le périplasme peut représenter un réservoir pour les protéines effectrices avant qu'elles soient sécrétées d'une façon sélective. Éclaircir le mécanisme de transfert des substrats par les T4SSs sera d'une grande importance, et des études supplémentaires sont nécessaires pour compléter le schéma de translocation des substrats à travers les T4SSs.

1.3 Le pilus des T4SSs

Tous les systèmes conjugatifs chez les bactéries à Gram-négatif présentent un pilus dans leurs parties extracellulaires. Le pilus est une structure filamenteuse extracellulaire qui peut atteindre jusqu'à 20 μm de longueur. Le rôle du pilus durant la conjugaison n'est toujours pas bien défini. Certaines études proposent que l'ADN passe à travers le pilus durant la conjugaison, en montrant que le transfert d'ADN peut se réaliser entre deux cellules éloignées (126, 134, 143), tandis que d'autres études présentent des mutants de T4SS dépourvus du pilus et qui sont toujours fonctionnelles durant la conjugaison (114, 127). En effet, le rôle principal du pilus est probablement de favoriser le contact entre les cellules pour faciliter la conjugaison. Le pilus F s'étend et se rétracte d'une façon aléatoire et cela permet de rapprocher les cellules éloignées (48, 125, 144), tandis que les pili de type P, qui sont plus fragiles et rigides, se relâchent dans le milieu et contribuent à la formation du biofilm et des agrégats cellulaires, favorisant ainsi le contact entre les cellules (145-147). De plus, le pilus représente le site d'adhésion de certains bactériophages avant d'injecter leur ADN ou bien ARN dans la cellule (148).

La biogenèse et l'assemblage du pilus nécessite l'ensemble des gènes responsables de la formation du T4SS, à l'exception de la protéine de couplage VirD4 (125). Le pilus est composé principalement de la protéine VirB2, qui représente la sous unité majeure (le piline), et la protéine VirB5 qui se localise sur le bout du pilus chez *A. tumefaciens* (121). VirB5 est nécessaire pour l'incorporation de VirB2 dans le pilus et il joue un rôle dans son élongation (76, 149). Vue sa

position sur l'extrémité du pilus, VirB5 est aussi souvent considérée comme une adhésine qui représente le premier point de contact avec la cellule cible (121).

1.3.1 La biogenèse du pilus des T4SSs

Les pili de type F et P sont parmi les pili les mieux étudiés. Leurs protéines pilines représentent une similarité d'environ 50% dans leurs séquences et possèdent un long signal peptidique (~50 a.a.) (150). La protéine TraA, codée par le plasmide F, est une petite protéine (~13 kDa) exprimée sous forme d'une pro-piline (Fig. 12). Après son insertion dans la membrane intérieure par un mécanisme dépendant de la force proton-motrice, TraA sera orientée et stabilisée par l'intermédiaire de la protéine TraQ. Ensuite, pour obtenir la piline mature TraA (~7 kDa), le signal peptidique sera clivé par l'enzyme *leader peptidase* I LepB, suivie d'une acétylation de son extrémité N-terminale par la protéine TraX (151-153). Alors que le rôle de l'acétylation de TraA n'est pas clair, cette modification n'est pas essentielle pour la formation du pilus (154). Les protéines pilines des pili de type P (exemple: TrbC du plasmide RP4 et VirB2 du plasmide Ti) subissent une étape de cyclisation, au lieu de l'acétylation, qui relie les deux extrémités N- et C-terminales de la protéine pour former une piline mature cyclique (155, 156). Le clivage du signal peptidique de VirB2 peut se réaliser dans la souche *E. coli*, mais le mécanisme de cyclisation est spécifique à la souche *A. tumefaciens* (156). TrbC subit un double clivage à son extrémité C-terminale par la protéine TraF (codé par le plasmide RP4) avant d'être transformée en protéine cyclique (157). Après les processus de maturation, les pilines se trouvent stockées dans la membrane interne prêtes pour s'assembler dans le pilus à la suite d'un signal inconnu.

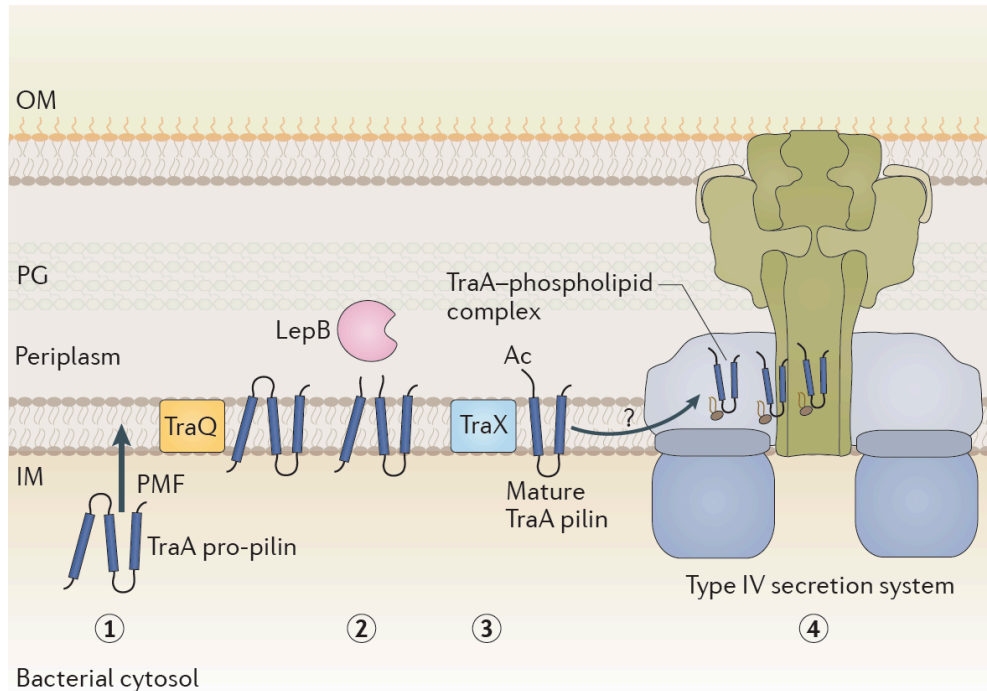


Figure 12. – Mécanisme de la maturation de la piline TraA.

Illustration du mécanisme de maturation de TraA dans la membrane interne et de l'assemblage du complexe TraA-phospholipide dans le pilus F. TraA pro-piline est transportée vers la membrane interne par une force motrice à proton (PMF) facilitée par TraQ (étape 1). Le signal peptide de la pro-piline est clivée par la peptidase LepB (étape 2), suivie de l'acétylation du côté N-terminal de la piline TraA par TraX (étape 3). Au cours de la maturation, chaque TraA se lie à un phospholipide de la famille des phosphatidylglycérols et le complexe phospholipidique-TraA s'assemble sous forme d'un filament hélicoïdal à l'intérieur du T4SS. OM, la membrane externe; IM, la membrane interne; PG, peptidoglycane. Figure adaptée de (158).

Le début de la nucléation du pilus se commence avec l'extraction des pilines de la membrane. L'ATPase VirB4, située dans l'IMC, a été montrée de former des complexes avec VirB2, et elle est essentielle pour l'interaction de VirB2 avec le composant mineur du pilus VirB5 (93). En effet, VirB4 et VirB11 catalysent l'extraction de VirB2 à partir de la membrane pour permettre ensuite la livraison de VirB2 au site de nucléation du pilus (124).

La résolution par cryo-tomographie électronique de la structure *in vivo* du T4SS pour les plasmides conjuguatifs F et pKM101 a contribué à la compréhension du mécanisme de la biogénèse du pilus

conjugatif. Les résultats montrent la présence de plusieurs structures membranaires différentes codées par les plasmides F ou bien pKM101 (62, 63). Pour le plasmide F, parmi les structures identifiées il y a le complexe transmembranaire entier du T4SS, attaché ou non à un pilus extracellulaire. Les résultats montrent pour la première fois que le pilus attaché au T4SS se trouve lié seulement à la membrane externe et ne s'étend pas vers le périplasme (Fig. 13) (63).

Deux autres structures ont été aussi identifiées. La première représente une forme simple du T4SS qui ne possède pas une densité près de la membrane interne ni dans le périplasme, mais seulement une tige qui traverse le périplasme et une densité sous forme d'une coiffe près de la membrane externe, à laquelle se relie le pilus. La deuxième structure représente le pilus sur la surface attaché à une petite densité dans la membrane externe sans aucune densité périplasmique ni près de la membrane interne (Fig. 13) (63). La présence de ces différentes structures indique clairement que le pilus s'assemble dans la membrane externe et non pas dans la membrane interne ou bien le périplasme. La structure du T4SS du mutant $\Delta traA$ est similaire à la structure du T4SS complet, mais sans la présence du pilus, indiquant que le canal central n'est pas formé par des sous unités de la piline TraA. De plus, le diamètre du canal central (3.5 nm) observé dans le T4SS entier n'est pas assez large pour supporter le pilus (8.5 nm de diamètre) à l'intérieur. En revanche il est convenable pour le passage d'un protofilament de TraA après son extraction de la membrane interne, pour ensuite s'assembler sous forme hélicoïdale à la surface de la cellule en formant le pilus mature (63).

La comparaison de la structure obtenue du TASS_F *in vivo*, sans et avec le pilus attaché, indique un changement de conformation dans le canal central, qui s'allonge vers l'OMC et devient plus large à l'intérieur, probablement pour s'adapter à l'assemblage du pilus (Fig. 13) (63). Récemment, la structure de l'OMC (TraV, TraK et TraB) purifié du T4SS_F a été résolue par microscopie cryo-électronique, et les résultats montrent une haute flexibilité observée dans diverses régions de l'OMC suggérant ainsi un certain dynamisme convenable pour l'assemblage et l'émergence du pilus (159).

Après son assemblage, le pilus se rétracte vers l'intérieure de la cellule par : 1- une dépolymérisation des sous unités de TraA, 2- une délocalisation potentiellement favorisée par un

mécanisme nécessitant un démontage du T4SS, ou bien 3- une translocation active de la membrane externe. Ces différents mécanismes pourraient expliquer l'observation des différentes structures à la base du pilus dans la structure *in vivo* du T4SS_F (Fig. 13) (63, 125).

Les pili du plasmide pKM101 sont très rares et fragiles, et ils sont donc difficiles à détecter et à visualiser à la surface de la cellule. Les résultats récents sur la structure *in vivo* du T4SS du plasmide pKM101 (T4SS_{pKM101}) montrent aussi des pili attachés à une structure dans la membrane qui représente l'OMC avec une tige dans le périplasma, ou bien des pili sans une structure distincte à leurs bases (62). Ces résultats sont conformes avec celles obtenus du plasmide F qui représentent probablement une translocation du pilus sur la surface cellulaire avant d'être relâché dans le milieu extracellulaire. Cependant, la tige centrale observée dans la partie périplasmique du T4SS_{pKM101}, ne possède pas un canal visible à l'intérieur comme celui trouvé dans la structure du T4SS_F, et donc il reste difficile de postuler un mécanisme de biogenèse du pilus pKM101 (62).

1.3.2 La structure du pilus conjugatif

La présence des structures filamenteuses non-flagellaires sur la surface des bactéries a été détecté par microscopie électronique depuis les années 1950 (160). Plus tard, les études ont montré la base génétique et le rôle de ces structures extracellulaires, appelés pili. Les pili de type F sont les plus étudiés parmi les pili conjugatifs et généralement ils sont faciles à détecter sur la surface cellulaire vu qu'ils sont longs et assez nombreux. En effet, certains plasmides de type F présentent jusqu'à 20 pili par bactérie (125). En revanche, les pili de type P sont rares et fragiles, et ils se détachent facilement de la cellule, ce qui rend leur étude plus difficile (161).

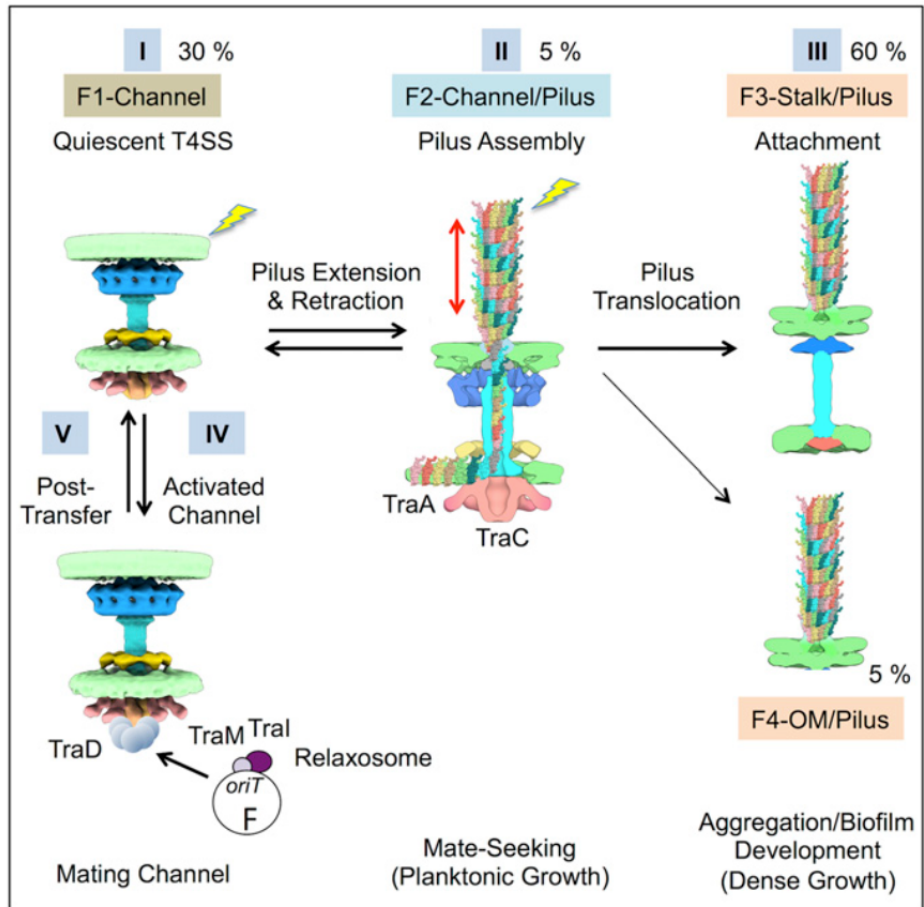


Figure 13. – Modèle de la biogenèse du pilus F.

La voie d'assemblage du T4SS de type F axée sur les données structurales. Étape I: les sous-unités Tra s'assemblent initialement sous la forme d'un canal transmembranaire dormant (F1). Étape II : le pilus s'assemble et s'ajoute sur le canal pour former un complexe F2-Canal/pilus permettant l'extension et la rétraction du pilus F en mode « recherche de partenaire ». Étape III : les pili F sont alternativement déposés sur des complexes distincts, donnant les structures F3-Tige/Pilus ou F4-OM/Pilus, qui favorisent l'agrégation non spécifique et la formation de biofilms. Étape IV : le contact avec la cellule receveuse (représenté par l'éclair) déclenche la rétraction du pilus et le recrutement de TraD et du substrat pour activer le mode de transfert d'ADN. Étape V : une fois le transfert d'ADN terminé, la cellule donneuse et receveuse se désengagent et le canal de transfert revient à l'état F1. Les pourcentages relatifs de chaque complexe visualisé par Cryo-ET sur des mini-cellules sont présentés. Figure adaptée de (63).

Récemment, les structures de trois pili de type F (provenant des plasmides pED208, pOX38 et pKpQIL) ont été résolues par microscopie cryo-électronique (135, 162). La meilleure résolution a été obtenue avec le pilus du plasmide pED208 (3.6 Å) (Fig. 14). La structure montre un filament hélicoïdal de diamètre de 87 Å et un lumen de 28 Å. Ce filament se compose des milliers de sous unités de TraA assemblées en cinq proto-filaments. En plus de la protéine piline, la structure révèle la présence du phospholipide phosphatidylglycérole (PG) dans une stœchiométrie de 1:1 avec TraA. La structure atomique de TraA montre qu'elle est composée de trois hélices ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$) avec une boucle entre les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$. Les extrémités N- et C-terminales sont exposées à la surface du pilus et la boucle se trouve positionnée vers le lumen. Les sous-unités de TraA s'interagissent entre elles, et avec les deux chaînes acyles des PG, principalement par des liaisons hydrophobes. D'autre part, la tête de PG est exposée au lumen, où elle contribue au changement de la charge globale de l'intérieur du pilus. Par conséquent, le lumen qui est chargé positivement par la présence de l'arginine dans la boucle de TraA, devient chargé négativement par la présence de la tête du PG. Cet environnement négatif pourrait faciliter le transfert de l'ADN à travers le pilus durant la conjugaison (Fig.14) (135, 162).

1.3.3 Les bactériophages spécifiques au pilus conjugatif

Les bactériophages, ou bien les phages, sont des virus qui infectent les bactéries. Pour certains phages, le pilus conjugatif représente le point de reconnaissance et du premier contact avant l'adhésion à la surface cellulaire pour injecter leurs génomes dans le cytoplasme de la bactérie (147). Ainsi, les bactériophages peuvent représenter un outil efficace et spécifique contre la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques. L'activité bactéricide des phages contre les pathogènes a été montrée bien avant la découverte des antibiotiques, cependant l'efficacité des antibiotiques et leur production à l'échelle industrielle a mis en pause l'utilisation des phages comme un antimicrobiens. Avec l'émergence des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, l'intérêt aux phages dans la médecine est de nouveau considéré. Certains phages s'adhèrent aux côtés du pilus, tandis que d'autres s'attachent sur le bout (Fig. 15). En se rétractant, le pilus F rapproche les phages vers la surface cellulaire, facilitant ainsi le processus d'infection (125).

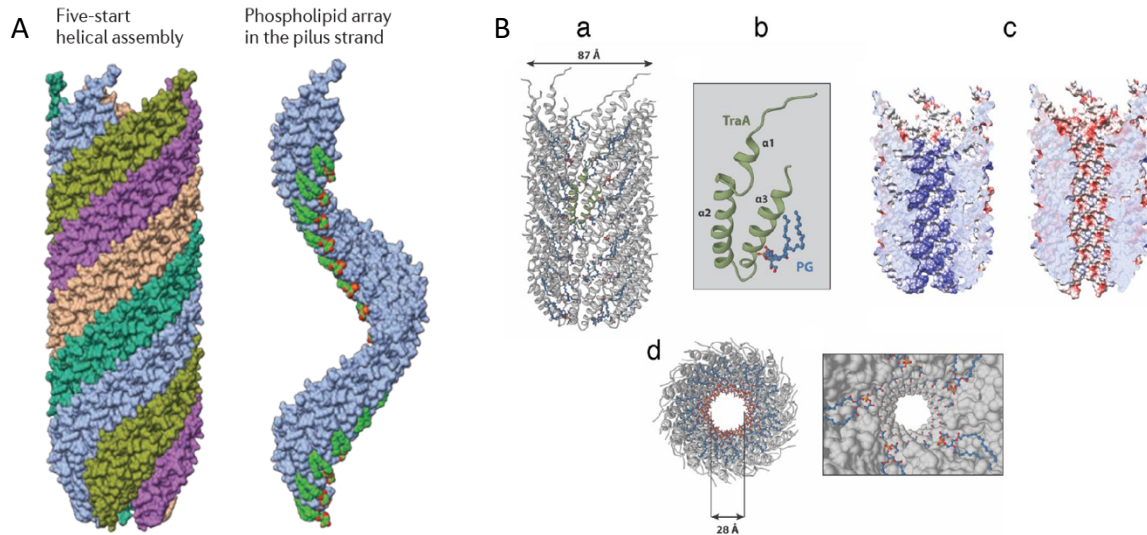


Figure 14. – Architecture du pilus F.

(A) Représentation en surface du modèle de la structure du pilus F. À gauche : une vue latérale du pilus montrant les cinq brins hélicoïdaux colorés individuellement. À droite : chaque brin est constitué de 12,8 sous-unités de TraA-phospholipide par tour hélicoïdal. (B) (a) Représentation en ruban de la structure par cryo-EM du pilus F codé par le plasmide pED208 (code PDB: 5LEG). (b) La structure de la sous-unité du pilus F composée du complexe TraA-phosphatidylglycérole (PG). (c) Le potentiel électrostatique du lumen du pilus F en absence (à gauche) ou en présence (à droite) de phosphatidylglycérole. La couleur bleue représente une charge positive, tandis que la couleur rouge représente une charge négative. d) Une vue rapprochée du lumen du pilus montrant la tête du PG pointant vers le centre du canal. Figure adaptée de (158)(A) et (15)(B).

La spécificité de plusieurs phages envers le pilus conjugatif, contribue à l'amélioration des connaissances sur les pili du T4SS. Par exemple dans une étude, des phages R17 (qui s'attachent aux côtés du pilus F) couplés à un marqueur fluorescent ont permis la visualisation de l'extension et de la rétraction du pilus F par microscopie à fluorescence. Les résultats indiquent que la vitesse de l'extension est de 40 nm/s, donc 2,5 fois plus rapide que celle de la rétraction qui a été calculée à 16 nm/s (48). Récemment, le mécanisme d'adhésion du phage MS2 au pilus F a été aussi étudié par microscopie à fluorescence en utilisant une méthode de marquage des phages (Fig. 15) (163). Les résultats obtenus suggèrent un mécanisme de défense déployé par la cellule hôte contre

l'infection viral et qui consiste à induire le détachement et la libération des pili dans le milieu extracellulaire. Le mécanisme de l'infection des phages n'est pas bien défini, mais un T4SS fonctionnel est essentiel pour l'injection de l'ADN ou bien de l'ARN viral dans le cytoplasme. En effet, les phages MS2 peuvent s'attacher au pilus produit par un mutant de T4SS_F qui n'exprime pas la protéine TraD/VirD4, mais le processus d'infection ne sera pas complété, indiquant un rôle de TraD dans le transfert de l'ARN simple brin viral vers la cellule (163).

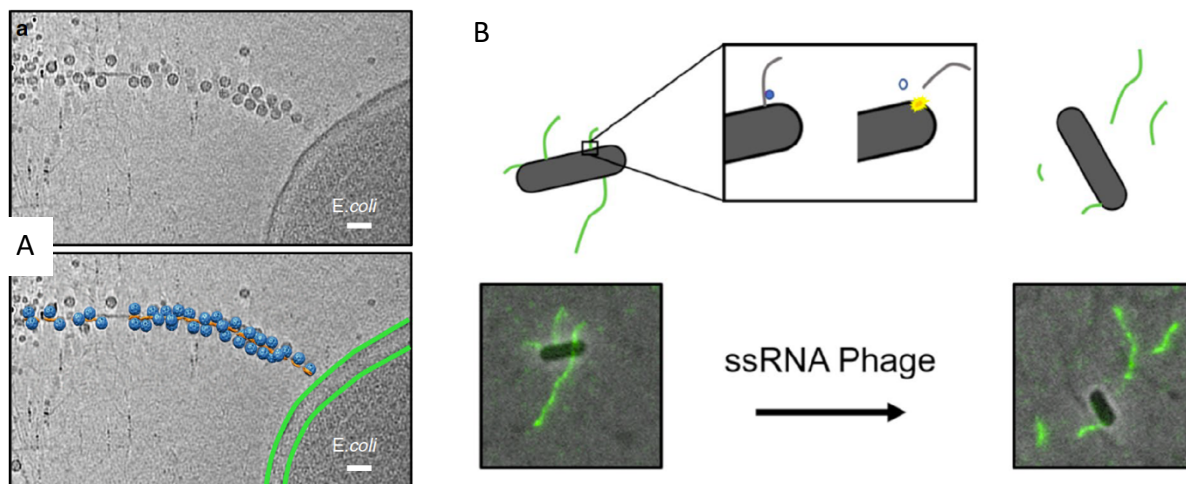


Figure 15. – Adhésion des phages MS2 au pilus F.

(A) Panneau supérieur : Vue en coupe d'un tomogramme montrant l'adsorption des phages MS2 au pilus F sur la surface d'*E. coli in situ*. La barre d'échelle indique 500 Å. Panneau inférieur : un modèle en 3D basé sur l'analyse des données obtenues par les tomogrammes collectés. MS2 sont de couleur bleue. Le pilus F est de couleur orange. Les membranes externe et interne d'*E. coli* sont marquées par deux courbes vertes. La barre d'échelle indique 500 Å. (B) Représentation schématique montrant le mécanisme du détachement du pilus F provoqué par l'infection à des phages à ARN_{sb}. La fusion de la protéine formant la couche externe du phage MS2 à la protéine fluorescente sfGFP, permet la visualisation du pilus F. Figure adaptée de (164)-(A) et (15)-(B).

La structure du pilus F a montré la présence d'une arginine exposée dans le lumen (Arg39). Le remplacement de cette arginine par alanine n'affecte pas l'assemblage du pilus ou bien le transfert de l'ADN durant la conjugaison, ni l'infection par le phage filamenteux f1 qui s'attache au bout du pilus F (135). Cependant, la substitution de l'Arg39 par un acide glutamique, empêche l'infection par f1 sans affecté la formation du pilus et la conjugaison. Les résultats suggèrent que la présence de l'acide glutamique augmente l'électronégativité du lumen du pilus empêchant l'ADN viral d'y passer à travers pour accéder à la cellule (135).

La base structurale de l'adhésion du phage MS2 au pilus F a été révélée récemment par microscopie cryo-électronique (164). MS2 s'attache aux extrémités N- et C-terminales de 4 pilines, par des interactions électrostatiques avec la région β de sa protéine de maturation Mat. De plus, l'étude a démontré que les extrémités N- et C-terminales du piline TraA dans le pilus sont orientées vers la surface cellulaire (164).

1.4 Les protéines VirB5

Les protéines VirB5 sont présentes dans la majorité des T4SSs (à l'exception de *Bordetella pertussis*). Elles sont constituées généralement de ~220 acides aminés et possèdent un peptide signal pour leur translocation vers le périplasme (165). VirB5 a été détectée dans la membrane interne, le périplasme, exposée à la surface cellulaire, ainsi qu'attachée au pilus. Les analyses biochimiques sur des complexes extracellulaires purifiés ont montré que le pilus du T4SS est composé principalement de la piline VirB2, avec VirB5 représentant le composant mineur du pilus (166, 167). Plus tard, VirB5 a été localisée sur le bout du pilus par immunodétection et microscopie électronique (Fig. 16) (121). TraC du plasmide pKM101, une homologue de VirB5, se trouve aussi sécrétée sous forme soluble dans le milieu extracellulaire, d'une façon indépendante du T4SS (166). TraC se distingue des autres protéines VirB5 par un phénomène appelé « complémentation extracellulaire », ce qui signifie que la délétion de TraC pourrait être restaurer

par la présence d'une autre souche « *helper* » qui exprime un T4SS entier à partir d'un plasmide non transmissible (166, 168). Le mécanisme de la complémentation extracellulaire n'est pas bien défini mais la localisation de TraC exposée à la surface cellulaire laisse suggérer un transfert de TraC de la souche « *helper* » vers la souche $\Delta traC$ à la suite d'une fusion de la membrane extérieure des deux souches (167). Ce type d'échange des matériels de la membrane externe a été observé chez les myxobactéries où il contribue à la réparation de certaines fonctions cellulaires, comme la motilité (169).

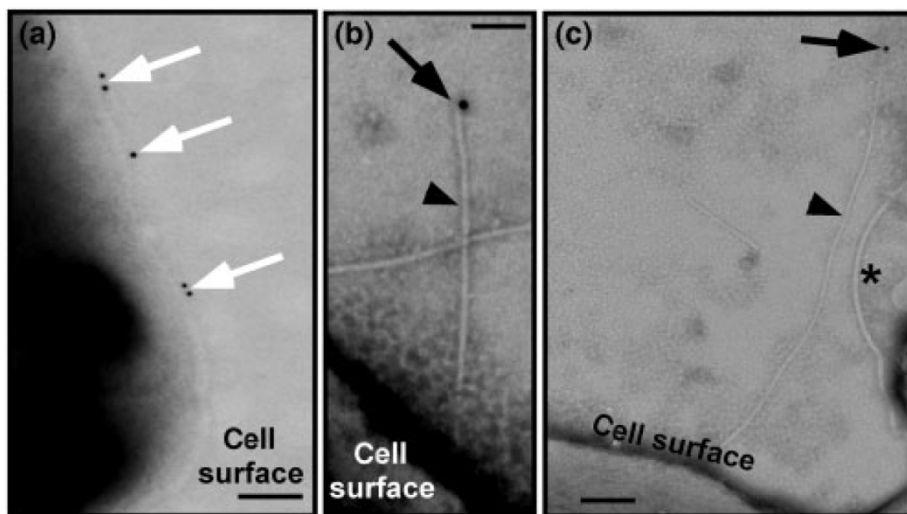


Figure 16. – Détection de VirB5 au pilus et à la surface cellulaire.

Immuno-détection de VirB5 et visualisation par microscopie électronique. VirB5 est détectée par un antisérum primaire spécifique à VirB5, et un anticorps secondaire couplé à des billes d'or de 10 nm. Les flèches blanches pointent vers des billes d'or qui indiquent la localisation de VirB5 sur la surface cellulaire d'*A. tumefaciens* ; les pointes de flèches montrent les pili T ; l'astérisque indique un flagelle et les flèches noires montrent la détection des billes d'or sur les pointes du pilus T. La barre d'échelle = 100 nm. Figure adaptée de (121).

VirB5 est essentielle pour l'incorporation de VirB2 dans le pilus et elle joue un rôle important dans l'élongation du pilus (93). Cependant, VirB5 ne semble pas être essentielle pour le fonctionnement du T4SS. En effet, le taux du transfert du plasmide pKM101 durant la conjugaison

en milieu solide est réduit d'une façon importante dans le cas d'une délétion de TraC, mais sans être complètement abolie. Aucun transfert n'est détecté en milieu liquide en absence de TraC. Ces résultats indiquent un rôle de TraC dans l'élaboration du pilus qui facilite le contact entre les cellules éloignées en milieu liquide durant la conjugaison, ce qui n'est pas nécessaire en milieu solide où la culture est plus dense (167, 168).

Vu sa localisation sur le bout du pilus, VirB5 a toujours été considérée comme une adhésine responsable de la reconnaissance et de l'adhésion à la cellule receveuse. La protéine CagL, homologue de VirB5 chez *H. pylori*, a été détectée aussi sur la surface du pilus. En effet, elle est impliquée dans le contact d'*H. pylori* avec les cellules épithéliales gastriques par une liaison avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. La liaison entre CagL et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ déclenche ensuite la translocation de l'oncoprotéine CagA vers la cellule hôte (170). Chez le plasmide F, cinq protéines sont impliquées dans la formation de la pointe du pilus (TraE, -C, -G, -K et -L), mais il n'existe pas d'indices montrant une association de ces protéines au pilus F (171). Plus d'études sur les protéines VirB5 seront nécessaires pour confirmer leurs rôles dans l'étape de la reconnaissance et l'adhésion à la cellule receveuse.

La structure cristallographique de TraC soluble, montre qu'elle est formée de trois longues hélices α et un appendice flexible qui regroupe quatre petites hélices α (Fig. 17) (165). L'état oligomérique de TraC soluble a été étudié par chromatographie d'exclusion stérique et par équilibre de sédimentation, et les résultats indiquent que TraC purifiée est un monomère (165). Chez *A. tumefaciens*, l'extraction des protéines VirB de la membrane montrent que VirB5 et VirB2 s'associent dans un complexe de ~140 kDa (93). La formation de ce complexe dépend de la présence de VirB4, nécessaire pour la stabilisation de VirB8 et VirB6 qui stabilisent VirB5 pour former le complexe avec VirB2 (93).



Figure 17. – Représentation en ruban de la structure cristallographique de TraC

Les trois longues hélices alpha ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$) et les quatre courtes hélices alpha (αa , αb , αc et αd) sont indiquées. Figure réalisée à partir de la PDB : 1R8I (165).

1.5 Le T4SS chez *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens a été utilisée comme un modèle d'étude pour la réalisation d'une partie des expériences durant ce doctorat, et donc un aperçu sur le fonctionnement du T4SS chez *A. tumefaciens* est discuté dans cette partie de la thèse.

A. tumefaciens est une bactérie pathogène à Gram-négatif responsable de la maladie de la galle du collet (*crown gall disease*) chez une vaste variété des plantes, et qui se manifeste par la formation d'une tumeur visible sur la plante. La virulence chez *A. tumefaciens* est causée par le plasmide Ti (~200 kb) qui regroupe les gènes responsables du transfert de l'ADN oncogène (ADN-T) et des protéines effectrices vers le cytoplasme des cellules de la plante. Ti effectue aussi le transfert du plasmide conjugatif IncQ, ainsi que le contrôle de la production et l'utilisation des dérivés des acide aminés et des sucres phosphates, appelés des opines (172).

Le transfert de l'ADN-T est assuré par le T4SS VirB/D4 qui sera induit à la suite d'une cascade des signaux déclenchés par une plante blessée. Le site de blessure chez les plantes est caractérisé par un pH acide et par la présence des composés phénoliques spécifiques et des monosaccharides, ainsi qu'un taux faible du phosphate (173-175). Deux protéines codées par le plasmide Ti, VirA et VirG, assurent la régulation des gènes de virulence (*vir*) responsables du transfert de l'ADN-T aux cellules de la plante (Fig. 18) (176). VirA devient sensible aux composés phénoliques libérés par la plante blessée, comme l'acétosyringone (AS), après un changement de conformation à la suite d'une liaison avec ChvE par son domaine périplasmique, en présence de sucre et en pH acide. Les composés phénoliques induisent l'autophosphorylation de VirA par son histidine (His474) pour ensuite transférer un groupement phosphate à l'acide aspartique (Asp52) de la protéine VirG. VirG phosphorylée se lie ensuite à un site spécifique au niveau du promoteur des gènes *vir* pour activer leur expression et déclencher le mécanisme du transfert de l'ADN-T par le T4SS (177-181).

Après son intégration dans le génome de la plante par une recombinaison non homologue, l'ADN-T va coder pour deux groupes de protéines : 1- des enzymes qui stimulent la synthèse des hormones régulatrices de la croissance chez la plante provoquant la formation des tumeurs à la suite de divisions cellulaires incontrôlées, 2- des enzymes qui stimulent la synthèse des opines (174). Les plantes sont incapables de métaboliser les opines et donc elles les libèrent dans le milieu extracellulaire. Cependant, le plasmide Ti regroupe des gènes responsables pour le transport et la dégradation des opines dans le cytoplasme d'*A. tumefaciens* pour les utiliser comme une source de carbone et d'énergie. La formation d'une tumeur qui assure la prolifération des cellules de la plante et l'environnement riche en opines représentent donc un milieu idéal pour la croissance et la propagation d'*A. tumefaciens* (172).

Le mécanisme d'injection de l'ADN-T dans les cellules des plantes par *A. tumefaciens*, a révolutionné l'agriculture et le secteur de la biotechnologie. Les scientifiques ont remplacé les gènes oncogènes dans l'ADN-T et les gènes codants pour les opines, par des gènes d'intérêt afin de les introduire dans les cellules des plantes. Cette technique présente plusieurs avantages et peut être utilisée dans plusieurs applications concernant la modification des génomes des plantes. *A. tumefaciens* est aussi capable de transférer l'ADN-T chez les levures et les champignons, ainsi que dans la lignée mammifère Hela *in vitro*, et donc l'«Agro-

transformation» est devenu un outil très efficace de manipulation génétique chez plusieurs organismes (182, 183).

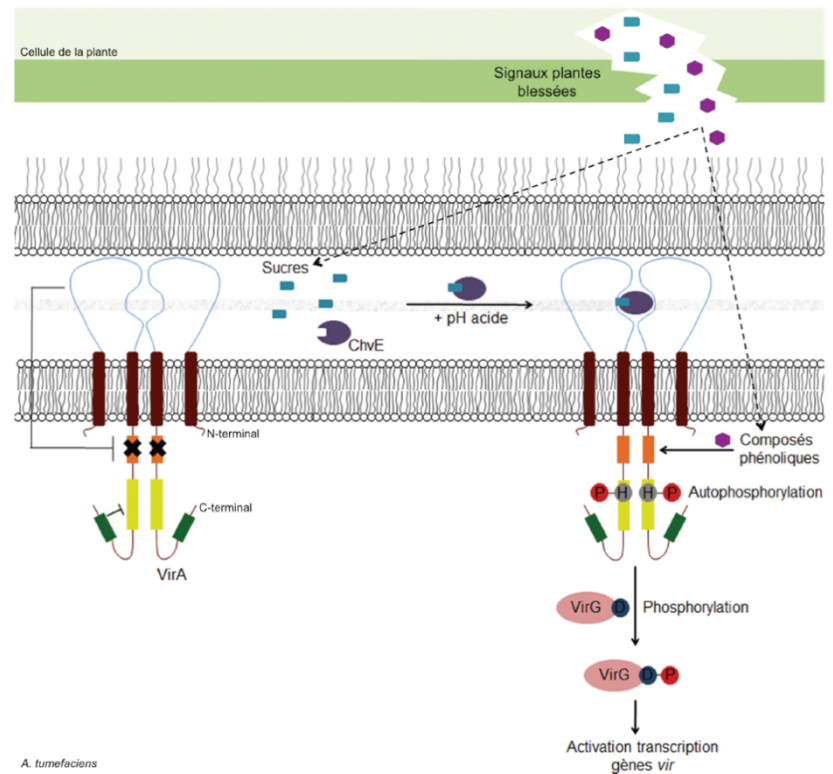


Figure 18. – Représentation schématique de la régulation du T4SS chez *A. tumefaciens*.

L'activation de la transcription des gènes de virulence (*vir*) responsables de la formation et le fonctionnement du T4SS. VirA contient un domaine périplasmique (en bleu), un domaine « linker » (en orange), un domaine kinase (en jaune) et un domaine receveur (en vert). La liaison de ChvE à un sucre provenant du site de blessure de la plante, suivie de l'interaction de ce complexe au domaine périplasmique de VirA en pH acide, induit l'autophosphorylation et la sensibilisation de VirA aux composés phénoliques sécrétés par la plante. VirG ensuite sera phosphorylée ce qui déclenche la transcription des gènes *vir*. Figure adaptée de (184).

1.6 Inhibition des systèmes de sécrétion de type IV

La conjugaison bactérienne contribue d'une façon importante à l'amplification du problème de l'adaptation des bactéries aux antibiotiques disponibles, et donc elle peut être considérée comme une approche alternative et une cible pour limiter la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques. Plusieurs molécules d'origine végétale ont montré un effet inhibiteur sur le transfert des plasmides conjugatifs de plusieurs groupes d'incompatibilités, sans perturber la croissance des bactéries à Gram-négatif, comme la plumbagine (de la plante *Plumbago*), la rottlerine et le « composé rouge » (de la plante *Mallotus philippensis*) (Fig. 19) (185, 186). Le mécanisme d'inhibition par ces composés n'est pas encore bien défini, et plus d'études sont nécessaires pour déterminer leur efficacité *in vivo* et pour l'optimisation de ces molécules pour qu'elles soient efficaces contre la majorité des plasmides conjugatifs.

L'avancement dans les études biochimiques et structurales sur les T4SSs et ces composants a contribué à la conception des molécules inhibitrices ciblant ce système de sécrétion. Notre laboratoire travaille depuis des années sur le développement des molécules inhibitrices contre les T4SSs, et il a réussi, en utilisant l'approche de criblage à haut débit, à identifier des molécules dérivées du salicylidène acylhydrazide qui empêchent la dimérisation de VirB8 de la souche *Brucella abortus*. Parmi les molécules sélectionnées, une molécule a réduit d'une façon significative le taux de survie de *Brucella* dans les macrophages (Fig. 19) (102). Ces molécules empêchent aussi la dimérisation de la protéine TraE du plasmide pKM101, homologue de VirB8, et inhibent le transfert du plasmide pKM101 par conjugaison (103). Récemment, notre laboratoire a identifié aussi d'autres petites molécules qui inhibent l'activité de l'ATPase Cag α d'*H. pylori*, homologue de VirB11, y inclus une molécule qui dissocie l'hexamère de Cag α *in vitro* et inhibe la production de l'interleukine-8 après l'interaction d'*H. pylori* avec des cellules cancéreuses de l'estomac (187).

D'autres approches qui n'utilisent pas des molécules chimiques ont été testées dans le but d'inhiber la conjugaison. Le pilus conjugatif représente le premier point de contact de certains phages, comme le phage filamenteux M13 qui se lie au pilus F par l'intermédiaire de sa protéine

g3p. Les résultats montrent que l'ajout du domaine N-terminal soluble de la protéine purifiée g3p en faible concentration inhibe d'une façon très significative la conjugaison en milieu liquide (188). L'étude du mécanisme de l'adhésion des phages au pilus conjugatifs peut contribuer dans la conception des approches inhibitrices de la conjugaison spécifiques aux bactéries résistantes aux antibiotiques.

Le criblage phénotypique a été utilisé dans une étude récente pour identifier des molécules inhibitrices pour les T4SSs (189). Parmi les molécules testées, deux petites molécules synthétisées ont inhibé l'activité du T4SS chez *H. pylori* et ont affecté la conjugaison par le plasmide pKM101 et R1-16 chez *E. coli*. Ces molécules ont aussi atténué le transfert de l'ADN-T par le T4SS chez *A. tumefaciens*. Le criblage phénotypique représente une approche importante et rapide pour l'identification des molécules potentielles. Il est indispensable de déterminer le mécanisme d'inhibition pour améliorer l'efficacité des inhibiteurs et éviter tout effet indésirable sur les cellules mammifères.

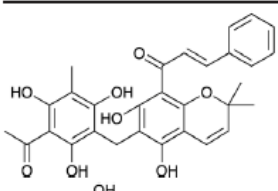
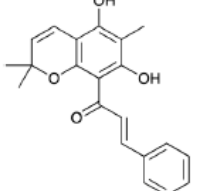
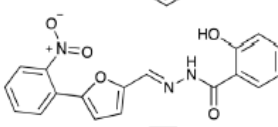
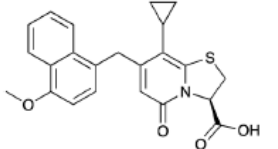
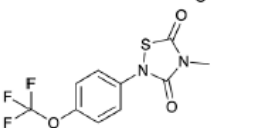
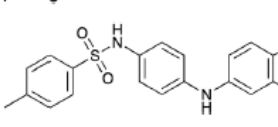
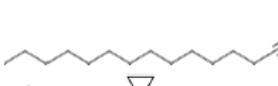
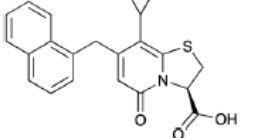
T4SS inhibitor structure	Inhibitor group (compound name)	Screening assay	Mechanism of action	Organism range
	Plant-derived bioactive compound (rottlerin)	Bioassay-guided fractionation of medicinal plant extracts	Unknown	Gram-positive bacteria including MRSA; <i>E. coli</i> pKM101, TP114, pUB307 and R6K conjugative systems
	Plant-derived bioactive compound (red compound)	Bioassay-guided fractionation of medicinal plant extracts	Unknown	Gram-positive bacteria including MRSA; <i>Escherichia coli</i> pKM101, TP114, pUB307 and R6K conjugative systems
	Salicylidene acylhydrazide derivatives (B81-2)	Target-based HTS in a whole cell assay	Prevents VirB8 dimerization; inhibits TraE	<i>Brucella abortus</i> ; <i>Escherichia coli</i> pKM101 system
	Heterocyclic 2-pyridones (KSK85)	Targeted, phenotypic cell-based screen of heterocyclic 2-pyridones	Disrupts T4SS apparatus biogenesis (unknown mechanism)	<i>Helicobacter pylori</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Escherichia coli</i> pKM101 and R1-16 conjugative systems
	Thiazolidine-3,5-diones (CHIR-1)	HTS using <i>in vitro</i> ATPase activity; cell-based assays	Inhibits VirB11 ATPase activity	<i>Helicobacter pylori</i> VirB11 homolog (HP0525)
	8-Aminoimidazo[1,2-a]pyrazine derivatives (compound 11)	Virtual HTS; docking studies; <i>in vitro</i> ATPase assays	Inhibits VirB11 ATPase activity	<i>Helicobacter pylori</i> VirB11 homolog (HP0525)
	Unsaturated fatty acids (2-hexadecynoic acid)	Luminescence-based high-throughput conjugation (HTC) assays	Inhibits TrwD ATPase activity	<i>Escherichia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> spp.; IncF, IncW, IncH, IncI, IncL/M, IncX conjugative plasmids
	Heterocyclic 2-pyridones (C10)	Targeted, phenotypic cell-based screen of heterocyclic 2-pyridones	Unknown	<i>Helicobacter pylori</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Escherichia coli</i> pKM101 and R1-16 conjugative systems

Tableau 1. – Exemples des molécules inhibitrices des T4SSs.

Tableau adapté de (14).

1.7 Objectifs de la thèse

Les T4SSs représentent l'outil de virulence chez plusieurs bactéries pathogènes, en plus de leur contribution majeure dans les échanges génétiques et la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques. Le développement des inhibiteurs contre les T4SSs est considéré une approche antimicrobienne qui cible spécifiquement les pathogènes et qui peut limiter la propagation des gènes de résistances aux antibiotiques. Dans cette thèse, l'objectif est de mieux comprendre le mécanisme de transfert du substrat à travers les T4SSs. Pour cela nous avons choisi d'étudier le pilus, qui représente la partie extracellulaire du T4SS et qui favorise la translocation du substrat et le contact à la cellule cible. Récemment, la structure du pilus de trois plasmides de type F était résolue par cryo-microscopie électronique, et les résultats ont montré la présence du phospholipide dans le pilus à une stœchiométrie de 1 :1 avec la protéine piline TraA. Les contacts entre le phospholipide et les sous unités de TraA ont été montrés importants pour l'assemblage du pilus, et les auteurs suggèrent un rôle du phospholipide dans la charge totale du lumen du pilus qui peut affecter le transfert de l'ADN à l'intérieur du pilus durant la conjugaison ou bien l'infection par des phages.

Dans le premier chapitre, nous voulons savoir si les pili des T4SSs adaptent la même architecture générale, et si les phospholipides entrent dans la composition d'autres types de pili. Contrairement aux pili F, les pili des plasmides Ti et pKM101 sont fragiles et ils ne sont pas rétractables. Ainsi, nous avons résolu la structure du pilus du plasmide Ti chez *A. tumefaciens*, et le pilus du plasmide IncN pKM101 chez *E. coli*, par cryo-microscopie électronique. Les structures des pili Ti et pKM101 montrent la présence d'un phospholipide, et nous avons analysé l'identité du phospholipide dans le pilus Ti par spectrométrie de masse. Nous avons ensuite étudié l'effet de mutation de certaines acides aminés dans la séquence de la protéine VirB2, sur la stabilité de la protéine, sur l'assemblage du pilus Ti et sur le taux de la virulence chez *A. tumefaciens*.

La protéine VirB5 est un composant mineur du pilus et elle se localise sur le bout du pilus Ti chez *A. tumefaciens*. VirB5 entre aussi dans la composition de l'IMC où elle représente probablement le site de nucléation du pilus. Dans le deuxième chapitre, nous étudierons un homologue de VirB5,

la protéine TraC du plasmide pKM101, qui a été détectée dans la membrane, le périplasma, la surface de la cellule, et sécrétée sous forme soluble dans le milieu extracellulaire. Les études précédentes faites sur la forme soluble de TraC purifiée du périplasma, suggèrent que TraC est un monomère. Cependant, nous n'avons pas des données sur la forme membranaire et sécrétée de TraC. Nous avons donc purifié et caractérisé les trois formes de TraC (soluble périplasmique, membranaire et sécrétée) et nous avons ensuite étudié l'effet de TraC purifiée sur le taux de la conjugaison et sur l'infection par des phages spécifiques au plasmide pKM101. Notre hypothèse est que TraC représente le site d'adhésion des phages vu sa localisation extracellulaire. Enfin, nous avons visualisé TraC dans la cellule et durant la conjugaison par microscopie à fluorescence à haute résolution, pour voir s'il y a un changement de localisation de TraC durant la conjugaison et qui peut représenter le site de l'assemblage et de nucléation du pilus à la suite d'un signal déclenché par la présence de la cellule receveuse.

1.8 Justification de la méthodologie

-Biologie moléculaire

-Isolation et purification des pili

La formation des pili dépend de la présence des autres sous unités du T4SS. Il est donc impossible d'obtenir des pili *in vitro* à partir d'un assemblage spontané de leur composant majeur, le piline VirB2. Pour cela, il faut isoler les pili directement de la surface cellulaire, en utilisant une méthode très connue pour extraire les complexes extracellulaires, comme les flagelles, et qui consiste à faire passer les bactéries à travers une aiguille pour « raser » la surface cellulaire. Les pili des plasmides Ti et pKM101 sont connus d'être fragile et ils nécessitent un milieu de culture solide. Le nombre des pili Ti et pKM101 par cellule est relativement faible, et pour obtenir une quantité suffisante des pili pour les études structurales il faut un nombre élevé des bactéries. Les pilis ont été donc isolés à partir des bactéries provenant de 80 plaques de diamètre 15 mm. Pour purifier les pili des autres structures, comme les flagelles et les vésicules membranaires, un gradient de sucrose est appliqué, ce qui permet la séparation selon la taille des particules, sans endommager leurs structures natives.

-Préparation des vésicules membranaires (OMV)

Les vésicules membranaires (VM) sont des particules sphériques secrétées par les bactéries dans le milieu extracellulaire et mesurant généralement entre 50 et 250 nm. Elles contiennent de nombreuses protéines membranaires, cytoplasmiques et périplasmiques, ainsi que de l'ADN et de l'ARN. Pour étudier les VM, il faut les séparer des autres particules qui se trouvent à l'extérieure de la cellule, comme les flagelles, les pili et les protéines solubles, ainsi que des débris cellulaires provenant des bactéries lysées durant la culture cellulaire. Pour réaliser nos études sur les VM, nous avons utilisé une souche mutante qui ne produise pas des flagelles ni des pili.

La croissance bactérienne est arrêtée avant que la culture n'entre dans la phase stationnaire, car cela augmentera considérablement les contaminations par les débris cellulaires provenant des cellules mortes. Pour éliminer les bactéries et les débris cellulaires, la culture a été centrifugée deux fois à 10 000g pendant 20 min, et le surnageant obtenu a été passé à travers d'un filtre à 220 nm. Ce processus permet d'éliminer d'une façon considérable les contaminants et de conserver les VM. Ensuite, les VM sont collectées par une ultracentrifugation à 100 000g pendant 1 heure, avant d'être analysées par immunobuvardage et visualisées par microscopie électronique et fluorescente.

-Infection des plantes

L'infection des plantes par *A. tumefaciens* se traduit par la formation de tumeur, qui nécessite un T4SS fonctionnel. Pour tester l'effet de changement des résidus de VirB2 sur la fonctionnalité du T4SS, nous avons réalisé des tests d'infection sur la plante *Kalanchoë daigremontiana* en utilisant des souches exprimant VirB2 sauvage ou bien VirB2 modifiée. La présence de tumeur et sa taille représentent un moyen pour évaluer l'impact des mutations de VirB2 sur le taux de transfert de l'ADN-T vers les cellules de la plante.

-Infection par les phages Ike et PRDI

Les bactériophages Ike et PRDI reconnaissent et infectent les bactéries exprimant certains groupes des plasmides conjugatifs, comme le plasmide IncN pKM101. L'infection dépend de la présence du pilus du T4SS sur la surface cellulaire. Nous avons donc utilisé Ike et PRDI pour étudier la fonctionnalité de la protéine TraC, le composant mineur du pilus, à la suite des modifications de sa séquence (l'ajout de certaines étiquettes).

-Étude de la formation des complexes par crosslinking

Les interactions entre les protéines sont souvent faibles et transitoires, et parfois stables. L'utilisation d'un agent de crosslinking permet la stabilisation des interactions par la formation des liaisons covalentes ou bien ioniques. Cette technique permet aussi d'avoir une idée sur la proximité des sous unités, qui vont se lier s'ils se trouvent à une distance égale ou bien inférieure à la taille de l'agent de crosslinking. Nous avons utilisé le disuccinimidyl suberate (DSS) qui possède des esters N-hydroxysuccinimide (NHS) réagissant avec les amines primaires de la chaîne latérale des lysines ou bien de l'extrémité N-terminale de chaque protéine. DSS peut traverser la membrane cellulaire et la distance entre ces deux extrémités -NHS du DSS est 11.4 Å.

-Chromatographie d'exclusion stérique

La présence des contaminants à la suite de la purification d'une protéine par des méthodes d'affinité (utilisant une étiquette spécifique), représente un problème pour les études qui dépendent de la pureté de l'échantillon. La chromatographie d'exclusion stérique permet la séparation des protéines, ou bien des complexes, selon leurs poids moléculaires, ainsi elle représente l'étape ultime à la suite de la purification par affinité. Nous avons appliqué cette méthode pour obtenir la protéine TraC pure.

-Biologie structurale

-Microscopie électronique à transmission

Pour contrôler la pureté et la qualité des échantillons des pili purifiés, ainsi que pour confirmer la sécrétion des vésicules membranaires, nous avons utilisé la microscopie électronique à transmission en coloration négative. L'échantillon a été déposé sur une grille puis coloré avec l'uranyle acétate. Cette technique représente un moyen efficace et rapide pour visualiser directement les structures présentes dans un échantillon. Cependant, la résolution représente un

facteur limitant pour cette technique, et la préparation de l'échantillon peut affecter l'état native des complexes.

Pour obtenir une structure à haute résolution des pili, nous avons utilisé la microscopie cryo-électronique à transmission. Cette technique permet de conserver l'état natif de l'échantillon dans une couche de glace, sans le besoin de la coloration négative, ce qui augmente considérablement la résolution finale.

-Microscopie à fluorescence à super-résolution

Pour localiser la protéine TraC dans la cellule, nous avons utilisé la microscopie à fluorescence à super-résolution. Cette méthode nous permet de visualiser la protéine dans la cellule à un résolution optimale de ~100 nm, et d'étudier l'effet de certaines conditions sur sa localisation *in vivo*. Deux approches ont été utilisés pour confirmer la localisation de TraC : 1-TraC a été fusionnée avec la protéine fluorescente mCherry, et sa localisation cellulaire a été déterminée par le signal émis de mCherry, 2- par immuno- marquage de TraC_{Flag} par un anticorps primaire anti-Flag et un anticorps secondaire marqué avec la molécule fluorescente Alexa fluor 594. Le but d'utiliser deux approches est pour éliminer toute possibilité d'une mauvaise localisation de la protéine à la suite des étapes de préparation de l'échantillon avant la visualisation sous le microscope.

Chapitre 2 – Article 1

Cet article a été soumis au journal « Structure » en juin 2022 (Amro J., Black C., Jemouai Z., Rooney N., Daneault C., Zeytuni N., Ruiz M., Huy Bui K. and Baron C. (2022) Cryo-EM structure of the *Agrobacterium tumefaciens* T-pilus reveals the importance of positive charges in the lumen).

Pour ce papier je suis premier auteur, j'ai réalisé les expériences permettant d'obtenir des échantillons des pili convenables pour la microscopie cryo-électronique et les analyses lipidomiques. Plus précisément, j'ai réalisé l'extraction et la purification des pili, l'analyse des échantillons des pili par la coloration à l'argent des SDS-PAGE (silver staining) et par immunobuvardage (western blot), ainsi que la visualisation des pili par la microscopie électronique en coloration négative. J'ai également participé à l'analyse des résultats obtenus et à l'écriture des révisions du manuscrit. Zakaria Jemouai a déterminé les conditions idéales pour la réalisation des expériences de microscopie cryo-électronique et a collecté les données brutes sur le Titan Krios. Nathan Rooney a réalisé les expériences pour construire et étudier les mutants de VirB2. Caroline Daneault et le Dr. Mathieu Ruiz ont conduit les expériences de l'analyse lipidomique des pili T et N et de la membrane d'*A. tumefaciens*. Corbin Black et le Dr. Khan Huy Bui ont analysé les données obtenues par la microscopie cryo-électronique et réalisé la structure 3D des pili T et N. La Dre. Natalie Zeytuni a participé à l'analyse des résultats obtenus. Le Dr. Christian Baron a discuté et conçu les expériences et écrit le manuscrit avec la contribution de tous les auteurs.

**Cryo-EM structure of the *Agrobacterium tumefaciens* T-pilus
reveals the importance of positive charges in the lumen**

¹Jaafar Amro, ²Corbin Black, ¹Zakaria Jemouai, ¹Nathan Rooney, ³Caroline Daneault, ²Natalie Zeytuni, ^{3,4}Matthieu Ruiz, ²Khanh Huy Bui and ¹Christian Baron*

¹Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine,
Université de Montréal, Québec, Canada

²Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine and Health Sciences
McGill University, Québec, Canada

³Montreal Heart Institute and ⁴Department of Nutrition, Faculty of Medicine,
Université de Montréal, Québec, Canada

Keywords: Type IV secretion system, pili, VirB2, plasmid, conjugation, *Agrobacterium tumefaciens*, pKM101

*Corresponding author

Abstract

Agrobacterium tumefaciens is a natural genetic engineer that transfers DNA into plants and this is the most frequently applied process for the generation of genetically modified plants. DNA transfer is mediated by a type IV secretion system localized in the cell envelope and extracellular T-pili. We here report the cryo-electron microscopic structures of the T-pilus at 3.2Å resolution and that of the related plasmid pKM101-determined N-pilus at 3Å resolution. Both pili contain a main pilus protein (VirB2 in *A. tumefaciens* and TraM in pKM101) and phospholipids arranged in a 5-start helical assembly. They contain positively charged amino acids in the pilus lumen and the lipids are positively charged in the T-pilus (phosphatidylcholine) conferring overall positive charge to the lumen. Mutagenesis of the lumen-exposed Arg91 residue in VirB2 resulted in protein destabilization and loss of pilus formation. Our results reveal that different phospholipids can be incorporated into type IV secretion system pili and that the charge of the lumen is of functional importance.

Introduction

The process of DNA transfer from bacteria into other organisms by conjugation is of fundamental and applied scientific importance. Conjugative transfer of DNA is extensively applied in biotechnology for the creation of genetically modified plants using *Agrobacterium tumefaciens* and for the transient expression of proteins for vaccine production (1-3). Simultaneously, bacterial DNA conjugation has significant health implications as plasmid transfer is a major factor contributing to the spread of antibiotic resistance genes (4, 5). Conjugation is mediated by type IV secretion systems (T4SS) that comprise 12 proteins (VirB1 to VirB11 and VirD4) in the archetypical model from *A. tumefaciens* (6-8). The T4SS assembles in the bacterial cell envelope and forms a transmembrane complex and surface-exposed pili in Gram-negative bacteria (9-11). This translocation machinery is highly adaptable to different substrates and it has the capacity to translocate DNA as well as protein substrates across the cell envelope, e.g., single-stranded DNA molecule linked to VirD2 as well as VirE2 in the case of *A. tumefaciens*. The T4SS-determined pilus from *A. tumefaciens* (T-pilus) comprises the main component VirB2 along its entire length and the minor component VirB5 that localizes at the pilus tip (12-14). This primary organization is shared by many T4SS such as the conjugative pili from the IncN plasmid pKM101 (major component TraM, minor component TraC) and even the distantly related T4SS from the human pathogen *Helicobacter pylori*, which carries a tip-localized VirB5 homolog (CagL) (15-17). In contrast, T4SS-determined pili from more distantly related conjugation systems such as plasmids RP4 and F are not known to contain minor components at the pilus tips, but their overall structure is conserved and their main components are homologs of VirB2 (18-20). Although bacterial conjugation has been known for more than 70 years, we are still uncertain whether the T4SS's substrates (single-stranded DNA and proteins) are actually translocated through the elongated pilus (18, 21-23). Alternatively, this extracellular structure may mediate donor-recipient cell interaction, e.g., via VirB5-homologous tip proteins, followed by pilus retraction, cell fusion and DNA transfer (24, 25).

VirB2 homologs are relatively small proteins comprising 100 to 140 amino acids that often contain long signal peptides. Following their enzymatic processing, the mature 60 to 80 amino acids long pilins are predicted to remain anchored to the inner membrane by two transmembrane

helices (20, 26). The biochemistry of the main pilus components VirB2 from *A. tumefaciens* and of its homolog TrbC from the RP4 plasmid has been well characterized and previous data suggested that both undergo specific processing reactions leading to the formation of cyclic peptides (20, 27). However, the cryo-electron microscopy (cryo-EM) analyses of the F-like pilus from the pED208 plasmid and the IncFIIK pilus from the pKpQIL plasmid structures that were previously determined at 3.6Å and 3.9Å, respectively, do not provide any evidence for cyclic peptides (28, 29). Interestingly, their structural analysis revealed the presence of phosphatidylglycerol lipids that were present in a 1:1 stoichiometry in relation to the VirB2-homologous pilin TraA in F-pili. Amino acids from TraA that are exposed to the pilus lumen are overall positively charged, but the presence of phosphatidylglycerol reverses the electrostatic potential to create a negatively charged environment (28, 29). The discovery of these phospholipids may impact pilus function since negatively charged DNA may be transferred through the lumen of the pilus during the conjugation process.

Here, we present the cryo-EM analysis of the *A. tumefaciens* T-pilus and the pKM101 N-pilus at 3.2 and 3Å resolution. Analysis of these structures did not provide evidence for the presence of cyclic peptides, and instead, the T-pilus may contain a novel protein modification at a Cys residue. Intriguingly, we showed that the T-pilus contains the positively charged lipid phosphatidylcholine conferring an overall positive charge to its lumen, whereas the N-pilus contains phosphatidylglycerol. This finding has implications for the passage of substrates across the T-pilus and mutagenesis of positively charged Arg91 of VirB2 demonstrates that its charge is of functional importance.

Material and Methods

Bacterial strains and culture conditions

A. tumefaciens strain C58 was cultivated on AB minimal medium in the presence of 200 μ M of the plant metabolite acetosyringone for virulence gene induction (13, 30) at 20°C. *E. coli* strain BL21 carrying pKM101 plasmid was cultivated on LB agar with 100 μ g/ml ampicillin for plasmid maintenance at 37°C (12, 14). For large-scale purification, bacteria were cultivated on up to 80 agar plates of 15 cm diameter.

Tumor formation by *A. tumefaciens*

The wild-type strain C58 and its *virB2* deletion variant CB1002 (31) complemented with plasmids expressing VirB2 or mutant derivatives were applied to wounded leaves of the plant *Kalanchoë diargremontiana*, followed by scoring of tumor formation 2-3 weeks after infection (13).

Site-directed mutagenesis.

The gene encoding VirB2 was mutagenized using QuikChange mutagenesis to change amino acid 91 from Arg to Ala, Glu and Lys and the mutant proteins were expressed in strain CB1002 from plasmid pTrc200 as described (31).

Expression of VirB proteins and identification of pilins

The levels of VirB proteins (VirB2, VirB5 and VirB8) were analyzed after the separation of samples by SDS-PAGE on 15% Tricine gels (32) and western blotting with specific antibodies as described (13, 14, 33). VirB2 and TraM were identified by silver staining of SDS gels, excised from the gel, followed by proteomics analysis (proteolytic digestion followed by LC-MS/MS) in the institutional service facility at the Institut de recherche en immunologie et cancérologie (IRIC) at Université de Montréal.

Isolation of pili

The cells were gently scraped off agar plates into 10 mM Na phosphate buffer (pH 5.3) and collected by centrifugation at 15,000xg. Pili were released from the cells by passing the bacterial suspension through a hypodermic needle (25 gauge) five times. Next, the cells were removed by centrifugation at 15,000xg, and the supernatant was subjected to centrifugation at 150,000xg to collect the pili fraction. Crude pili (contaminated with bacterial debris and membrane vesicles) were resuspended in 10 mM Tris buffer (pH 7.5, 100 mM NaCl) and 0.5% sodium deoxycholate and further fractionated by velocity sedimentation in a 20-70% linear sucrose gradient at 150,000xg. Fractions containing pili were identified by SDS-PAGE and Western blotting with VirB2- and VirB5-specific antibodies and silver staining, pooled, diluted, and concentrated by centrifugation at 150,000xg to remove the sucrose. Pili were then resuspended in 100 µl of 10 mM Tris buffer (pH 7.5, 100 mM NaCl) followed by visualization by electron microscopy.

Electron microscopy

For screening of sample quality, 300 mesh copper grids with standard pure carbon film (5 nm) were negatively glow-discharged, and samples were spotted onto the grids and side blotted using Whatman filter paper, followed by staining with 0.75% uranyl formate solution, side blotting and drying at room temperature. The samples were imaged using an FEI Tecnai T12 120 kV TEM

(equipped with Gatan 2K AMT and FEI Eagle 4K cameras) in the Université de Montréal EM facility.

Cryo-EM grid preparation was performed using a Vitrobot Mark IV at 4°C and 100% humidity to blot and plunge freeze grids in liquid ethane. For the T-pili, 3 μL of the sample was repeatedly applied and manually blotted three times onto 300 mesh R1.2/R1.3 C-flat Holey carbon grids (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) using the multiple blotting technique prior to the Vitrobot step to increase the concentration of pili (34). For the N-pili, the same method as for the T-pili was used, except that C-flat grids were modified to further increase pilus concentration by sputtering 2 nm gold nanoparticles on one side and adding graphene oxide on the other side. The sample was applied on the gold-coated side of the grids before blotting.

Data from vitrified grids were collected by the FEI Titan Krios 300 kV Cryo-STEM equipped with Gatan GIF BioQuantum LS and Gatan K3 Direct Detection camera at the Facility for Electron Microscopy (FEMR) at McGill University. The data were acquired using SerialEM (35) using beam shift with a pattern of 4 holes per movement and 4 movies per hole at 81,000 times magnification and a pixel size of 1.09 Å. The defocus ranged between 0.5 μm to 3.0 μm and movies consisted of 40 frames with a total of 40 $e^-/\text{Å}^2$. A total of 4,224 and 3,744 movies were collected for T-pili and N-pili, respectively.

Single particle electron microscopy data analysis.

Data were processed using CryoSPARC (36). After importing raw movies, patch motion correction, and estimating the contrast transfer function (CTF), particles were manually picked from a subset of the data, extracted and classified for template-based autopicking. Best representative classes were used as templates for filament tracer with a separation distance of 14Å for both T-pili and N-pili. After particle extraction, 2D classification and selection of best classes, 123,100 particles for T-pili and 26,932 particles for N-pili at 256 x 256 box size were selected. Initial volumes without symmetry imposed were constructed using a cylinder as a reference. Using these initial volumes, the helical rise and twist were determined to be 13.832Å and 32.579 degrees for T-pili and 13.839Å and 32.578 degrees for N-pili with 5-start helices configuration. After

iterative helical refinement, local and global CTF refinement and symmetry expansion (615,500 particles for T-pili, 134,660 particles for N-pili) were conducted, leading to maps that were refined at 3.2 Å and 3Å for the T- and N-pili, respectively. Initial models were generated automatically using map_to_model job Phenix function (37), then manually fixed in COOT (38) and real space refined using Phenix (37). The pilus assembly was symmetrized using ChimeraX. Visualization was done with Chimera and ChimeraX (39, 40).

For the 3D classification of the T-pili, we first created a mask containing only one lipid and four surrounding VirB2 molecules. Then, we created four references: (1) with full lipid density; (2) with no lipid density; (3-4) with either one of the lipid's fatty acid tails using the Volume Eraser function of Chimera. For the 3D classification using CryoSPARC, we classified the symmetry expanded particles using "input" mode with four initial references within the mask of one asymmetric unit above to perform a supervised classification to see whether we can extract the heterogeneity of lipids in our data. The distributions of the four classes are 50%, 21%, 12% and 17%, respectively. This indicates that the initial references did not bias the classification. In addition, this distribution is consistent with the heterogeneous nature of the lipid composition revealed by the lipidomic analysis. To further remove the initial model bias, we refined each class with the reference containing the full lipid density. As the resulting cryo-EM map of each class always shows the correct lipid density as indicated in the 3D classification, we conclude that our observation of lipid heterogeneity origin is not a result of any input model's bias.

Pilus inner and outer diameter measurements

We first identified the innermost or outermost residues located on the pili (Arg91 and Gly121 for T-pilus, Pro69 and Ser97 for N-pilus, and Asp2 and Thr40 for F-pilus – PDB 5leg). Then, we calculated the X and Y coordinate of the center of the pilus by averaging all the X and Y coordinates of the CA of the residues for the innermost and outermost residues respectively. The inner and outer radii from each residue to the calculated center were calculated and averaged separately. The average and standard deviation for the inner radius is $13.22\text{\AA} \pm 0.02$ for T-pilus, $12.00\text{\AA} \pm 0.02$ for

N-pilus and $15.23\text{\AA} \pm 0.07$ for T-pilus. The average and standard deviation for the inner radius is $39.78\text{\AA} \pm 0.02$ for T-pilus, $38.81\text{\AA} \pm 0.03$ for N-pilus and $43.23\text{\AA} \pm 0.11$ for F-pili.

Pilus alignment

We used ChimeraX matchmaker function to align VirB2, TraM and TraA.

Interaction analysis

The interaction analysis between different pilins and between pilins and phospholipid was done by PDB sum (41). The interactions between lipid and pilin were visualized with LigPlot+ (42). The surface charges of T-pilus, N-pilus and F-pilus were calculated using ChimeraX.

Lipidomics analysis

Lipids from pilus samples and bacterial membrane fractions were processed using the liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry (LC-QTOF / MS-MS) pipeline at the Montreal Heart Institute as previously described (43). Briefly, pilus samples and bacterial membrane fractions (in 100 μl) were processed after spiking samples with the following six lipid standards: LPC 13:0, PC14:0/14:0, PC 19:0/19:0, PE17:0/17:0, PS12:0/12:0 and PG15:0/15:0. Lipids were extracted into a methyl *tert*-butyl ether (MTBE/methanol/ H₂O) mixture, followed by further extraction with ethyl acetate, drying under vacuum, and solubilization in methanol/chloroform by vortexing and sonication. The samples (2 μl for pili and 1 μl for bacterial membrane fractions) were injected into a 1290 Infinity HPLC coupled to a 6550 accurate mass QTOF MS system (Agilent) equipped with a dual electrospray ionization (ESI) source (Agilent) and analyzed in positive scan mode. Lipids were eluted using a Zorbax Eclipse plus C18 reverse-phase column (2.1 x 100 mm, particle size 1.8 μm , Agilent) over 83 min at 40°C using a gradient

of solvent A (0.2% formic acid and 10 mM ammonium formate in water) and B (0.2% formic acid and 5 mM ammonium formate in methanol/acetonitrile/MTBE, 55:35:10 (v/v/v)). MS data processing was achieved using Mass Hunter Qualitative Analysis software package (version B.06, Agilent). Finally, lipid annotation, including FA side chains, was achieved by alignment with our in-house database containing more than 500 lipids which have been previously identified in human plasma by MS-MS analysis for which spectra were manually interpreted, similar to Godzien et al. (44).

Results

Purification of *Agrobacterium* T-pili and pKM101 N-pili.

While the F-like pili can be purified from bacteria cultivated in liquid cultures (28, 29), T-pili and N-pili can be radially detached from their bacterial cells. Accordingly, therefore both the T-pili and N-pili were purified from bacteria grown on semi-solid media. To this effect, *A. tumefaciens* wild-type strain C58 was cultivated on minimal medium agar plates in the presence of the plant metabolite acetosyringone to induce expression of the *virB* genes (13, 14). In contrast, the *tra* genes encoding the pKM101 T4SS are constitutively expressed at a low level (15) and for pili isolation, we cultivated *Escherichia coli* strain BL21 carrying the plasmid on LB agar plates. The pili were purified by shearing concentrated bacteria samples through hypodermic needles, differential centrifugation to separate the cells, ultracentrifugation to enrich the pili and finally, sucrose gradient sedimentation (Fig. 1). In the case of *A. tumefaciens*, the different purification steps were monitored by Western blotting with VirB2- and VirB5-specific antisera and silver staining revealing increasing purity and mass spectrometry confirmed the presence of VirB2 in the purified samples (Fig. 1A and supplementary Fig. 1). Surprisingly, the signal for the tip-localized VirB5 was lost after the initial purification steps, indicating that the tip protein may be easily broken off and/or detached by the addition of sodium desoxycholate required for optimal purification of the sample. IncN pili were purified from *E. coli* using the same procedure, but due to the lower expression of these pili, the final sample was not as pure as the T-pili sample. Since we have no

specific antisera developed against the main pilus component TraM, the purification was monitored by silver staining and the identity of the pilin in the final sample was confirmed by mass spectrometry (Fig. 1B and supplementary Fig. 1). The purified pili were next analyzed by negative staining and transmission electron microscopy (TEM), showing the presence of ~10 nm diameter T-pili (Fig. 1C) as well as ~10 nm diameter N-pili (Fig. 1D).

Cryo-EM analysis reveals that T-pili and N-pili comprise 5-start helical assemblies

The quality of the samples comprising T- and N-pili was next assessed by cryo-EM on a lower resolution 100 kV instrument and whereas their concentrations were not high (2-3 pili per hole for the T-pilus and 4-5 pili per hole for N-pili), they readily entered the holes of the EM grids (supplementary Fig. 2A, B) enabling subsequent data collection on a 300 kV Titan Krios instrument. Data were processed using CryoSPARC, which resulted in 3.2 Å and 3Å resolution maps for the T- and N-pili, respectively (supplementary Fig. 2C, D, E). The overall dimensions of T-pili (outer diameter of 79.6Å, lumen diameter of 26.4Å; Fig. 2A, B) and N-pili (outer diameter of 77.6Å, lumen diameter of 24.0Å; Fig. 2F, G) are similar. The major pilus components VirB2 (Fig. 2C) and TraM (Fig. 2H) are arranged in 5-start helical assemblies and the helical rise and helical twist are comparable (13.863Å and 32.579° for T-pilus; 14.708 Å and 30.235° for N-pilus) (Fig. 2E, I). Analysis of the VirB2-VirB2 interactions in the T-pilus and TraM-TraM interactions in the N-pilus revealed that each pilin subunit forms extensive interactions with six other subunits (areas of interaction interface shown in supplementary Fig. 3A, B, C) primarily via hydrophobic interactions (supplementary Fig. 3D, E). The four N-terminal amino acids (Q/S/A/G) of VirB2 (Fig. 2C) are not modeled due to flexibility. In contradiction with the previous proteomics analysis of VirB2 (20), both proteins do not form cyclic peptides. Interestingly, we observed an extended electron density on amino acid Cys64 of VirB2 (Fig. 2J) that could not be resolved at the current resolution and proteomics analysis did not reveal the identity of the modification either. We did not observe a comparable extended density on the corresponding amino acid Gln41 of TraM (Fig. 2K).

The *A. tumefaciens* T-pilus contains phosphatidylcholine lipids

Lipids are present in a one-to-one stoichiometry to the TraA pilin of the F-pilus (28) and we observed similar amounts of phospholipids in the T-pilus (Fig. 3A, B) and the N-pilus (supplementary Fig. 4A, B). The electron density of the lipid in the N-pilus is similar to phosphatidylglycerol in the F-pilus (Fig. 3C, D), but the lipid in the T-pilus has an extended head group that could be modeled to fit phosphatidylcholine (Fig. 3C). To identify this lipid, we subjected cell membranes and isolated T-pili to lipidomics analysis revealing the predominant presence of diacyl- as well as monoacyl-phosphatidylcholine in the membranes and the isolated T-pili (Table 1). The phospholipids are deeply embedded in the helical assembly (Fig. 3E, F for T-pilus and supplementary Fig. 4C for N-pilus), and the acyl groups of each molecule interacts with five pilins primarily via hydrophobic interactions (Fig. 3F and supplementary Fig. 4C, E, F). In addition, the choline head group is exposed to the lumen of the pilus (Fig. 3B), contributing to its overall positive charge (see below).

The lipidomic analysis revealed that the lipids we succeeded to annotate in the T-pili are heterogeneous and composed primarily of monoacyl- and diacyl-phosphatidylcholine (Table 1), which does not reflect in our consensus cryo-EM map. To probe the heterogeneity of lipid in T-pili, we attempted to perform a 3D classification at the lipid-containing pocket (Fig. 4A-C). Since unsupervised classification is not sensitive enough to reveal the small difference in lipid structure, we performed a supervised classification based on our knowledge from the lipidomic analysis (Materials & Methods). The symmetry expanded particles are classified into four input references corresponding to diacyl-phosphatidylcholine, no lipid density and monoacyl-phosphatidyl choline-like densities by deleting either fatty acid tails from the original diacyl-phosphatidylcholine density. The 3D classification revealed the heterogeneous nature of the lipids within the lipid pocket. While 50% of the particles contain diacyl-phosphatidylcholine density, 21% do not contain any lipid and 29% present monoacyl-phosphatidylcholine-like densities (Fig. 4D). In addition, the monoacyl-phosphatidyl choline-like densities in class 3 and 4 look larger than expected, indicating a more flexible structure when only monoacyl-phosphatidyl choline is present.

Comparative analysis of T-, N-, and F-pili

The availability of two novel and distinct structures of T4SS-determined pili enabled a comparative analysis with the pED208-encoded F-pilus (28). The overall dimensions of the three pili are similar even if the width and the lumen of the F-pilus (external/internal diameter: 86.5Å / 30.5Å) are larger than those of the T- (79.6Å / 26.4Å) and N-pilus (77.6Å / 24.0Å) (Fig. 5A). Despite the low primary sequence identities (9-19%) between the main components of the three pili, their overall structures and fold are very similar (Fig. 5B-D). The matured and processed version of the main components in all three pili; VirB2 (74 amino acids), TraM (70 amino acids) and TraA (64 amino acids), are all short proteins that comprise two hydrophobic α -helices and a loop region that is exposed to the lumen of the pilus that contains positively charged Arg, Lys or His residues (Fig. 5B). VirB2 and TraM are more structurally similar than TraA (Fig. 5C). Despite their structural similarity, the pilins contain differently charged phospholipids with distinct conformations (Fig. 5B) that are likely to be associated with the primary sequence alternations and may impact their function.

The F-pilus (28) and the N-pilus (Fig. 5B) contain phosphatidylglycerol and their lumen is overall negatively charged (supplementary Fig 6. A-F). In contrast, the lumen of the T-pilus is overall positively charged and the presence of the lumen-exposed choline group of the phospholipid further increases the positive charge (Fig. 5E). In addition, the outside surfaces of T-pilus, N-pilus and F-pilus display different charge patterns (supplementary Fig. 6A-C). The T-pilus is mostly positively charged while the N-pilus and F-pilus show patches of positive and negative charges.

The positive charge of Arg91 is important for the functionality of the *A. tumefaciens* T-pilus

To assess the importance of positive charges in the lumen of the T-pilus, we changed the lumen-exposed amino acid Arg91 of VirB2 to Ala (no charge), Glu (negative charge) and Lys (reduced positive charge). The VirB2 wild type and mutant proteins were expressed in *virB2* deletion strain CB1002, followed by virulence gene induction and isolation of T-pili. In parallel, we also infected

Kalanchoë diargremontiana plants to assess functional complementation. Whole-cell lysates and pilus fractions were analyzed by SDS-PAGE and western blotting with VirB2-specific antiserum revealing the presence of the main pilus component in cells and pilus fractions from C58 wild type *Agrobacterium* and CB1002 complemented with VirB2 (Fig. 6A). In contrast, similar to a previous report (26) after complementation of CB1002 with the VirB2R91A mutant the protein was neither detected in cell lysates nor in pilus fractions. Reduced amounts of the VirB2R91K and of the VirB2R91E mutants were detected in cell lysates of complemented CB1002, but these proteins were not detected in pilus fractions. Consistent with these observations, only expression of VirB2 wild-type protein led to functional complementation (tumor formation) after infection of *K. diargremontiana* plants with CB1002 (Fig. 6B), underlining the importance of positively charged amino acid Arg91 for pilus assembly and function.

Discussion

The discovery of abundant amounts of lipids in the F-pilus was a groundbreaking discovery changing the way we contemplate the biology of this cellular appendix. Since its discovery more than 70 years ago, it has been suspected that DNA may be transferred between cells through an extended pilus (45). However, there is still no direct evidence for this hypothesis. According to an alternative model, the pilus may primarily mediate cell-cell contact formation, followed by DNA transfer between closely juxtaposed donor and recipient cells as observed by EM (22, 23) and fluorescence microscopy (24, 25). The present study does not directly address this substrate transfer question but rather supplements the growing body of evidence indicating a significant amount of phospholipid presence in T4SS-determined pili (28, 29). Considering that phospholipids are present in a one-to-one stoichiometry of the pilins, the pilus could be considered as an extension of the bacterial membrane that contributes to cell-cell fusion, followed by the translocation of DNA and other substrates across the T4SS that may or may not include a shortened pilus channel during the transfer process.

The contribution of the lipids to pilus function is still unclear and in previous publications, it was speculated that their negative charge contributing to a negatively charged lumen of the pilus may repel negatively charged DNA and thereby contribute to its transfer (28, 29). This hypothesis

was based on the presence of phosphatidylglycerol in F-like pili and this lipid is likely also present in the N-pili described in this work. However, the T-pili from *A. tumefaciens* contains phosphatidylcholine and its lumen is overall positively charged, which is not consistent with a model implying that DNA is being repelled by the negatively charged lumen of the pilus. We mutated Arg91, which is also exposed to the lumen of the pilus, to test the importance of positive charges, and surprisingly, all the changes (Arg91 to Ala, Glu or Lys) reduced the stability of the pilin in the cell and abrogated pilus formation. In contrast, the change of Arg94 (Arg39 of the processed pilin) to Glu did not impact pilus assembly and conjugation of pED208, but it negatively affected phage infection contributing to the notion that the assembled pilus may serve as a conduit for naked DNA (28). Arg94 is not conserved in other F-like pili, but some changes of closely juxtaposed Lys residues that are probably exposed to the lumen of these pili reduced phage infection and conjugation efficiency, but not pilus assembly (46). These results demonstrate that Arg91 and its charge are crucial for VirB2 pilin stability and function, which is quite distinct from the effects of similar changes in F-pili. It will be interesting to assess in the future whether this difference is due to the difference in lipid content (phosphatidylglycerol vs. phosphatidylcholine) and whether the incorporation of these lipids is specific or a diffusion-mediated process driven by the composition of the bacterial membrane.

The discovery of cyclic pilins in VirB2 and its homolog TraC from the RP4 plasmid were intriguing and we have no straightforward explanation for the difference in our results obtained by cryo-EM from previous proteomics-based approaches. Purified *A. tumefaciens* and RP4 pilins were digested with proteases, followed by sequencing and the absolute molecular mass of the processed pilin lacked 18 Da, which was attributed to the formation of an N- to C-terminal peptide bond (20, 27). We did not observe densities for the N-terminal amino acids in VirB2 (QSAG), but due to the distance between the terminal amino acids, it was not possible to model these into a cyclic structure. Nevertheless, our results are consistent with the results of cryo-EM analyses of F-like pili and cyclic versions of the TraA pilins were not observed in both cases (28, 29). The additional density observed on Cys64 of VirB2 may be key to explaining this discrepancy. In principle, this amino acid could form a thioether link with Ser111, thereby forming a cyclic structure and this possibility would be consistent with the results of previous studies (20, 27). However, Cys64 is not essential and changes of this amino acid to Ser or Ala only slightly reduced bacterial virulence at elevated

temperatures (26, 47). Therefore, cyclisation may not be essential for the assembly and function of T4SS-determined pili.

Pioneering work has been published on F-pili that are actually quite distinct from T-pili and N-pili described here (28, 29). Similarly, there are large differences in the protein composition of the T4SS that are much more complex in the case of F-pili (48). F-like pili are often N-terminally acetylated, but this modification is not required for pilus function (46). In contrast, the tip-localized VirB5/TraC proteins are essential components of the *Agrobacterium* and pKM101 secretion systems and they are believed to be involved in contact formation with host cells. In addition, the width and lumen of F-pili are significantly wider than that of T- and N-pili and amino acid changes in the lumen have very different effects on pilus function. Finally, the phospholipids in the T-pili confer a positive charge to the lumen of the pilus and our results suggest the presence of di-acetylated as well as mono-acetylated entities. These differences suggest that there may be significant functional differences between F-like and T-/N-like pili that warrant future studies aimed at elucidating the molecular details of the mechanisms of these fascinating and adaptable macromolecular conduits.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC, #RGPIN-2017-05123) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, #398288 and #274108) to C.B., funding from FRQNT (Établissement de la relève professorale, #297339) to N.Z., funding from CIHR (PJT-156354) and NSERC (#RGPIN-2016-04954) to H.B. We are grateful to staff at the FEMR at McGill, Dr. Kaustuv Basu and Kelly Sears and at the Université de Montréal EM facility for technical support and assistance.

Author contributions

J.A. designed and carried out experiments and analyzed data; C.B. analyzed data; Z.J. designed and carried out experiments and analyzed data; N.R. carried out experiments and analyzed data; C.D. carried out experiments and analyzed data; N.Z. analyzed data; M.R. designed experiments

and analyzed data; H.B. designed experiments and analyzed data; C.B. designed experiments, analyzed data and wrote the manuscript with input from all the co-authors. All co-authors have approved the final version of this manuscript.

Data Availability

The data produced in this study are available in the following databases:

- Cryo-EM maps of T-pili and N-pili: EMDB EMD-XXXXX and EMD-XXXXX

(<https://www.emdataresource.org/EMD-XXXXX>)

- Model coordinates of T-pili and N-pili: PDB YYYYY and YYYYY

(<https://www.rcsb.org/structure/YYYYY>)

Tables

Table 1. Lipidomics analysis of purified T-pili and membranes.

Mass spectrometry analysis of the lipids extracted from the T-pilus and *A. tumefaciens* membranes. (A) Comparison of identified lipid entities extracted from the T-pilus, and membranes from acetosyringone- induced (AS) and non-induced *A. tumefaciens* (n = 1). (B) Normalized area under the curve (AUC) values of specifically identified lipids extracted from the T-pilus, reflecting the signal intensity and relative abundance of each lipid (n = 3) that were annotated using the in-house database previously validated by MS/MS analysis.

FA: fatty acid, LPC: monoacylglycerophosphocholine, PC: diacylglycerophosphocholine, LPE: monoacylglyceroethanolamine, PE: diacylglyceroethanolamine, CE: steryl ester, DG: diacylglycerol, TG: triacylglycerol

A

Sample	Numbers of entities							
	FA	LPC	PC	LPE	PE	CE	DG	TG
membranes - AS	2	9	28	2	4	1	6	2
membranes +AS	2	9	28	2	3	1	6	2
T-pili	2	7	7	0	1	0	4	2

B

Lipid ID	AUC*		
	Sample #1	Sample #2	Sample #3
LPC14:0-b [M+H] ⁺	1123427	2011779	2210257
LPC19:0-a [M+H] ⁺	495260	373694	456915
LPC19:0-b [M+H] ⁺	455270	385926	361127
PC(36:0) [M+H] ⁺	460600	375440	312769
PC(19:1_18:1) [M+H] ⁺	96520	146187	758474
DG(16:0/18:0) [M+NH ₄] ⁺	304168	304968	379923
PC(40:0) [M+H] ⁺	345379	248781	224882
LPC13:0-a [M+H] ⁺	179411	165675	175034
PC(18:1_18:1) [M+H] ⁺	52837	131464	295057
DG(18:0/18:0) [M-H ₂ O] ⁺	110696	182762	166442
DG(16:0/18:0) [M-H ₂ O] ⁺	129231	104838	153003

Figures and Legends

Figure 1. Purification of T-pili from *A. tumefaciens* and of pKM101 N-pili.

(A) Purification of T pili through successive steps of sodium deoxycholate treatment and sucrose density gradient centrifugation as described in materials and methods. Samples were resolved by tricine-SDS-PAGE and analyzed by silver staining (*top panel*) and western blotting using VirB2 (*middle panel*) or VirB5 (*lower panel*) specific antiserum. (1) Crude extracted pili containing flagella, membrane vesicles and membrane debris, (2-5) crude pili after treatment 3 times with 0.5% sodium deoxycholate to remove contaminants. (F1 to F9) Fractions from the top of the 20-70% sucrose gradient. (WM) weight marker. The numbers on the left indicate the molecular weight in kDa. Arrows indicate VirB2. Asterisk indicates a contaminant, probably the major outer membrane lipoprotein, removed by the sodium deoxycholate detergent. VirB2 identity confirmed by mass spectrometry analysis. (B) Tricine-SDS-PAGE and silver staining of 18 fractions from the top of the 20-70% sucrose gradient of crude extracted N-pili. Fractions were analyzed by electron microscopy and N-pili were detected abundantly in fractions 4 to 9, which were then pooled and concentrated. Arrow's head indicates TraM. Asterisk indicates the major outer membrane lipoprotein LPP. The identities of TraM and LPP were revealed by mass spectrometry analysis. T-pili (C) and N-pili (D) visualized by electron microscopy. Scale bar 400 nm. Arrows indicate pili.

Figure 2. Cryo-EM maps of T-pili and N-pili.

Cryo-EM map of T-pilus (A) and N-pilus (F) showing the 5-start helix indicated by different colors. Cross-section of the T-pilus (B) and N-pilus (G) showing the measured inner and outer diameters. The density and models of a single unit of VirB2 (C) and TraM (H). (D) A cartoon showing a complete repeating unit and the naming system of the T-pilus with 5 strands (Strand #1-5) and each strand consists of 11 pilins (P_1 to P_{11}). A single twist of 11 units from T-pilus (E) and N-pilus (I). (J) Cys64 of T-pilin showing a bulky density (noted with asterisk *) does not correspond to the cysteine side chain, which might correspond to a novel modification. (K) The Gln41 of TraM does not show a similar additional density as Cys64.

Figure 3. T-pili contain phospholipids.

(A) T-pili contain phospholipids in a stoichiometry of 1:1 with VirB2. Diacyl-phosphatidylcholine was modelled into the density. The arrow indicates the view of the phosphatidylcholine in (C). (B) Arrangement of VirB2 pilin and phosphatidylcholine in a single helical strand. (C) The phosphatidylcholine inside its corresponding density inside the T-pilus. (D) The phosphatidylglycerol inside its corresponding density inside the N-pilus. (E) Schematic cartoon of the T-pilus pilin arrangement showing an interaction unit of nine pilins from three adjacent helical strands. S_m denotes Strand #m; P_n denotes Pilin #n within a strand. (F) Interaction of VirB2 pilin and phosphatidylcholine within a nine-pilin unit shown in (E). The small cartoon showing the view in (F) indicated by the black arrow.

Figure 4. 3D classification reveals heterogeneous lipid densities in the T-pili.

(A) The consensus T-pili 3D map showing the region subjected to focused 3D classification. (B) The focused classified region contains 1 lipid molecule and 4 VirB2 molecules. (C) Highlight of the lipid pocket (cyan) where the lipid molecule is located in the focused classified region. (D) Zooming into the lipid pocket of 4 classes from 3D classification. Class 1 shows a phosphatidylcholine density. Class 2 shows no lipid density. Class 3 and 4 show lipid density in only the left leg or right leg, respectively; this likely to correspond to LPC as detected by lipidomics analysis. The thresholds used for all 4 classes are calibrated to make the VirB2 density the same. Therefore, the large densities in the lipid pockets demonstrate that the lipids in Class 3 and 4 are more flexible than that of Class 1.

Figure 5. Comparative analysis of T-, N- and F-pili.

(A) The F-pilus has a significantly larger lumen diameter (30.5Å) than the T-pilus (26.4Å) and N-pilus (24Å). (B) Overlay of VirB2 (T-pilus), TraM (N-pilus) and TraA (F-pilus) using ChimeraX matchmaker function. The positive residues Arg91 (VirB2), His66 (TraM), Arg39 and Lys41 (TraA), which point into the pilus lumen are shown. The overlay of the lipids of VirB2, TraM and TraA indicates that the lipid position can be flexible relative to the pilin. (C) Side view & top view of TraM, TraA and VirB2 indicate that VirB2 and TraM are more structurally conserved than TraA. (D) The alignment of pilin sequences was generated with MegAlign Pro Software, version 17.2 (DNA Star). (E) The surface charge of the lumen of T-pilus (calculated without the

phosphatidylcholines) showing Arg91 pointing toward the lumen and contribute significantly to the positive charge of the lumen.

Figure 6. Effects of changes of VirB2 amino acid Arg91.

(A) SDS-PAGE and western blotting of cell lysates and isolated pilus fractions with VirB2-specific antisera in C58, CB2 and complemented strains with R91A, R91K and R91E mutants. (B) Tumor formation test after infection of *K. diagramontiana* plant. C58: wild type; AS: acetosyringone for induction of virulence genes; CB2: CB1002, *virB2* deletion strain; CB2-B2: CB1002 strain complemented with VirB2; CB2-B2R91A, CB2-B2R91K, CB2-B2R91E: CB1002 strains complemented with R91A, R91K and R91E mutant VirB2, respectively.

Supplementary data

Supplementary table 1. Strains, plasmids and oligonucleotides used for mutagenesis of VirB2.

Strains or plasmids	Genotype/description	Source or reference
<i>E. coli</i> strains		
XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac (F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr))</i>	Agilent Technologies
BL21(DE3) star	<i>F⁻ ompT hsdSB(rB⁻, mB⁻) gal dcm rne131 (DE3)</i>	Invitrogen
<i>A. tumefaciens</i> strains		
C58	Wild type, pTiC58	(49)
CB1002	pTiC58 carrying in-frame deletion of <i>virB2</i>	(50)
CB1005	pTiC58 carrying in-frame deletion of <i>virB5</i>	(50)
Plasmids		
pTrc200	Str ^r , Spc ^r , pVS1 derivative, <i>LacIq</i> , <i>trc</i> promoter expression vector	(50)
pTrcB2a	pTrc200, <i>virB2a</i> PCR fragment cloned downstream of the <i>trc</i> promoter of pTrc200	(50)
pTrcB2a_R91A	pTrc200VirB2a modified to encode VirB2a with amino acid change R91A	This work
pTrcB2a_R91E	pTrc200VirB2a modified to encode VirB2a with amino acid change R91E	This work

pTrcB2a_R91K	pTrc200VirB2a modified to encode VirB2a with amino acid change R91K	This work
PCR Primers		
Primer name	Sequence (5' to 3')	
R91A forward	CCG AGT GAA GCG GCA CCG AAC ATC CAG GAG AT	
R91A reverse	ATC TCC TGG ATG TTC GGT GCC GCT TCA CTC GG	
R91K forward	ACG AGA CCG AGT GAA GCC TTA CCG AAC ATC CAG GAG ATT C	
R91K reverse	GAA TCT CCT GGA TGT TCG GTA AGG CTT CAC TCG GTC TCG T	
R91E forward	CGA GAC CGA GTG AAG CCT CAC CGA ACA TCC AGG AGA TT	
R91E reverse	AAT CTC CTG GAT GTT CGG TGA GGC TTC ACT CGG TCT CG	

Supplementary Figure 1. Identification of VirB2 and TraM by mass spectrometry (MS).

(A) MS analysis of the ~10 kDa protein excised from tricine-SDS-PAGE of concentrated T-pilus and N-pilus samples as shown in Fig. 1A and Fig. 1B (B) Identified peptides highlighted in yellow.

Supplementary Figure 2. Examples of low-resolution electron micrographs of T-pilus (A) and N-pilus (B).

The scale bar represents 200 nm. The difference in the appearance of the micrograph in the N-pilus case is due to the gold coating and graphene oxide layer on the grid. Examples of 2D class averages from T-pilus (C) and N-pilus (D). (E) The workflow for our data analysis of T-pilus using CryoSPARC. N-pilus is analyzed similarly, except the fact that we used the helical parameters from T-pilus for N-pilus analysis right away.

Supplementary Figure 3. Intermolecular interactions between the different units of VirB2.

(A) Schematic cartoon of the T-pilus pilin arrangement showing an interaction unit of nine pilins from three adjacent helical strands. (B) The interaction interface area between other units of VirB2 of T-pilus with the central unit S_mP_n analyzed by PDBsum. The view of the model in (B) is the same as the model in (A). (C) The interaction interface area between other units of TraM of N-pilus with the central unit S_mP_n analyzed by PDBsum. (D, E) The interaction between VirB2 unit n and $n-1$ analyzed by PDBsum.

Supplementary Figure 4. Interactions between phospholipid and pilins.

A) Like T-pili (Fig. 3), N-pili contain phospholipid with a stoichiometry of 1:1 with TraM. Arrangement of TraM pilin and lipid in a single helical strand in two different views (A) and (B). (C) Interaction of TraM pilin and phospholipids within a nine-pilin unit similar to Fig. 4D. The small cartoon showing the view in (C) indicated by the black arrow. (D) Overlay of VirB2 and TraM shows that the phospholipid conformation relative to the pilin are significantly different despite the good alignment between VirB2 and TraM. (E) The interactions between phosphatidylcholine and VirB2 within the T-pilus analyzed by PDBsum. (F) The interactions between phosphatidylglycerol and TraM within the N-pilus.

Supplementary Figure 5. The classification scheme for Lipid Density in one asymmetric unit.

(A) The consensus T-pilus 3D reconstruction from 615,500 symmetry expanded particles with the classification mask. (B) The classification mask is overlaid with the corresponding model. The classification mask was designed to cover a single lipid and four surrounding VirB2 molecules. (C) Classification of the symmetry expanded particles into four classes using supervised classification from Cryosparc. The four classes show similar VirB2 density but distinct lipid densities. To avoid model bias, particles of each class were refined with the consensus map. Despite using the consensus map as the model, the resulting maps show clear different lipid densities in the lipid pocket of the asymmetric unit.

Supplementary Figure 6. The surface charge analysis of T-pilus, N-pilus and F-pilus.

Surface charge analysis of pili only indicates a significant variation in surface charges outside and inside the channel among three types of T4SS pili. (A) Surface charge of the outside of T-pilus (left panel) and inside the lumen by hiding pilins at the front (right side). Surface charges of N-pilus and F-pilus (PDB 5leg) are shown in (B) and (C). The surface charges of the T-pilus (D), N-pilus (E) and F-pilus (F) from top view, looking down the lumen as indicated by the black arrow in (A).

References

1. H. H. Hwang, M. Yu, E. M. Lai, Agrobacterium-mediated plant transformation: biology and applications. *Arabidopsis Book* **15**, e0186 (2017).
2. K. Dhama *et al.*, Plant-based vaccines and antibodies to combat COVID-19: current status and prospects. *Hum Vaccin Immunother* **16**, 2913-2920 (2020).
3. S. Rosales-Mendoza, V. A. Marquez-Escobar, O. Gonzalez-Ortega, R. Nieto-Gomez, J. I. Arevalo-Villalobos, What Does Plant-Based Vaccine Technology Offer to the Fight against COVID-19? *Vaccines (Basel)* **8** (2020).
4. P. Vikesland *et al.*, Differential Drivers of Antimicrobial Resistance across the World. *Acc Chem Res* **52**, 916-924 (2019).
5. C. O. Vrancianu, L. I. Popa, C. Bleotu, M. C. Chifiriuc, Targeting Plasmids to Limit Acquisition and Transmission of Antimicrobial Resistance. *Front Microbiol* **11**, 761 (2020).
6. M. Trokter, C. Felisberto-Rodrigues, P. J. Christie, G. Waksman, Recent advances in the structural and molecular biology of type IV secretion systems. *Current opinion in structural biology* **27C**, 16-23 (2014).
7. V. Chandran Darbari, G. Waksman, Structural Biology of Bacterial Type IV Secretion Systems. *Annu Rev Biochem* **84**, 603-629 (2015).
8. T. R. D. Costa *et al.*, Type IV secretion systems: Advances in structure, function, and activation. *Molecular microbiology* **115**, 436-452 (2021).
9. R. Fronzes, P. J. Christie, G. Waksman, The structural biology of type IV secretion systems. *Nature reviews. Microbiology* **7**, 703-714 (2009).
10. R. Fronzes *et al.*, Structure of a type IV secretion system core complex. *Science* **323**, 266-268 (2009).
11. H. H. Low *et al.*, Structure of a type IV secretion system. *Nature* **508**, 550-553 (2014).
12. E.-M. Lai, C. I. Kado, Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **180**, 2711-2717 (1998).
13. K. A. Aly, C. Baron, The VirB5 protein localizes to the T-pilus tips in *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiology* **153**, 3766-3775 (2007).
14. H. Schmidt-Eisenlohr *et al.*, Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **181**, 7485-7492 (1999).

15. H. Schmidt-Eisenlohr, N. Domke, C. Baron, TraC of IncN plasmid pKM101 associates with membranes and extracellular high molecular weight structures in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**, 5563-5571 (1999).
16. T. Kwok *et al.*, Helicobacter exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* **449**, 862-866 (2007).
17. J. Conradi *et al.*, An RGD helper sequence in CagL of *Helicobacter pylori* assists in interactions with integrins and injection of CagA. *Front Cell Infect Microbiol* **2**, 70 (2012).
18. B. Hu, P. Khara, P. J. Christie, Structural bases for F plasmid conjugation and F pilus biogenesis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116**, 14222-14227 (2019).
19. K. G. Anthony, C. Sherburne, R. Sherburne, L. S. Frost, The role of the pilus in recipient cell recognition during bacterial conjugation mediated by F-like plasmids. *Mol. Microbiol.* **13**, 939-953 (1994).
20. R. Eisenbrandt *et al.*, Conjugative pili of IncP plasmids, and the Ti plasmid T pilus are composed of cyclic subunits. *J. Biol. Chem.* **274**, 22548-22555 (1999).
21. P. Khara, L. Song, P. J. Christie, B. Hu, In Situ Visualization of the pKM101-Encoded Type IV Secretion System Reveals a Highly Symmetric ATPase Energy Center. *mBio* **12**, e0246521 (2021).
22. A. L. Samuels, E. Lanka, J. E. Davies, Conjugative junctions in RP4-mediated mating of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**, 2709-2715 (2000).
23. M. B. Dürrenberger, W. Villiger, T. Bächli, Conjugational junctions: morphology of specific contacts in conjugating *Escherichia coli* bacteria. *J. Struct. Biol.* **107**, 146-156 (1991).
24. J. Aguilar, T. A. Cameron, J. Zupan, P. Zambryski, 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**, e00218-00211 (2011).
25. J. Aguilar, J. Zupan, T. A. Cameron, P. C. Zambryski, *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**, 3758-3763 (2010).

26. H. Y. Wu, C. Y. Chen, E. M. Lai, Expression and functional characterization of the *Agrobacterium* VirB2 amino acid substitution variants in T-pilus biogenesis, virulence, and transient transformation efficiency. *PLoS One* **9**, e101142 (2014).
27. M. Kalkum, R. Eisenbrandt, R. Lurz, E. Lanka, Tying rings for sex. *Trends Microbiol.* **10**, 382-387 (2002).
28. T. R. D. Costa *et al.*, Structure of the Bacterial Sex F Pilus Reveals an Assembly of a Stoichiometric Protein-Phospholipid Complex. *Cell* **166**, 1436-1444 e1410 (2016).
29. W. Zheng *et al.*, Cryoelectron-Microscopic Structure of the pKpQIL Conjugative Pili from Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Structure* **28**, 1321-1328 e1322 (2020).
30. Q. Yuan *et al.*, Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *J. Biol. Chem.* **280**, 26349-26359 (2005).
31. K. A. Aly, L. Krall, F. Lottspeich, C. Baron, The type IV secretion system component VirB5 binds to the trans-zeatin biosynthetic enzyme Tzs and enables its translocation to the cell surface of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol* **190**, 1595-1604 (2007).
32. H. Schägger, G. von Jagow, 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 (1987).
33. C. Mary, A. Fouillen, B. Bessette, A. Nanci, C. Baron, Interaction via the N-terminus of the type IV secretion system (T4SS) protein VirB6 with VirB10 is required for VirB2 and VirB5 incorporation into T-pili and for T4SS function. *J. Biol. Chem.* **293**, 13415-13426 (2018).
34. J. Snijder *et al.*, Vitrification after multiple rounds of sample application and blotting improves particle density on cryo-electron microscopy grids. *J Struct Biol* **198**, 38-42 (2017).
35. D. N. Mastronarde, Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *J Struct Biol* **152**, 36-51 (2005).
36. A. Punjani, J. L. Rubinstein, D. J. Fleet, M. A. Brubaker, cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nature methods* **14**, 290-296 (2017).
37. D. Liebschner *et al.*, Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **75**, 861-877 (2019).
38. P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, Features and development of Coot. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**, 486-501 (2010).

39. E. F. Pettersen *et al.*, UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605-1612 (2004).
40. E. F. Pettersen *et al.*, UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein science : a publication of the Protein Society* **30**, 70-82 (2021).
41. R. A. Laskowski, J. Jablonska, L. Pravda, R. S. Varekova, J. M. Thornton, PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Protein Sci.* **27**, 129-134 (2018).
42. R. A. Laskowski, M. B. Swindells, LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling* **51**, 2778-2786 (2011).
43. A. Forest *et al.*, Comprehensive and Reproducible Untargeted Lipidomic Workflow Using LC-QTOF Validated for Human Plasma Analysis. *J Proteome Res* **17**, 3657-3670 (2018).
44. J. Godzien *et al.*, Rapid and Reliable Identification of Phospholipids for Untargeted Metabolomics with LC-ESI-QTOF-MS/MS. *J Proteome Res* **14**, 3204-3216 (2015).
45. J. Lederberg, E. L. Tatum, Sex in bacteria; genetic studies, 1945-1952. *Science* **118**, 169-175 (1953).
46. J. Manchak, K. G. Anthony, L. S. Frost, Mutational analysis of F-pilin reveals domains for pilus assembly, phage infection and DNA transfer. *Molecular microbiology* **43**, 195-205 (2002).
47. J. E. Kerr, P. J. Christie, Evidence for VirB4-mediated dislocation of membrane-integrated VirB2 pilin during biogenesis of the Agrobacterium VirB/VirD4 type IV secretion system. *J Bacteriol* **192**, 4923-4934 (2010).
48. T. D. Lawley, W. A. Klimke, M. J. Gubbins, L. S. Frost, F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol Lett* **224**, 1-15 (2003).
49. N. Van Larebeke *et al.*, LARGE PLASMID IN AGROBACTERIUM-TUMEFACIENS ESSENTIAL FOR CROWN GALL-INDUCING ABILITY. *Nature* **252**, 169-170 (1974).
50. H. Schmidt-Eisenlohr *et al.*, Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **181**, 7485-7492 (1999).

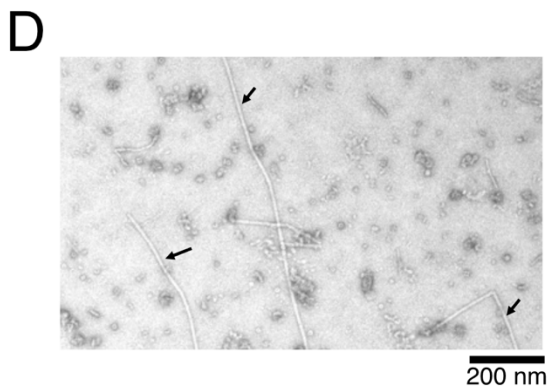
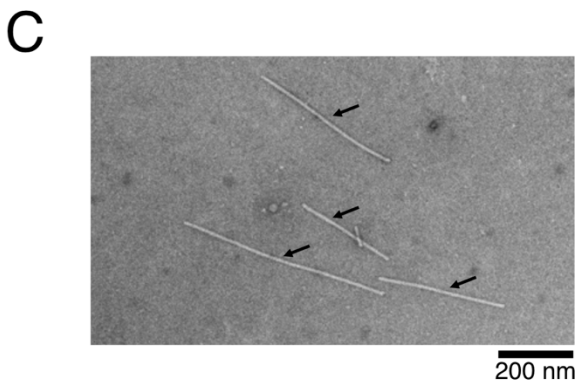
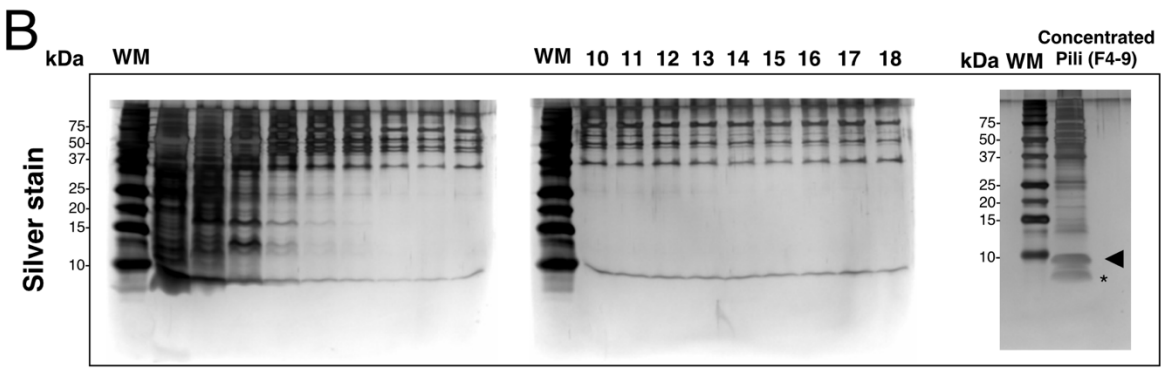
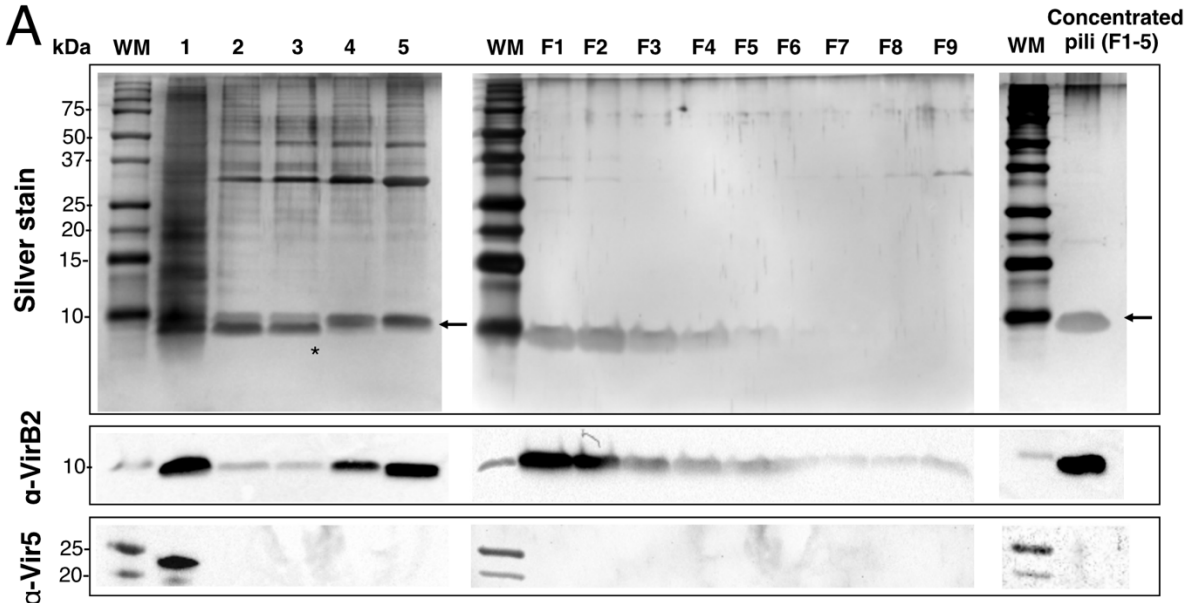


Figure 1

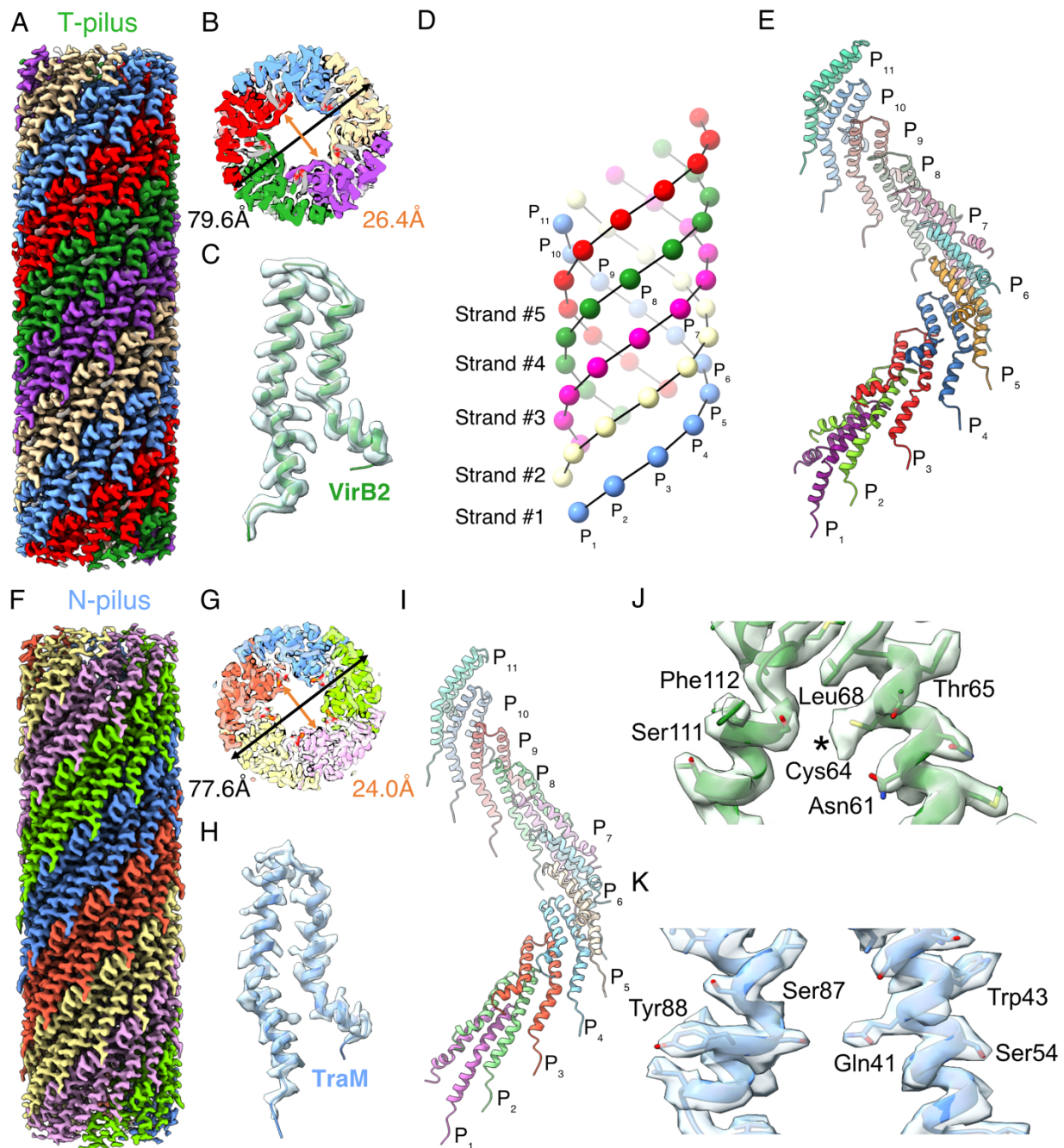


Figure 2

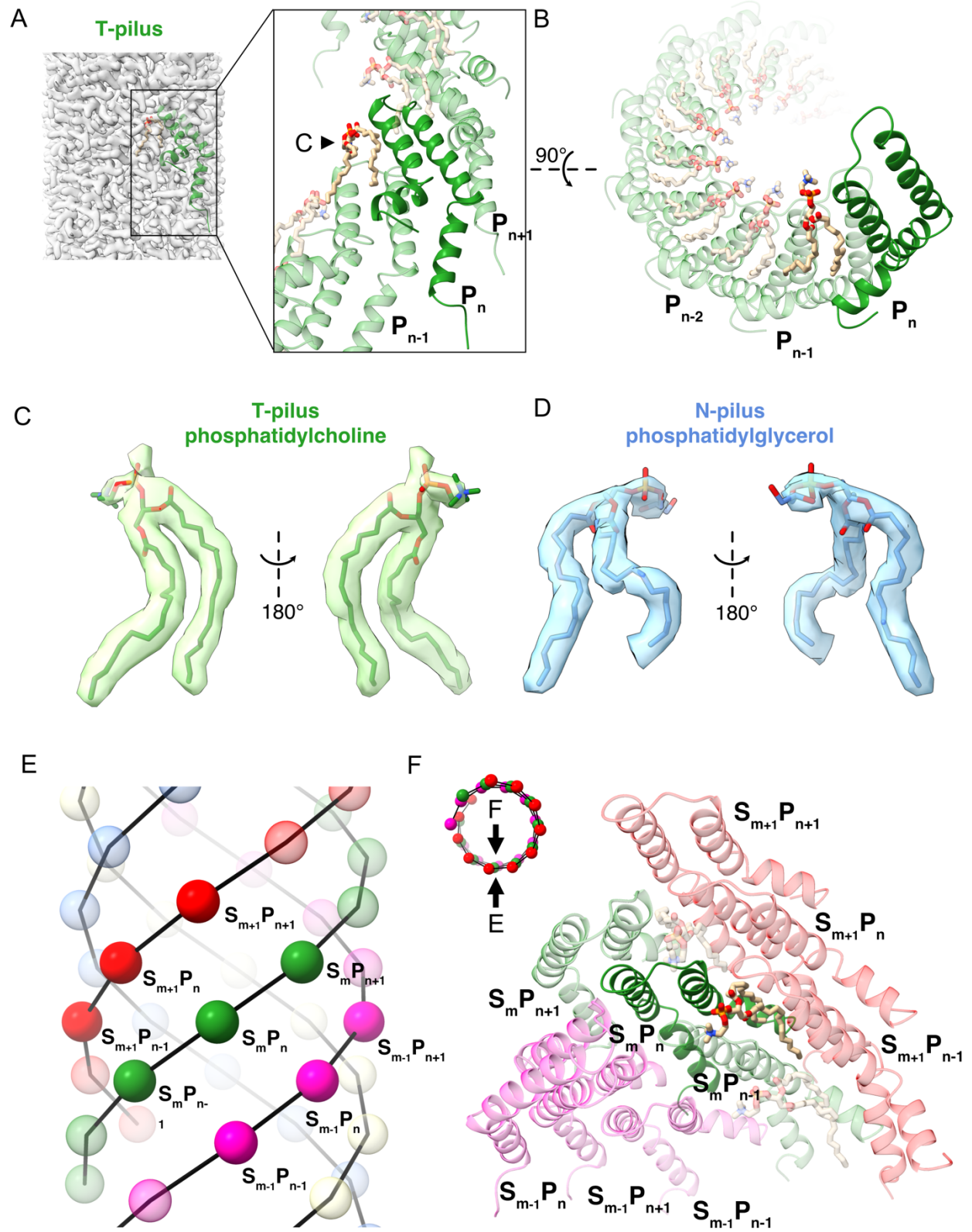


Figure 3

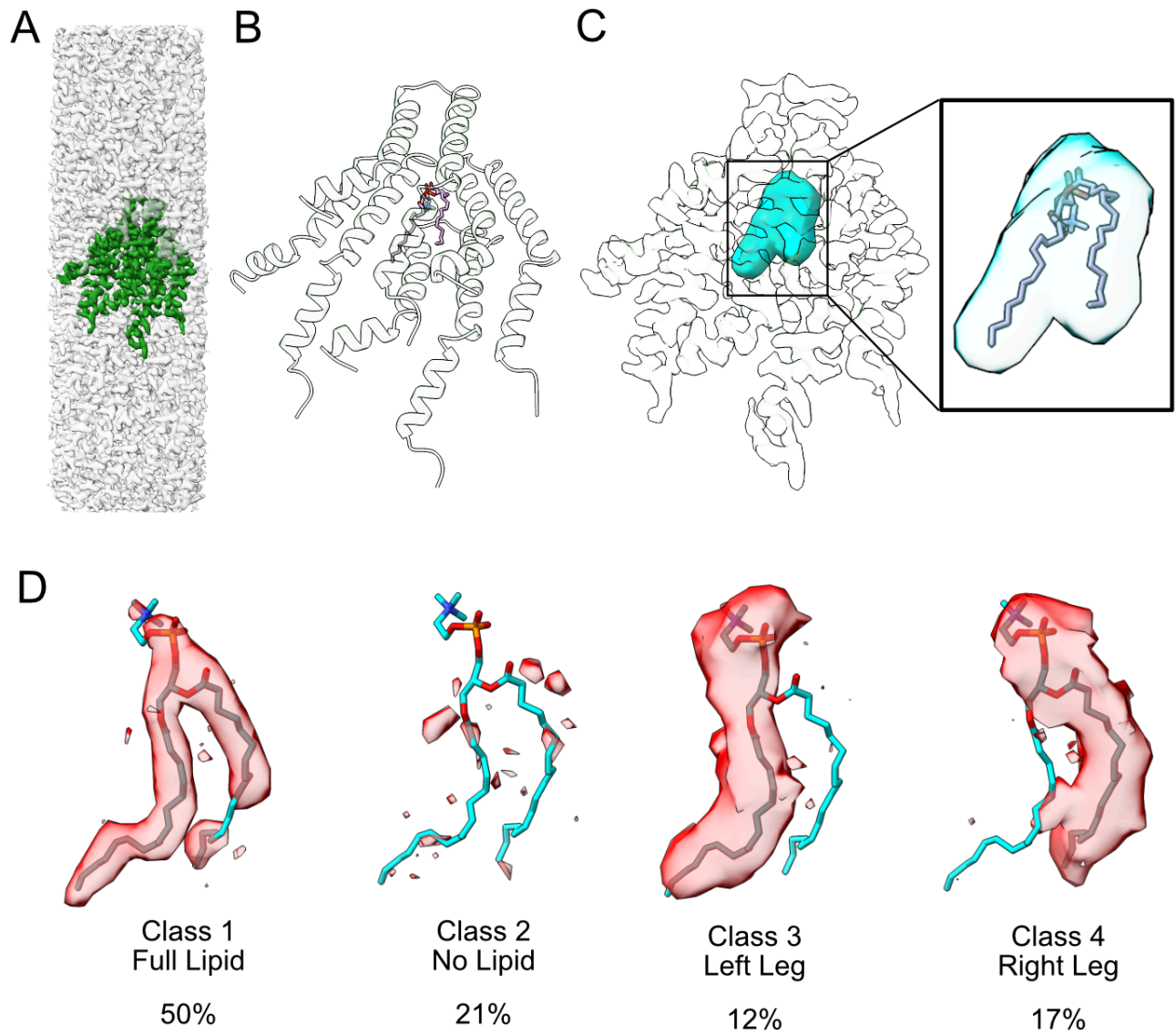
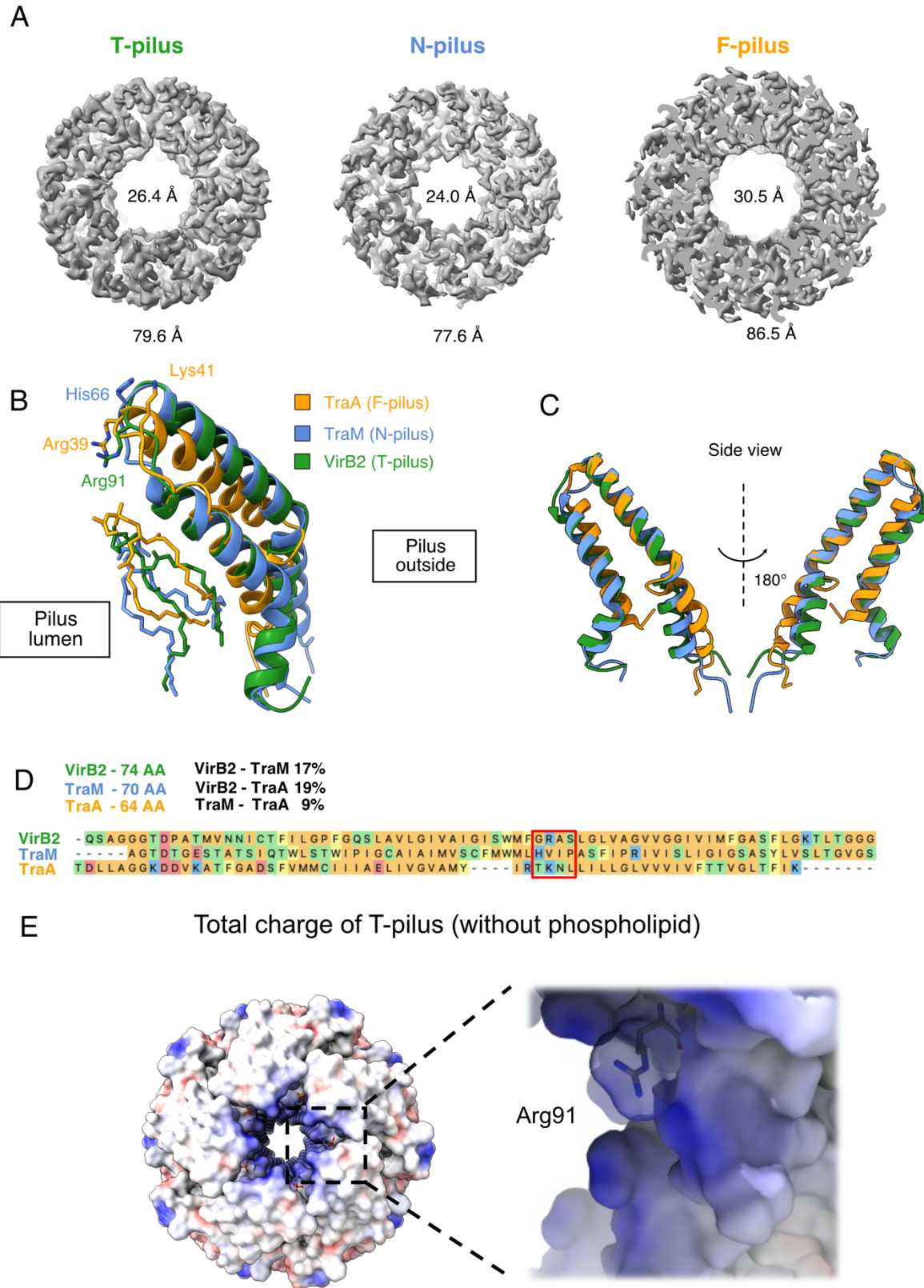


Figure 4






Arg91

Figure 5

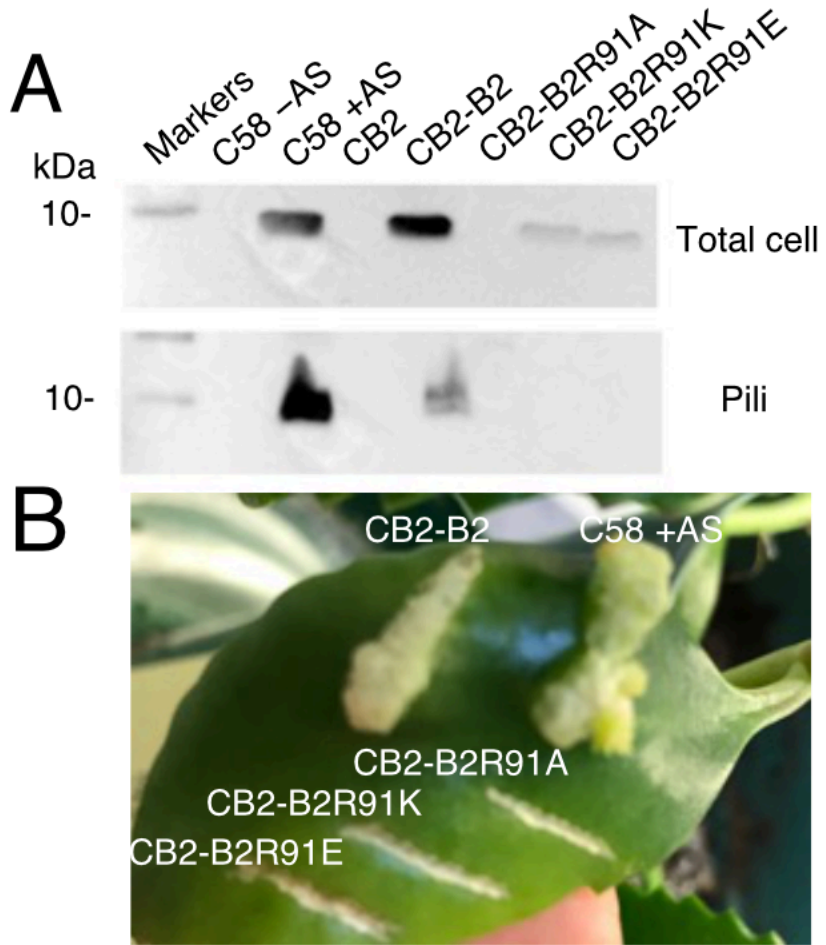


Figure 6

Supplementary Figures

A

	Exclusive unique peptides	Exclusive unique spectra	Total spectra	Coverage
VirB2	2	2	29	28/74(38%)
TraM	6	6	7	29/70(41%)

B

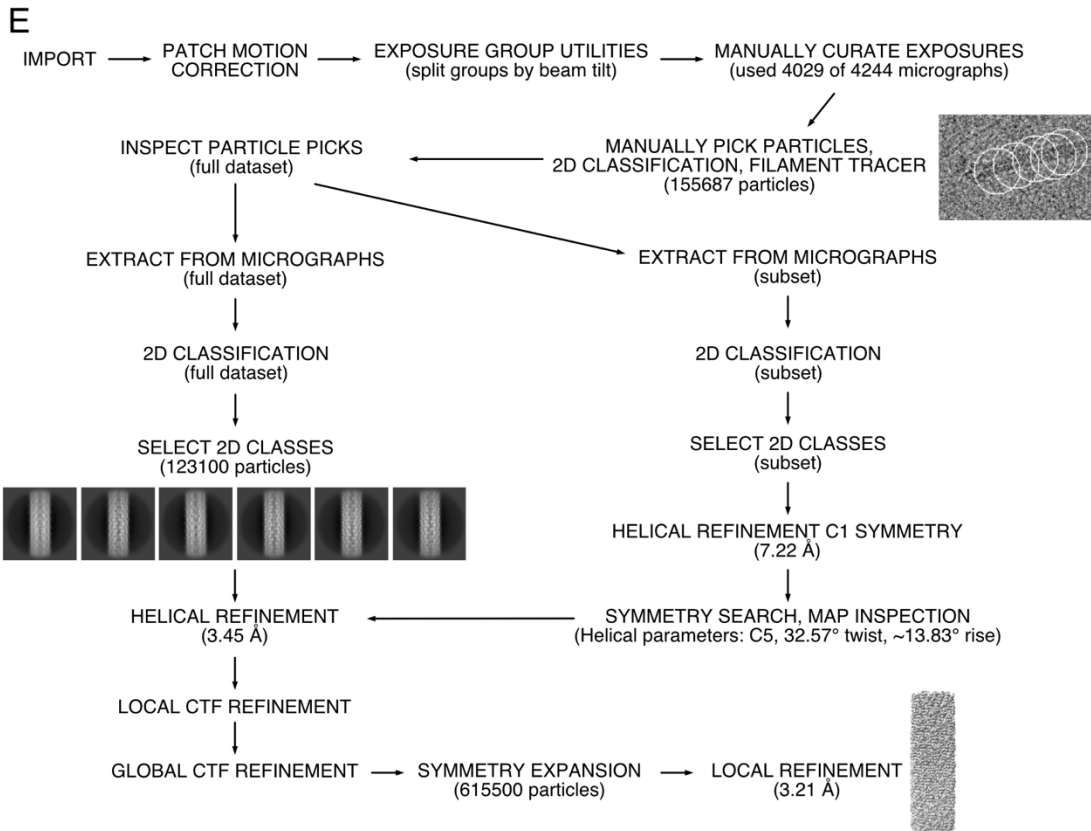
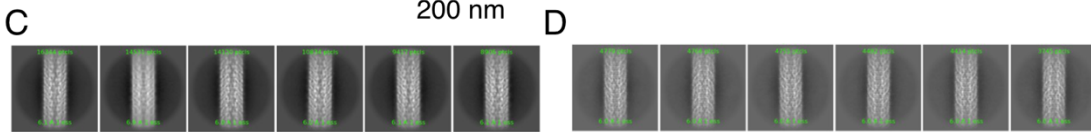
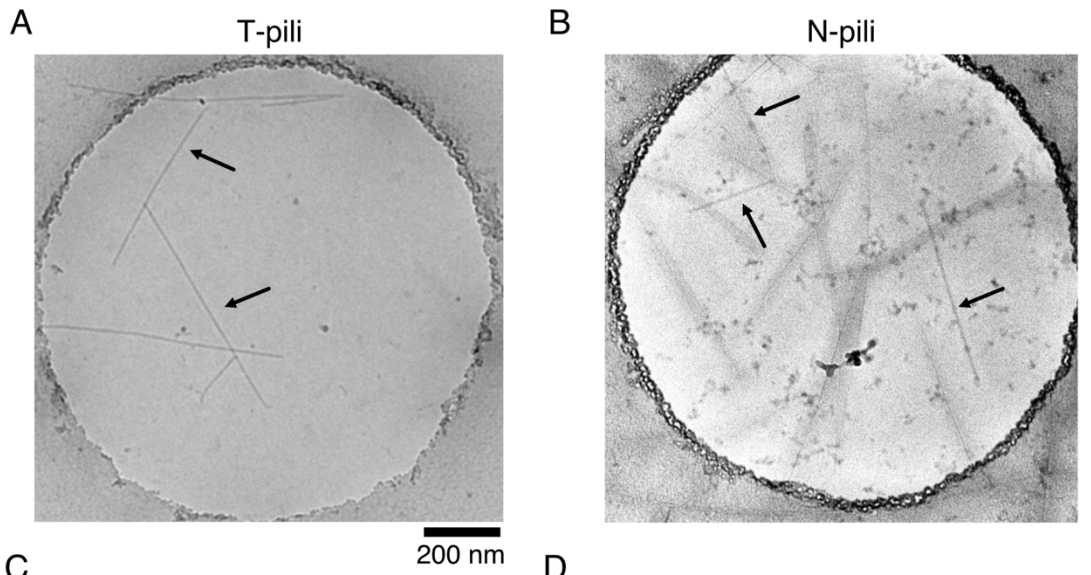
VirB2

QSAGGGTDPA **TMVNNICTFI** **LGPFQSLAV** LGIVAIGISW MFGRASLGLV AGVGGVIM FGASFLGKTL TGGG

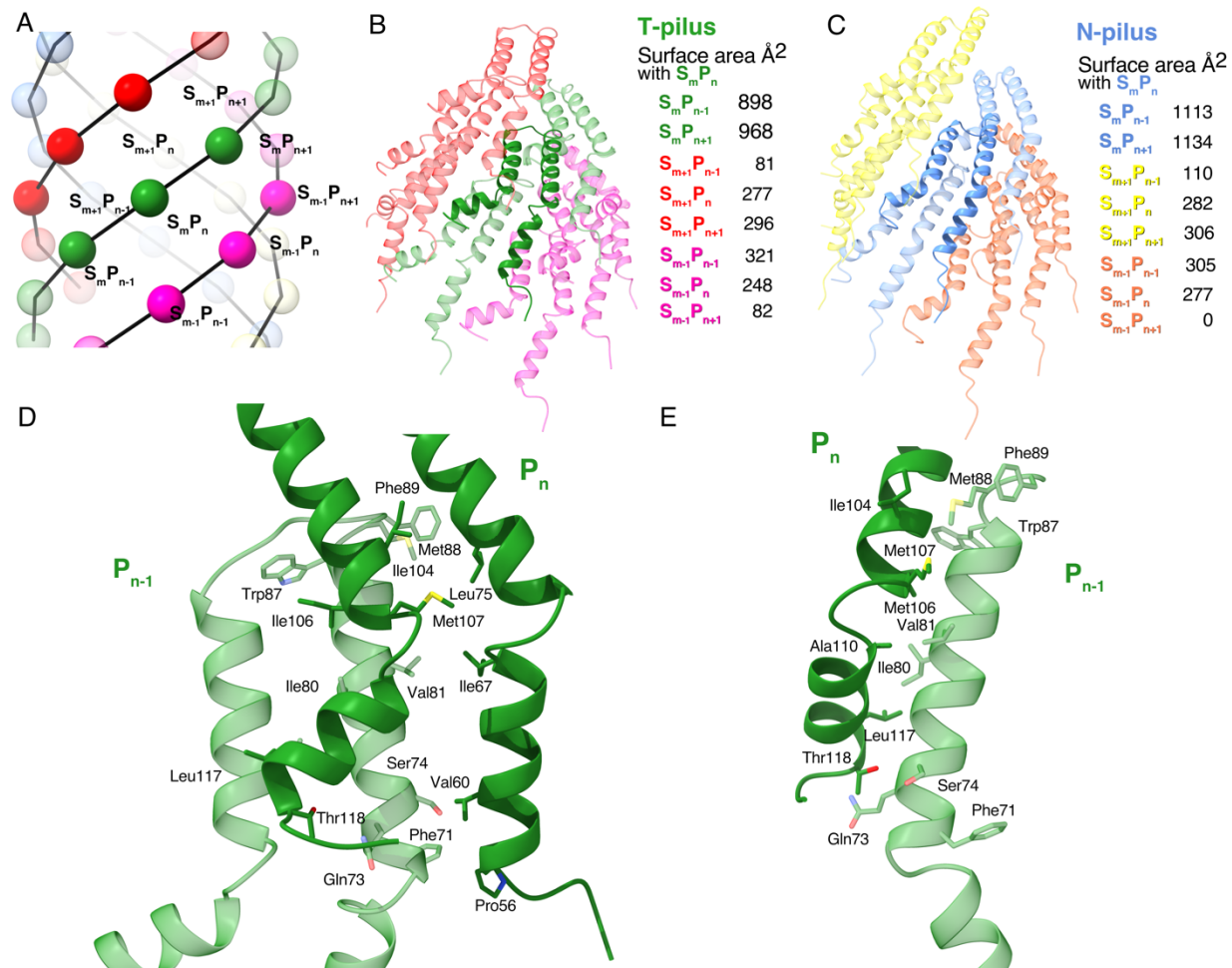
TraM

AGTDTGESTA **TSIQTW**LSTW IPIGCAIAM VSCFMW**MLHV** **IPASFIPRIV** ISLIGGSAS YLVSLTGVGS

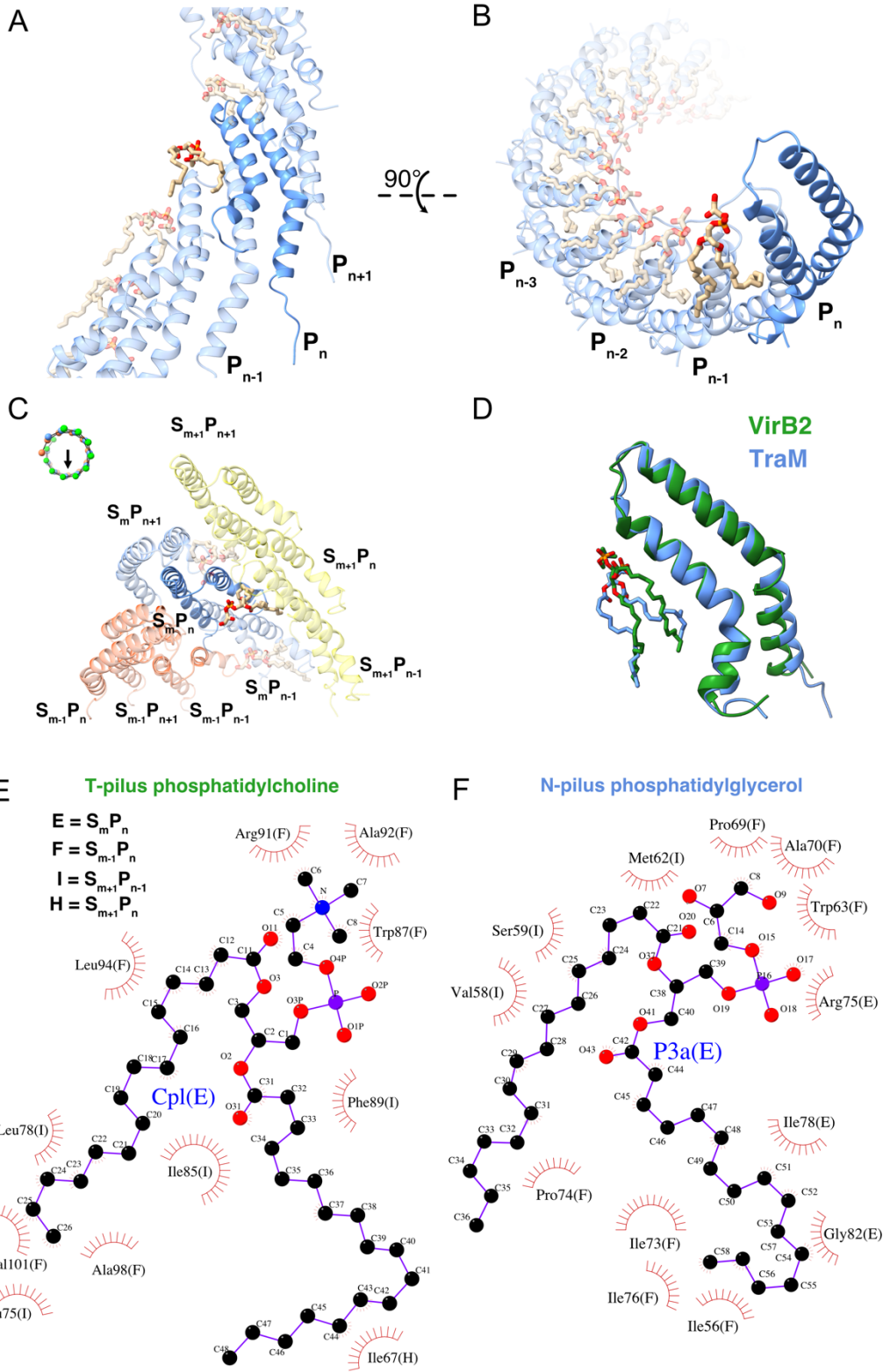
Supplementary Figure 1



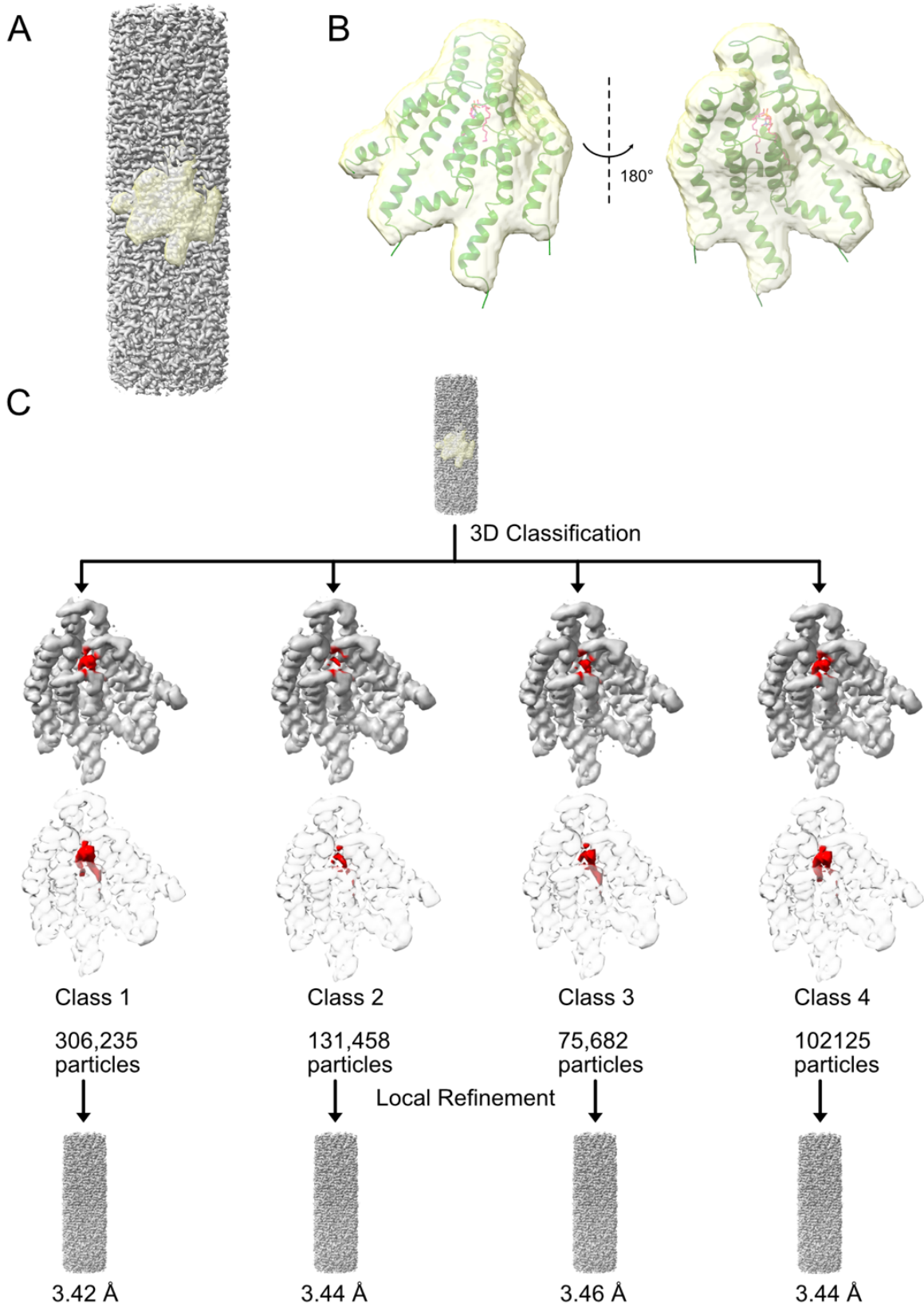
Supplementary Figure 2



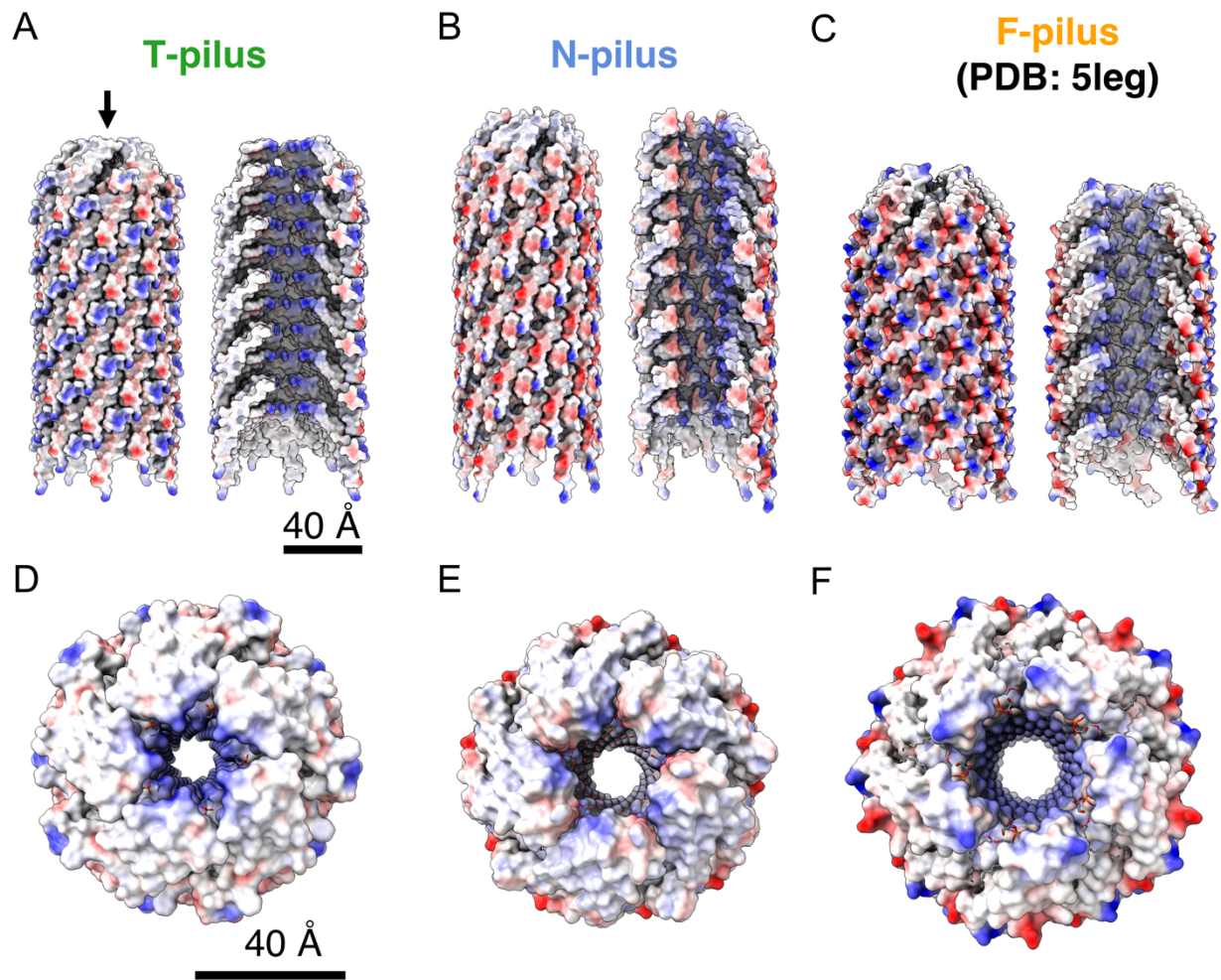
Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 6

Chapitre 3 – Article 2

Sous contrainte du temps imparti à cette thèse et pour pouvoir obtenir le maximum de résultats, les études réalisées dans cet article ont été menées en parallèle de celles sur les pili T et N. Ce projet n'est pas donc en continuité avec le précédent et ces travaux ont été réalisés en même temps que le premier article. Dans cet article nous étudions le composant mineur du pilus, la protéine TraC codée par le plasmide conjugatif pKM101. Le but de ce papier étant d'obtenir des informations sur la localisation cellulaire de TraC et son rôle durant la conjugaison et l'infection par les phages I_{ke} et PRDI. Cet article a été déposé sur le site web Biorxiv (doi.org/10.1101/2022.07.29.501992) et il sera prochainement soumis à un journal scientifique spécialisé. Pour ce papier je suis premier auteur, j'ai réalisé toutes les expériences et analysé les résultats obtenus, avec la contribution du Dr. Nicolas Stifani et du Dr. Normand Cyr du département de biochimie et médecine moléculaire à l'université de Montréal. J'ai également écrit le manuscrit. Le Dr. Christian Baron a discuté et conçu les expériences et a participé à l'écriture du manuscrit.

TraC of the conjugative plasmid pKM101 is secreted as a monomer in outer membrane vesicles and stimulates conjugation

Jaafar Amro and Christian Baron*

Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine,
Université de Montréal, Québec, Canada

Keywords: Type IV secretion system, IncN plasmid, conjugation, pKM101, pili, phages, antimicrobial resistance

*Corresponding author

Abstract

Gram-negative bacteria use membrane-bound type IV secretion systems to assemble pili on the cell surface, followed by cell-cell contact with recipient cells and transfer of plasmid DNA. The process at the cell-cell contact stage of conjugative DNA transfer is not well understood. We here present a biochemical and genetic characterization of the TraC protein that is a minor component of the pili determined by the IncN plasmid pKM101 from *Escherichia coli*. The cellular and secreted forms of TraC are monomers, TraC preferentially localizes at the cell poles and it is also detected in extracellular membrane vesicles. Purified TraC does not impact the infection with bacteriophages, but we detect binding of TraC to recipient cells and partial complementation of a *traC* deletion strain by the addition of purified TraC. These results suggest that the protein contributes to conjugation at the cell-cell contact stage.

Introduction

Type IV secretion systems (T4SSs) are transmembrane nanomachines present in Gram-negative and Gram-positive bacteria (1). T4SSs mediate bacterial plasmid transfer by conjugation, and they are responsible for effector protein secretion and pathogenicity in many pathogens of humans, animals and plants (2, 3). T4SSs are a diverse group of protein complexes, and their most conserved form in Gram-negative bacteria is composed of 12 proteins that form a transmembrane channel and an extracellular appendage, called the pilus (4). Based on sequence similarities the 12 subunit proteins are homologs of VirB1-11 and VirD4 based on the most studied T4SS of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* (5). During conjugation genetic material will be transferred from a donor to a recipient cell and this process requires cell-to-cell contact and possibly a membrane fusion event (6, 7). The transfer of genetic material enables bacteria to adapt to changing environmental conditions including exposure to antibiotics. The transfer for antibiotic resistance genes represents a global threat for public health (8-10).

The general architecture of T4SS is well documented. They comprise an outer membrane core complex and an inner membrane complex that are connected by a stalk forming the translocation channel (4, 11-13). The cell surface-exposed pilus comprises the major pilin VirB2 and the minor pilus tip protein VirB5 that is believed to be involved in the recognition and adhesion to recipient bacteria during conjugation (14-18). T4SS also represent the receptor for certain bacteriophages specific to bacteria expressing conjugative plasmids (19-22). VirB5 proteins are exposed on the surface and at the tips of pili and they may be adhesins that contact recipient cells. However, there is little direct evidence to support this notion except in case of the VirB5-homologous CagL protein from the human pathogen *H. pylori*, that binds to and activates integrin $\alpha_5\beta_1$ receptors on gastric epithelial cells (15, 16, 23-25). The VirB5-like protein TraC from the conjugative plasmid pKM101 from *Escherichia coli* is translocated to the periplasm, followed by cleavage of its signal peptide before being routed to the cell surface using a mechanism probably involving the Bam proteins (23, 26, 27). TraC is a minor component of the T4SS-determined pilus and it is also secreted into the extracellular medium as a soluble protein in *E. coli* (26).

To understand the mechanistic contribution of TraC to conjugation we purified and characterized the cellular and secreted forms and found that the protein is a monomer in both

locations. Analysis of the subcellular localization of TraC by immunofluorescence showed that it localizes at the poles and at the cell perimeter. TraC is also detected in outer membrane vesicles purified from the culture supernatant. Extracellular TraC does not impact phage infection, but it binds to recipient cells and partly restores conjugation of a $\Delta traC$ mutant pKM101 suggesting that it plays a role at the cell-cell contact stage of the conjugation process.

Results

Expression and purification of TraC from different subcellular localizations

To study TraC and its interactions with other proteins in different subcellular localisations, we overexpressed and purified a C-terminally Strep-tagged version (TraC_{Strep}) from *E. coli* in the presence or absence of pKM101. TraC_{Strep} was expressed from plasmid pTrc200 and complementation of pKM101 $\Delta traC1134$ carrying a non-polar transposon insertion in the *traC* gene (28) showed that the modified protein was fully functional as measured by plasmid conjugation and phage infection assays (**suppl. Fig. 1**). We isolated TraC_{Strep} from the cell supernatant (SN), from the membranes (M) and from the soluble fraction of cell lysates (S), followed by SDS-PAGE, silver staining and Western blotting (**Fig. 1**). In addition to detecting TraC_{Strep} this analysis revealed the presence of other proteins that were identified by mass spectrometry. OmpA (~50kDa) was detected in the membrane fraction, the lipoprotein LPP (~10 kDa) in the fraction of secreted TraC_{Strep} and the biotin carboxyl carrier protein (BCCP) was detected in the soluble fractions (~13 kDa) (**suppl. Fig. 2**). We obtained similar results when TraC was purified from *E. coli* with or without pKM101.

TraC is primarily a monomer

To further characterize TraC_{Strep} from the different compartments, the fractions from affinity purification were pooled and concentrated, followed by size exclusion chromatography over a S75 column as additional purification step. TraC_{Strep} eluted at the same position from the column (~10.8 ml) in all cases and it was most concentrated when it was purified from the soluble fraction of cell lysates (**Fig. 2A and B**). Interestingly, the elution profile was identical when the purification was conducted from cells with or without pKM101 indicating that TraC_{Strep} does not interact strongly with other T4SS components (data not shown). The retention volume corresponds to a molecular weight of ~37 kDa, which is larger than the predicted size of the TraC monomer (~24 kDa).

To characterize the oligomeric state of purified TraC_{Strep} from the SN, M and S fractions, we added increasing concentrations of the homo-bifunctional cross-linking agent disuccinimidyl suberate (DSS), followed by SDS-PAGE and western blotting. This analysis showed the formation of higher molecular mass complexes that may correspond to dimers as well as multimers of TraC or to complexes with other proteins (**Fig. 2C**). The crosslinking patterns of the M and S fractions were similar, but we observed a lower amount of higher molecular mass complexes in the SN fractions of secreted TraC_{Strep} indicating a lower degree of complex formation.

To precisely calculate the molecular weight of purified TraC_{Strep} we used SEC-MALS (size exclusion chromatography-multi angle light scattering) and this analysis revealed that the protein is monodisperse with a molecular mass of 24.3 kDa (**Fig. 2D**). We conclude that TraC is primarily a monomer that may undergo transient interactions with itself (dimerization) or with other proteins in the different subcellular compartments.

TraC accumulates at the cell poles

Next, we used super resolution microscopy (structured illumination microscopy, SIM) and immunofluorescence microscopy to localize TraC in *E. coli*. To ensure the biological significance of our findings we expressed C-terminally Flag-tagged TraC (TraC_{Flag}) in a pKM101 Δ *traC*1134 mutant strain using the tightly controlled pBAD promoter. The level of expression was modulated by varying the concentration of the inducer arabinose to correspond to that of the endogenous TraC expressed from pKM101 and 10⁻³ % (66.5 μ M arabinose) resulted in comparable levels of

expression (**suppl.Fig. 3A**). We next tested plasmid conjugation (**suppl. Fig. 3B**) and phage infection (**suppl. Fig. 3C**) showing that TraC_{Flag} is fully functional under these conditions. *E. coli* cells were then permeabilized for the detection of cell-bound TraC with specific antisera and SIM localized the protein at the cell perimeter and at the cell poles (**Fig. 3A**). We observed the same polar localization in cells expressing, or not, a functional T4SS. We also incubated the donor cells (cells expressing TraC_{Flag} + T4SS) with plasmid-free recipient cells to assess whether there are changes of the localization of TraC during conjugation. We did not detect any difference in the TraC localization pattern in the presence of recipient cells (data not shown).

As a complementary approach, we engineered a C-terminal fusion of TraC to the fluorescent protein mCherry that was equally expressed at levels corresponding to TraC in pKM101 when induced with 10⁻⁴% arabinose (**suppl. Fig. 4A**). TraC-mCherry was partially functional during conjugation (~0.2% of wild type TraC, **suppl. Fig. 4B**). Similar to TraC_{Flag} we observed mostly polar TraC-mCherry (**Fig. 3B**) confirming the primary subcellular localization of the protein.

TraC is secreted with membrane vesicles

Outer membrane vesicles (OMV) exist in almost all Gram-negative bacteria, and play an important role in many bacterial functions, including cell communication, biofilm formation and pathogenicity (29). Since extracellular secretion of TraC was previously reported (23, 26) we next assessed whether it is secreted as part of OMVs. To this effect, we purified OMVs from the supernatant of *E. coli* carrying pKM101 Δ *traM363* that do not produce pili since they lack the major pilus component TraM. TraC was detected by SDS-PAGE and western blotting in the OMV fraction showing spherical particles of different sizes visualized by electron microscopy (**Fig. 4A and B**). As an independent approach to confirm the presence of TraC in OMV we purified OMVs from *E. coli* strain pKM101 Δ *traC1134* expressing TraC fused to mCherry at its C-terminus. Using fluorescence microscopy we detected mCherry in the OMV sample and western blotting confirmed the presence of the fusion protein (**Fig. 4C and D**) confirming that TraC is secreted as part of OMVs.

Extracellular TraC does not affect IncN specific phage infection

Ike and PRDI are two phages that recognize and infect bacteria that carry IncN group conjugative plasmids (30). Ike attaches to the pilus tip before injecting its ssDNA into the bacteria, and PRDI attaches to the cell surface in a T4SS-dependent manner (27, 30). Previous studies showed that a point mutation in TraC (Val144) renders the cell resistant to PRDI without affecting Ike infection (27). These results suggest that TraC may be part of the host recognition site for phage infection. Therefore, addition of soluble TraC may decrease infection by blocking the phage receptors. We tested this hypothesis by mixing Ike and PRDI phages with 5 µg of purified TraC before the infection. We did not detect any effect of soluble TraC on the infection rate (**Fig. 5A**). We also tested whether extracellular TraC renders pKM101ΔtraC1134-carrying cells susceptible to Ike and PRDI infection (27). To this effect, we added 5 µg of soluble TraC to pKM101ΔtraC1134-carrying cells, but we did not detect any plaque formation (**Fig. 5A**). We conclude that extracellular TraC does not block infection and does not restore the sensitivity of TraC-deficient cells toward Ike or PRDI. Finally, we used crosslinking to detect whether there are interactions between TraC and the phages. Indeed, in the presence of the crosslinking agent disuccinimidyl suberate (DSS), we identified cross-linking products indicating a potential interaction between TraC and PRDI proteins, but not with Ike (**Fig. 5B**). The apparition of distinct crosslinking products, e.g. of ~150 kDa, may reflect this interaction. The receptor binding protein P2 of PRDI has a size of 64 kDa and it forms dimers (31, 32). It will be interesting to further study the composition of the observed crosslinking products to understand the phage-cell interaction.

Purified TraC partially restores the transfer of pKM101ΔtraC plasmid

Previous studies showed that a donor bacterium carrying pKM101ΔtraC1134 can be partially complemented by a helper cell expressing a functional T4SS (26, 28). Here, we tested the effect of purified TraC on plasmid transfer from pKM101ΔtraC1134 donor cells. 5 µg of purified TraC were mixed with donor and recipient cells on a solid surface (~10⁸ copies of TraC per cell), followed by

quantification of conjugative transfer. The results show a significant increase of the transconjugant numbers in the presence of extracellular TraC (~200 fold) (**Fig. 6A**). The addition of purified TraC does not have a measurable impact on the conjugation rate of *E. coli* carrying the pKM101 donor or the R388 plasmid control. The partial restoration of plasmid transfer suggests an extracellular role of secreted TraC during conjugation and it may interact with recipient cells. To test this possibility, we mixed purified TraC with recipient cells and indeed TraC co-sedimented with recipient cells indicating that it may bind to recipients (**Fig. 6B**). Future studies will show whether this observation reflects a specific interaction and whether there is a specific receptor on recipient cells.

Discussion

TraC is known to locate in various cellular compartments, e.g. in the membrane, in the periplasm and attached to the pilus. TraC is also exposed to the surface and secreted to the extracellular medium in a soluble form (23, 26). We purified cell-bound and secreted Strep-tagged TraC and we detected other proteins that co-eluted after affinity purification. BCCP is the only biotinylated protein in *E. coli*, and it is known to co-purify as a contaminant when using the Strep-tag affinity columns (33). This probably explains why it co-eluted with TraC from the soluble (S) fraction. The other co-eluted proteins may represent specific interaction with tagged TraC. In a previous study, crosslinking showed an interaction between TraC and many outer membrane proteins including Bam proteins and OmpA as we have found here in the case of membrane-bound TraC (M fraction) (23). The major outer membrane protein LPP is the most abundant cellular protein and it is present in the periplasm and exposed to the cell surface (34). LPP co-eluted only with the secreted form of TraC suggesting that it may undergo a specific interaction during the secretion process. SEC-MALS showed that TraC is a monomer when purified from different subcellular localizations (S, M and SN), despite the fact that crosslinking showed formation of higher molecular weight complexes in the presence of DSS. The crosslinking results could be interpreted as evidence for transient non-specific protein-protein interactions between TraC and other proteins such as OmpA and LPP.

Several T4SS proteins have been localized by immuno-localization at the cell pole (35-38). In *A. tumefaciens* the polar localization of VirB5 requires the presence of VirB8 and VirB9 (36), and VirB5-like proteins are also suggested to be present as in the inner membrane complex of the T4SS (4, 13). Here, we used two complementary microscopic approaches to localize TraC in permeabilized cells demonstrating accumulation at the cell perimeter and at the pole. The localization was independent of other T4SS components. These results indicate that the polar accumulation of TraC reflects localization of TraC in the periplasm or in the inner membrane. In contrast, a previous study of non-permeabilized cells by immunofluorescence detected TraC as distinct foci on the cell surface (23). These results suggest two different routes for the trafficking of TraC. After its translocation to the periplasm by the signal peptide, TraC is directed to the cell surface and secreted into the extracellular medium in a T4SS-independent fashion. Alternatively, TraC accumulates at the cell pole where it may integrate the T4SS. It is noteworthy that the T-pilus in *A. tumefaciens* assembles at the cell pole probably reflecting a T4SS assembly site (39).

The conjugative phenotype of *E. coli* expressing a TraC-deficient T4SS can be partially restored by the presence of a helper cell producing a functional pKM101 T4SS (26, 28). We here tested the effect of purified TraC during conjugation and phage infection of a TraC-deficient strain (carrying pKM101 Δ *traC*1134). We detected a significant 200-fold increase of plasmid transfer during conjugation, but no effect on Ike and PRD1 phage infection. Interestingly, we showed that TraC may interact with the recipient cells, and further experiments are needed to identify whether this interaction is specific. Thus, extracellular TraC could promote cell-to-cell contact during conjugation by promoting an interaction with the recipient cell. This is in agreement with previous studies showing a role of VirB5-like proteins as adhesins during conjugation and host cell infection (15, 16, 23-25). The detection of TraC in purified OMV raised the possibility that neighboring bacteria can share T4SS subunits to complement deficiencies and this may be the basis for extracellular complementation. It will be interesting to assess whether other T4SS subunits are present in purified OMV, and whether these vesicles influence the efficacy of conjugation and of phage infection.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC, #RGPIN-2017-05123) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, #398288 and #274108) to C.B. We grateful to Dr. Aurélien Fouillien at the Université de Montréal EM facility in the Faculty of Dentistry for technical support and assistance. We also thank Dr. Nicolas Stifani and Dr. Normand Cyr (Department of Biochemistry and Molecular Medicine) at the Université de Montréal Faculty of Medicine for technical support and help with data analysis.

Experimental procedures

Strains and growth conditions

The strains used are listed in supplementary Table 1. *E. coli* FM433 and derivatives were grown in Luria-Bertani (LB) media supplemented with streptomycin (100 µg/ml), spectinomycin (100 µg/ml), ampicillin (100 µg/ml), chloramphenicol (34 µg/ml), for plasmid propagation or selection of transconjugants. For induction of the LacI-repressed *trc* promoter in pTrc200 constructs, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to a final concentration of 0.5 mM.

L-arabinose was used for the induction of the *ara* pBAD promoter.

Protein expression and purification

TraC was overproduce and purified as described elsewhere with minor modification (27, 40). *E. coli* strain BL21star (λDE3) harboring pTrcTraC_{Strep}, was grown in LB supplemented with 50 µg/mL kanamycin and 50 µg/mL streptomycin. Overnight precultures in LB were used to inoculate 3 litres culture (37 °C) until they reached an OD₆₀₀ of 0.6–0.8. Expression was induced by addition of 0.2 mM IPTG at 37 °C, and cultures were left incubated for 3 h. For purification, bacterial cells were harvested, and the obtained supernatant was purified using 0.22 µm filter and passed over a Strep-Tactin II column (GE Healthcare) to collect secreted TraC, and further eluted with 2.5 mM desthiobiotin. The harvested bacteria were resuspended in binding buffer (100 mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) with cComplete Mini Protease Inhibitor mixture and DNase I at 100 µg/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 15000 × g for 30 min at 4 °C, and the supernatant was retained. Pursuing ultracentrifugation at 250,000 × g for 1 h at 4 °C, to separate soluble and membrane bound TraC. The soluble fraction was passed over Strep-Tactin II column and soluble TraC was eluted with 2.5 mM desthiobiotin. Total membranes were collected and solubilized overnight at 4 °C with gentle stirring binding buffer with 0.1% (wt/vol) detergent DDM

with cOmplete Mini Protease Inhibitor mixture. This material was then centrifuged for 1h at $35000g \times g$ to collect DDM-solubilized TraC for purification over a Strep-Tactin II column and eluted using 2.5 mM desthiobiotin. For biochemical analysis, TraC was further purified in phosphate buffer (50 mM phosphate, 100 mM NaCl pH 7.4), by size exclusion chromatography (SEC) using a Superdex 75 column (GE Healthcare).

Protein complex analysis

The oligomerization state of TraC was analyzed by SEC-MALS as described in ref. (40). SEC-MALS was realized with the use of an ÄKTAmicro system (GE Healthcare) coupled to a Dawn HELEOS II 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 the ASTRA analysis software package, version 6.1.6.5 (Wyatt Technology). Protein samples were separated on a Superdex 75 10/300 increase SEC column (GE Healthcare) with a flow rate of 0.5 mL/min. BSA was used for calibration. A 0.1-mL sample of TraC at concentrations ranging between 1 and 10 mg/mL was injected and eluted in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 100 mM NaCl. The molecular mass of TraC was determined by the dual detection method implemented in the conjugated analysis mode of the ASTRA analysis software.

Conjugation assay

Quantitation of conjugative DNA transfer were monitored as described elsewhere with minor modifications (26). Equal amounts of donor and recipient cells from a mid-log phase culture were harvested and resuspended with LB medium without antibiotics. 1 μ l of recipient and donor cells were mixed on a prewarmed LB agar plate and incubated for 2 h at 37°C. L-arabinose was mixed with the LB agar to induce the expression of TraC variants from a pBAD plasmid containing strains, during conjugation. The spot was washed from the plate three times with 150 μ l of LB

medium. To quantitate conjugative transfer, dilutions were plated on LB media containing appropriate antibiotics for selection of plasmid-containing recipients.

Phage infection assay

Ike and PRDI bacteriophages infection were performed as described in reference (20). Briefly, 200 μ l of cells from mid-log phase culture, in the presence of inducers for TraC variants expression, were mixed with 3 ml of top agar and poured on LB plate containing appropriate antibiotic and inducer, and allowed to dry. Drops of 5 μ l of serially diluted phages were spotted on the surface of the top agar, and the plates were examined for plaques formation after overnight incubation at 37°C.

Cross-linking assay

Chemical cross-linking with DSS (Pierce) was performed as described elsewhere with minor modifications (41). Briefly, DSS was added in different concentrations (0.4 to 4 mM) to 10 μ l of purified TraC, and the samples were incubated for 30 min at RT, followed by the addition of 1 volume of Laemmli sample buffer and analysis by SDS-PAGE and Western blotting. For glutaraldehyde, different concentrations (0.001 % to 0.2 %) were used, and the incubation time was reduced to 5 min at R.T. For intracellular cross-linking, 1 ml of cell culture (O.D ~0.8) were centrifuged at 15000 g for 10 min and bacteria pellet was washed three times and incubated with 5 mM DSS for 30 min at RT, followed by the addition of 1 volume of Laemmli sample buffer and analysis by SDS-PAGE and Western blotting.

Outer membrane vesicle purification

Cells from late log phase liquid culture were removed by centrifugation two times (10 000g, 20 min). The supernatant was filtered through 0.22 μ M filter (Millipore) and OMV were collected by high-speed centrifugation at 100,000g for 1 hour. The obtained crude OMV were analyzed by western blotting using TraC specific antiserum and visualized by fluorescent or electron microscopy.

Negative-staining electron microscopy

5 μ l of purified OMV were deposit on negatively glow-discharged **300 mesh copper grid for 3 min** and blotted using Whatman filter paper. Samples were washed three times with filtered water, followed by staining with 2% uranyl acetate solution for 45 seconds. The stain was then removed by blotting the grid with Whatman filter paper and air drying at RT. The samples were imaged using a FEI Tecnai T12 120 kV TEM equipped with Gatan 2K AMT camera, in the Université de Montréal EM facility.

Fluorescence microscopy

For fluorescence microscopy, cells producing TraC-mCherry were induced with 10⁻⁴% of L-arabinose for 2h and fixed with 4% of paraformaldehyde. Cells were washed extensively, adhered to poly-lysine coated coverslip, and inverted onto a drop of ProLong Gold (Life Technologies). Immunolabeling was realized as described elsewhere with minor modification (42). cells producing TraC_{Flag} were induced with 10⁻³% of L-arabinose for 2h and fixed with 4% of paraformaldehyde. Cells were washed extensively and permeabilized with 0.1% Triton-X100, 100 μ g/ml of lysozyme and 5mM of EDTA. After washing 3 times cells were blocked with 2% BSA for 1h at 37 followed by incubation with 1/100 dilution of anti-Flag monoclonal antibody (Cell Signaling) for 1.5h at RT. Cells were then washed 3 times and incubated with 1/1000 of monoclonal secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 594 (Invitrogen) for 45 min at RT in the dark. Cell membranes were stained with 10 mM of TMA-DPH for 10 min at RT in the dark. Cells were washed, adhered to

poly-lysine coated coverslip, and inverted onto a drop of ProLong Gold (Life Technologies). 5 μ l of samples were spotted on a coverslip and immobilized by 3 μ l of ProLong Diamond (Life Technologies, Mississauga, ON, Canada). Samples were examined at room temperature with a $\times 63/1.4$ oil objective under structured illumination microscopy using an Elyra PS1 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). mCherry proteins and Alexa fluor 594 conjugated antibodies were excited at 561 nm, and emission around 610 nm was observed using a 14-bit electron-multiplying charge-coupled device (EMCCD) camera. The membrane dye TMA-DPH was excited at 405 nm, and the emission was observed at around 460 nm. Z-stack volumes were acquired using the SIM and reconstructed using Zen Black edition software. The fluorescence of entire bacteria and of each bacterial pole was quantified using ImageJ software.

Figures and Legends

Figure 1. Tricine-SDS-PAGE analysis of the elution fractions after strep-column affinity purification. (Upper panel) silver staining, (lower panel) western blot analysis with TraC-specific antiserum. Arrows indicate the molecular weight of TraC. S: soluble, SN: secreted, M: membrane, MW: molecular weight marker.

Figure 2. Purification of soluble, membrane-bound and secreted TraC_{Strep}. (A) Elution profile of TraC_{Strep} with size exclusion chromatography. (B) (upper panel) SDS-PAGE analysis of the purified TraC_{Strep}, (lower panel) western blot analysis with TraC-specific antiserum. (C) Western blot analysis with TraC specific antiserum of the purified periplasmic, membrane and secreted TraC_{Strep} in the absence and presence of increasing concentrations (0.4 – 4 mM) of the cross-linking agent DSS. Arrows indicate higher molecular-weight complexes formed after cross-linking. (D) Analysis of the oligomerization state of TraC. Elution profile of the TraC (left) is shown with the molecular weight estimated by MALS (right). S: soluble, SN: secreted, M: membrane, MW: molecular weight marker.

Figure 3. Cellular localization of TraC. (A) Cell producing TraC_{Flag} in the presence of the pKM101 T4SS. TraC_{Flag} foci were detected by reactivity with anti-Flag mouse primary and AlexaFluor 594-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (red) at the perimeter (i) and at the pole (ii) of the cell. Cell membrane was visualized by staining with TMA-DPH (blue). White arrows indicate polar accumulation of TraC_{Flag}. (B) Cell producing TraC_{mCherry} in the presence, or absence, of the pKM101 T4SS. TraC_{mCherry} (in red) were detected by structural illumination microscopy using mCherry specific filters (left panel). Quantification of the fluorescence intensity across 50 cells showing preferentially polar localization of TraC (right panel).

Figure 4. Detection of TraC in purified outer membrane vesicles (OMV). (A) Purified OMV under negative staining electron microscopy. Arrows point to OMV in different sizes. (B) western

blot analysis using TraC-specific antiserum, of the purified OMV from a TraC-deficient and TraM-deficient cells culture supernatant. Arrow indicate the molecular weight of TraC. (C) Purified OMV under fluorescence microscopy from TraC_{mCherry} producing cells. (D) western blot analysis using TraC-specific antiserum, of the purified OMV from culture supernatant of TraC-deficient and TraC_{mCherry} producing cells.

Figure 5. Effect of extracellular TraC on IncN specific phages infection. (A) Phage infection rates monitored using a TraC-deficient cells producing increasing amount of TraC expressed under *ara* pBAD promoter. (B) The effect of 5 µg of purified TraC on pKM101 or TraC-deficient cells sensitivity toward a serial dilution of Ike and PRDI phages. (+) and (-) indicate the presence or absence of purified TraC during the infection. (C) Western blot analysis using TraC-specific antiserum, of Ike and PRDI interaction with 5 µg of purified TraC, in the absence or presence of 2.5 mM of DSS. Arrows indicate a high molecular weight complex formed after crosslinking.

Figure 6. Effect of extracellular TraC on conjugation efficacy. (A) The effect of 5 µg of purified TraC, or buffer alone, on the plasmid transfer rate during conjugation for wild type pKM101, TraC-deficient strain, and R388 plasmid, containing strain. Values and S.D. (*error bars*) were calculated from three independent experiments. (B) Western blot analysis using TraC-specific antiserum, for the interaction between purified TraC (10 µg) or secreted TraC from 1 ml culture, with the recipient cell WL400. Arrow indicates the molecular weight of TraC.

Supplementary data

Supplementary Table 1. Bacterial strains and plasmids.

Strains or plasmids	Genotype/description	Source or reference

<i>E. coli</i> strains		
XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac (F' proAB lacIqZAM15 Tn10 (Tetr))</i>	Agilent Technologies
BL21(DE3) star	<i>F- ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm rne131 (DE3)</i>	Invitrogen
FM433	<i>Spc-araD139 Δ (argF-lac)U169 ptsF25 deoC1 relA1 flbB5301 rpsE13 Δ (srl-recA)306::Tn10</i> , conjugation donor	(43)
WL400	<i>Cm-Str-araD139 Δ (argF-lac)U169, ptsF25 deoC1 relA1 flbB5301 rpsL150 ΔselD204::cat</i> , conjugation recipient	W. Leinfelder, unpublished data
Plasmids		
pKM101	Amp ^r , <i>mucA</i> , <i>mucB</i> , TraI-TraIII region for DNA processing, DNA transfer, and entry exclusion	(28)
pKM101 <i>traC</i>	Amp ^r , Km ^r , pKM101 <i>traC</i> 1134::Tn5	(28)
pKM101 <i>traM</i>	Amp ^r , Km ^r , pKM101 <i>traM</i> 363::Tn5	(28)
pTrc200	Str ^r , Spc ^r , pVS1 derivative, <i>LacIq</i> , <i>trc</i> promoter expression vector	(17)
pTrc200TraC	pTrc200, <i>traC</i> PCR fragment cloned downstream of the <i>trc</i> promoter of pTrc200	(27)
pTrc200TraC _{strep}	pTrc200, <i>traC-strepII</i> PCR fragment cloned downstream of the <i>trc</i> promoter of pTrc200	This work
pTrc200TraC _{Flag}	pTrc200, <i>traC</i> -(3x) <i>Flag</i> PCR fragment cloned downstream of the <i>trc</i> promoter of pTrc200	This work
pTrc200TraC _{mCherry}	pTrc200, <i>traC</i> with <i>mCherry</i> in C-terminal, PCR fragment cloned downstream of the <i>trc</i> promoter	This work
pVSBAD	Str ^r , Spc ^r , pVS1 derivative, <i>araBAD</i> promoter expression vector	(27)
pVSBAD TraC	pVSBAD, <i>traC</i> PCR fragment cloned downstream of the <i>araBAD</i> promoter of pVSBAD	(27)

pVSBAD TraC _{strep}	pVSBAD, <i>traC-strepII</i> PCR fragment cloned downstream of the <i>araBAD</i> promoter of pVSBAD	This work
pVSBAD TraC _{Flag}	pVSBAD, <i>traC-(3x)Flag</i> PCR fragment cloned downstream of the <i>araBAD</i> promoter of pVSBAD	This work
pVSBAD TraC _{mCherry}	pVSBAD, <i>traC</i> with <i>mCherry</i> in C-terminal, PCR fragment cloned downstream of the <i>araBAD</i> promoter of pVSBAD	This work

Supplementary Figure 1. (A) Western blot analysis using TraC-specific antiserum, of TraC_{strep} expression level in total cell lysate under native promoter or pTrc200 promoter using 0.2 mM of IPTG. Asterisk (*) indicate TraC_{strep}. Functionality of TraC_{strep} was monitored by conjugation (B) and phage infection (C) using 0.2 mM IPTG. Values and S.D. (*error bars*) were calculated from three independent experiments.

Supplementary Figure 2. Mass spectrometry analysis of the co-eluted proteins shown in Figure 1. Proteins from gels were cut and analyzed by mass spectrometry. Identified peptides are highlighted in yellow.

Supplementary Figure 3. Functionality assays of TraC_{Flag}. (A) Western blot analysis using TraC-specific antiserum and anti-Flag antibodies of TraC expression level in total cell lysate under native promoter or *ara* pBAD promoter using increasing level of induction by arabinose. Arrows indicate the molecular weight of TraC_{Flag}; asterisk (*) indicate TraC. Functionality of TraC_{Flag} was monitored by conjugation (B) and phage infection (C) using 10⁻³% of arabinose. Values and S.D. (*error bars*) were calculated from three independent experiments.

Supplementary Figure 4. Functionality assays of TraC_{mCherry}. (A) Western blot analysis using TraC-specific antiserum, of TraC_{mCherry} expression level in total cell lysate under *ara* pBAD

promoter using increasing amount of arabinose for induction. (B) Functionality of TraC_{mCherry} was monitored by conjugation using 10⁻⁴% of arabinose. Arrow indicates TraC-mCherry; asterisk (*) indicate TraC.

References

1. V. C. Darbari, G. Waksman, "Structural Biology of Bacterial Type IV Secretion Systems" in Annual Review of Biochemistry, Vol 84, R. D. Kornberg, Ed. (2015), vol. 84, pp. 603-629.
2. E. Cascales, P. J. Christie, The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 137-149 (2003).
3. J. Guglielmini, F. de la Cruz, E. P. C. Rocha, Evolution of Conjugation and Type IV Secretion Systems. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 315-331 (2013).
4. H. H. Low *et al.*, Structure of a type IV secretion system. *Nature* **508**, 550-+ (2014).
5. P. J. Christie, Type IV secretion: the Agrobacterium VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1694**, 219-234 (2004).
6. M. B. Durrenberger, W. Villiger, T. Bachi, CONJUGATIONAL JUNCTIONS - MORPHOLOGY OF SPECIFIC CONTACTS IN CONJUGATING ESCHERICHIA-COLI BACTERIA. *Journal of Structural Biology* **107**, 146-156 (1991).
7. A. L. Samuels, E. Lanka, J. E. Davies, Conjugative junctions in RP4-mediated mating of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **182**, 2709-2715 (2000).
8. S. R. Partridge, S. M. Kwong, N. Firth, S. O. Jensen, Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **31** (2018).
9. J. Botelho *et al.*, Combining sequencing approaches to fully resolve a carbapenemase-encoding megaplasmid in a pseudomonas shirazica clinical strain. *Emerging Microbes & Infections* **8**, 1186-1194 (2019).
10. J. O'Neill (2016) Tackling Drug-resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. in *Review on Antimicrobial Resistance*.
11. B. Hu, P. Khara, P. J. Christie, Structural bases for F plasmid conjugation and F pilus biogenesis in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 14222-14227 (2019).

12. P. Khara, L. Song, P. J. Christie, B. Hu, In Situ Visualization of the pKM101-Encoded Type IV Secretion System Reveals a Highly Symmetric ATPase Energy Center. *mBio* **12**, e0246521-e0246521 (2021).
13. K. Mace *et al.*, Cryo-EM structure of a type IV secretion system. *Nature* **607**, 191-196 (2022).
14. A. L. Jones, E. M. Lai, K. Shirasu, C. I. Kado, VirB2 is a processed pilin-like protein encoded by the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *J. Bacteriol.* **178**, 5706-5711 (1996).
15. S. Backert, R. Fronzes, G. Waksman, VirB2 and VirB5 proteins: specialized adhesins in bacterial type-IV secretion systems? *Trends Microbiol.* **16**, 409-413 (2008).
16. K. A. Aly, C. Baron, The VirB5 protein localizes to the T-pilus tips in *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiology-Sgm* **153**, 3766-3775 (2007).
17. H. Schmidt-Eisenlohr *et al.*, Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **181**, 7485-7492 (1999).
18. P. M. Silverman, M. B. Clarke, New insights into F-pilus structure, dynamics, and function. *Integrative Biology* **2**, 25-31 (2010).
19. W. Paranchych, L. S. Frost, THE PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF PILI. *Adv. Microb. Physiol.* **29**, 53-114 (1988).
20. C. Cellini, V. S. Kalogeraki, S. C. Winans, The hydrophobic TraM protein of pKM101 is required for conjugal transfer and sensitivity to donor-specific bacteriophage. *Plasmid* **37**, 181-188 (1997).
21. R. Meng *et al.*, Structural basis for the adsorption of a single- stranded RNA bacteriophage. *Nat. Commun.* **10**, 8 (2019).
22. L. Harb *et al.*, ssRNA phage penetration triggers detachment of the F-pilus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 25751-25758 (2020).

23. C. Gonzalez-Rivera *et al.*, Two pKM101-encoded proteins, the pilus-tip protein TraC and Pep, assemble on the Escherichia coli cell surface as adhesins required for efficient conjugative DNA transfer. *Mol. Microbiol.* **111**, 96-117 (2019).
24. S. Barden, H. H. Niemann, Adhesion of Several Cell Lines to Helicobacter pylori CagL Is Mediated by Integrin alpha V beta 6 via an RGD₂ Motif. *J. Mol. Biol.* **427**, 1304-1315 (2015).
25. T. Kwok *et al.*, Helicobacter exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* **449**, 862-U864 (2007).
26. H. Schmidt-Eisenlohr, N. Domke, C. Baron, TraC of IncN plasmid pKM101 associates with membranes and extracellular high-molecular-weight structures in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **181**, 5563-5571 (1999).
27. H. J. Yeo, Q. Yuan, M. R. Beck, C. Baron, G. Waksman, Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM101. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15947-15952 (2003).
28. S. C. Winans, G. C. Walker, CONJUGAL TRANSFER SYSTEM OF THE INCN PLASMID PKM101. *J. Bacteriol.* **161**, 402-410 (1985).
29. W. Huang, L. Meng, Y. Chen, Z. Dong, Q. Peng, Bacterial outer membrane vesicles as potential biological nanomaterials for antibacterial therapy. *Acta biomaterialia* 10.1016/j.actbio.2021.12.005 (2021).
30. D. E. Bradley, MORPHOLOGY OF PILI DETERMINED BY THE N-INCOMPATIBILITY GROUP PLASMID N3 AND INTERACTION WITH BACTERIOPHAGE-PR4 AND BACTERIOPHAGE-IKE. *Plasmid* **2**, 632-636 (1979).
31. A. M. Grahn, J. Caldentey, J. K. H. Bamford, D. H. Bamford, Stable packaging of phage PRD1 DNA requires adsorption protein P2, which binds to the IncP plasmid-encoded conjugative transfer complex. *J. Bacteriol.* **181**, 6689-6696 (1999).
32. L. Xu, S. D. Benson, S. J. Butcher, D. H. Bamford, R. M. Burnett, The receptor binding protein P2 of PRD1, a virus targeting antibiotic-resistant bacteria, has a novel fold suggesting multiple functions. *Structure* **11**, 309-322 (2003).

33. W. W. S. Wang, D. Das, M. R. Suresh, Biotin carboxyl carrier protein co-purifies as a contaminant in core-streptavidin preparations. *Molecular Biotechnology* **31**, 29-40 (2005).
34. C. E. Cowles, Y. Li, M. F. Semmelhack, I. M. Cristea, T. J. Silhavy, The free and bound forms of Lpp occupy distinct subcellular locations in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.* **79**, 1168-1181 (2011).
35. R. B. Kumar, Y. H. Xie, A. Das, Subcellular localization of the Agrobacterium tumefaciens T-DNA transport pore proteins: VirB8 is essential for the assembly of the transport pore. *Mol. Microbiol.* **36**, 608-617 (2000).
36. P. K. Judd, R. B. Kumar, A. Das, Spatial location and requirements for the assembly of the Agrobacterium tumefaciens type IV secretion apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11498-11503 (2005).
37. C. Mary, A. Fouillen, B. Bessette, A. Nanci, C. Baron, Interaction via the N terminus of the type IV secretion system (T4SS) protein VirB6 with VirB10 is required for VirB2 and VirB5 incorporation into T-pili and for T4SS function. *J. Biol. Chem.* **293**, 13415-13426 (2018).
38. D. Ghosal *et al.*, Molecular architecture, polar targeting and biogenesis of the Legionella Dot/Icm T4SS. *Nat. Microbiol* **4**, 1173-1182 (2019).
39. E. M. Lai, O. Chesnokova, L. M. Banta, C. I. Kado, Genetic and environmental factors affecting T-Pilin export and T-Pilus biogenesis in relation to flagellation of Agrobacterium tumefaciens. *J. Bacteriol.* **182**, 3705-3716 (2000).
40. B. Casu *et al.*, VirB8 homolog TraE from plasmid pKM101 forms a hexameric ring structure and interacts with the VirB6 homolog TraD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 5950-5955 (2018).
41. Q. Yuan *et al.*, Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *J. Biol. Chem.* **280**, 26349-26359 (2005).
42. N. Buddelmeijer, M. Aarsman, T. den Blaauwen, Immunolabeling of Proteins in situ in Escherichia coli K12 Strains. *Bio-protocol* **3**, e852 (2013).

43. F. Zinoni, J. Heider, A. Bock, FEATURES OF THE FORMATE DEHYDROGENASE MESSENGER-RNA NECESSARY FOR DECODING OF THE UGA CODON AS SELENOCYSTEINE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 4660-4664 (1990).

Figure 1

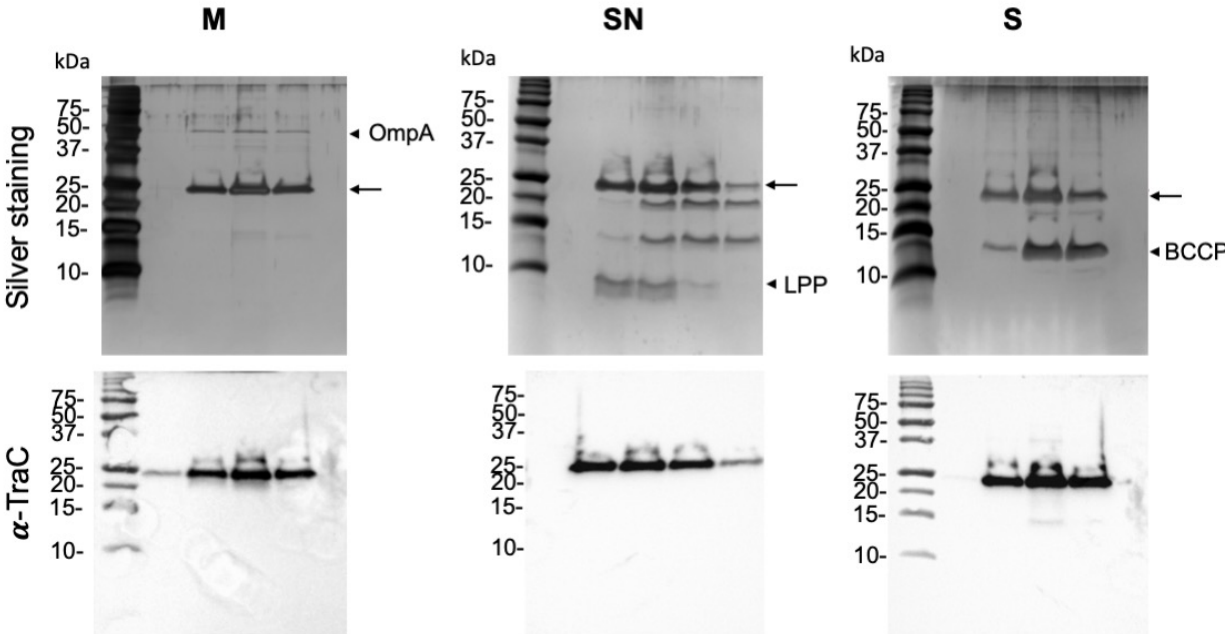


Figure 2

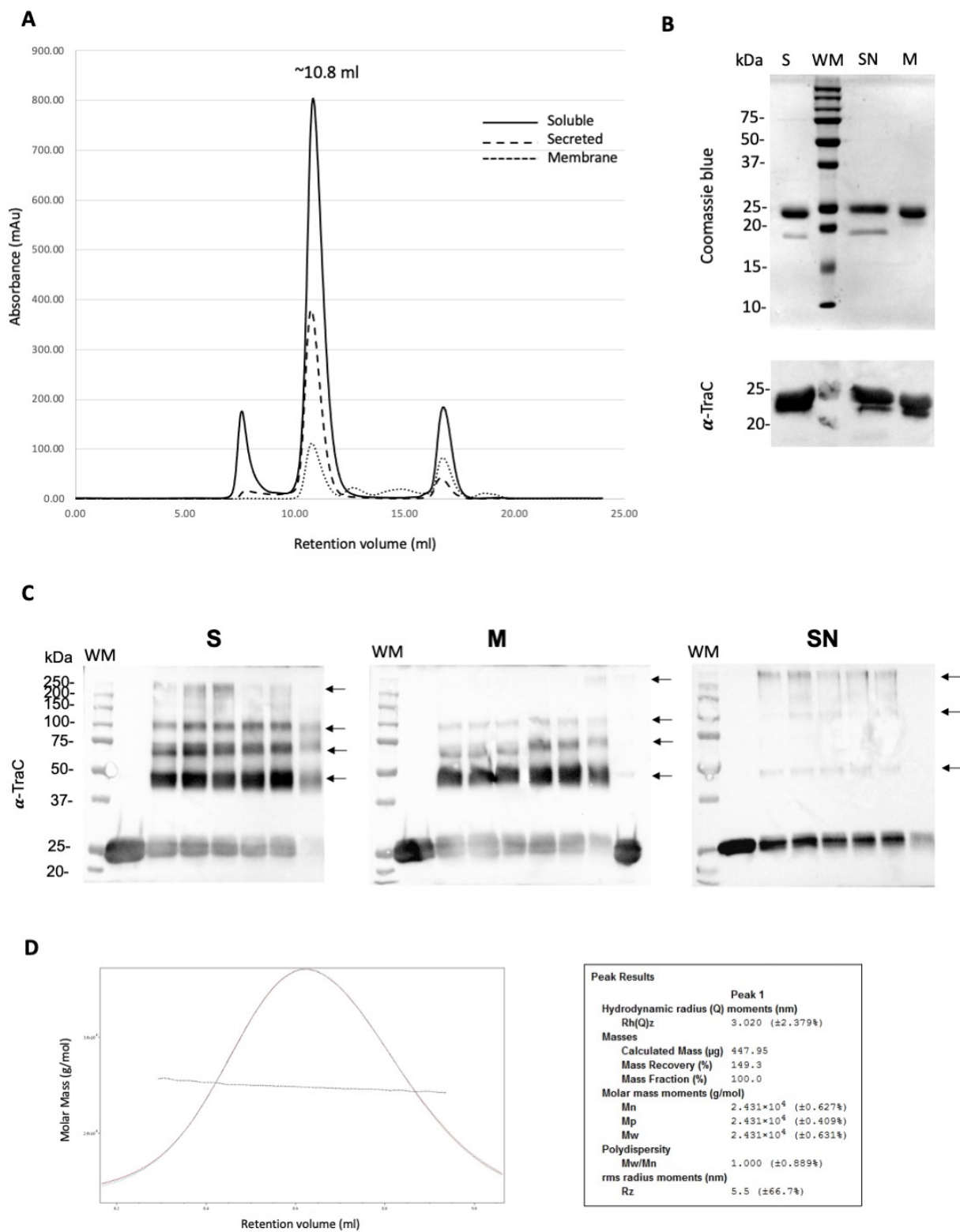
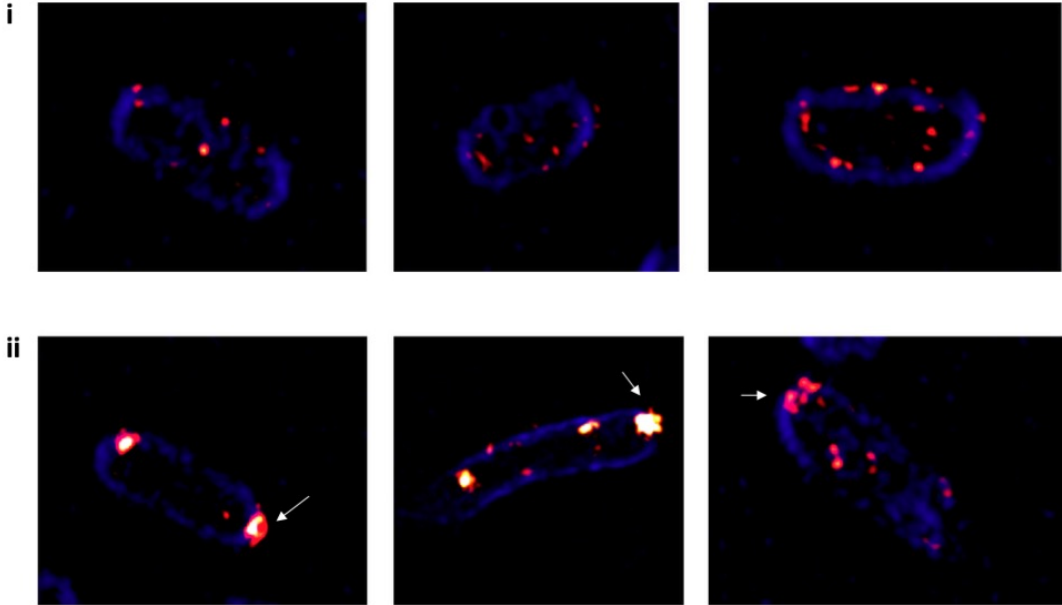


Figure 3

A



B

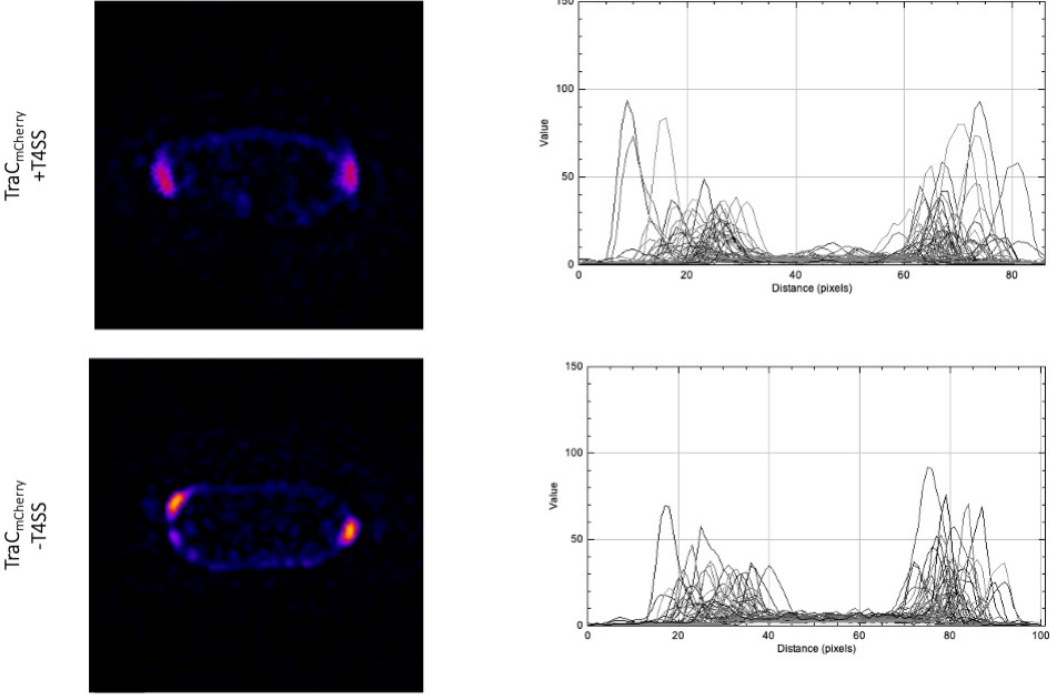


Figure 4

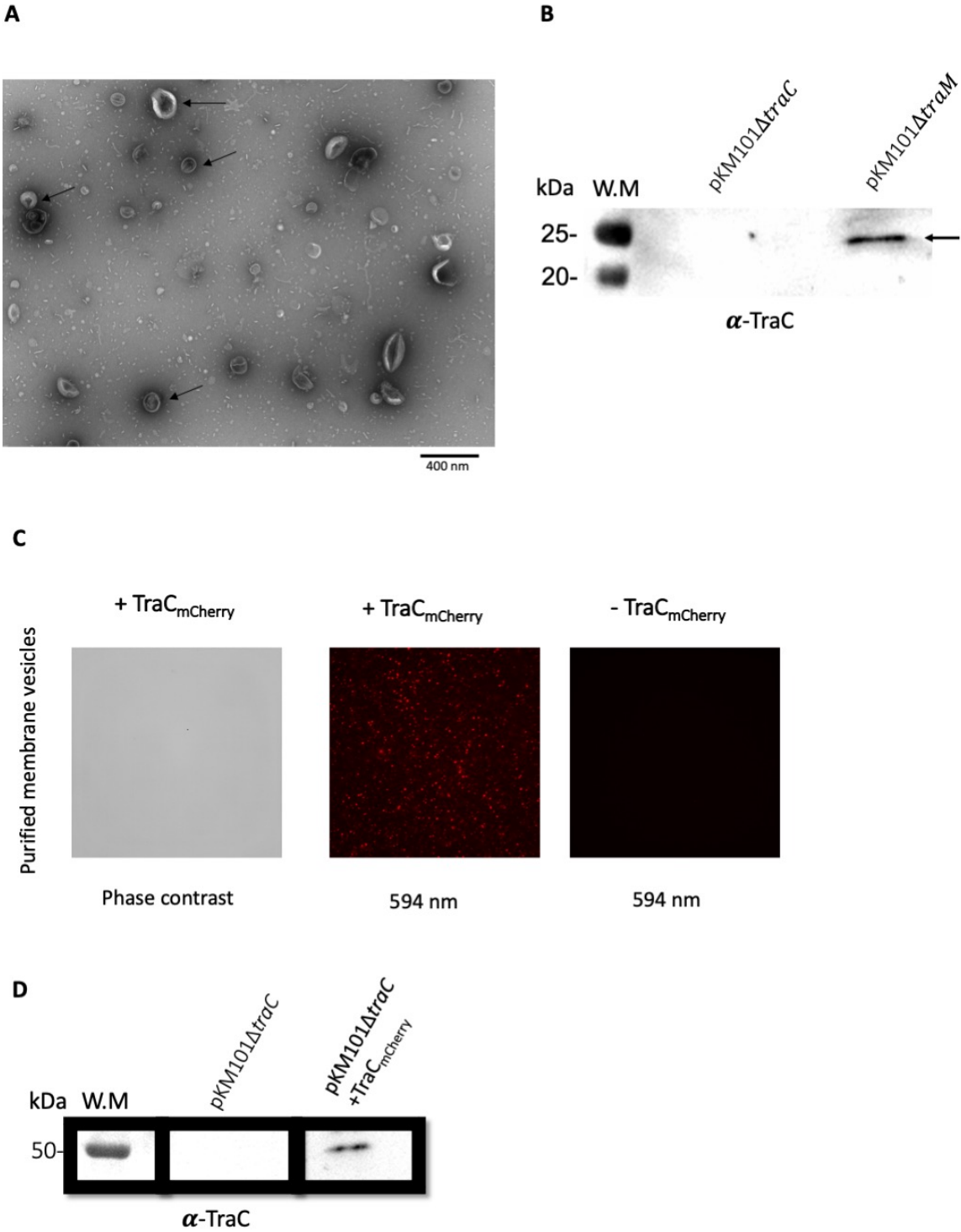


Figure 5

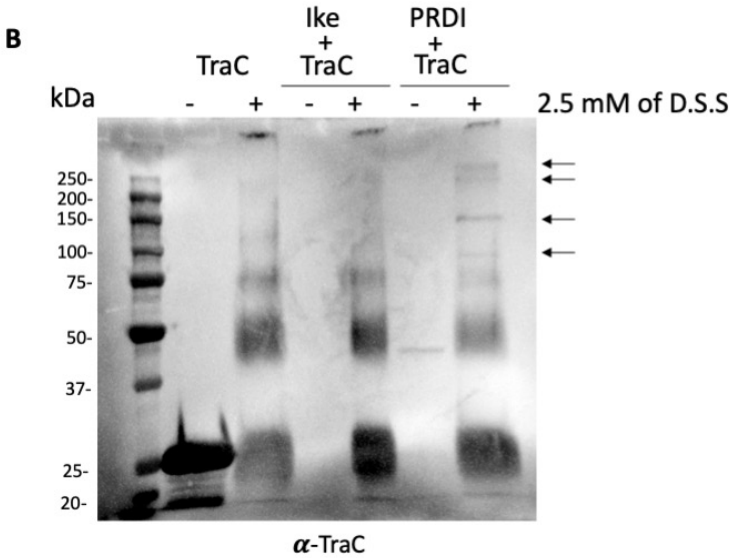
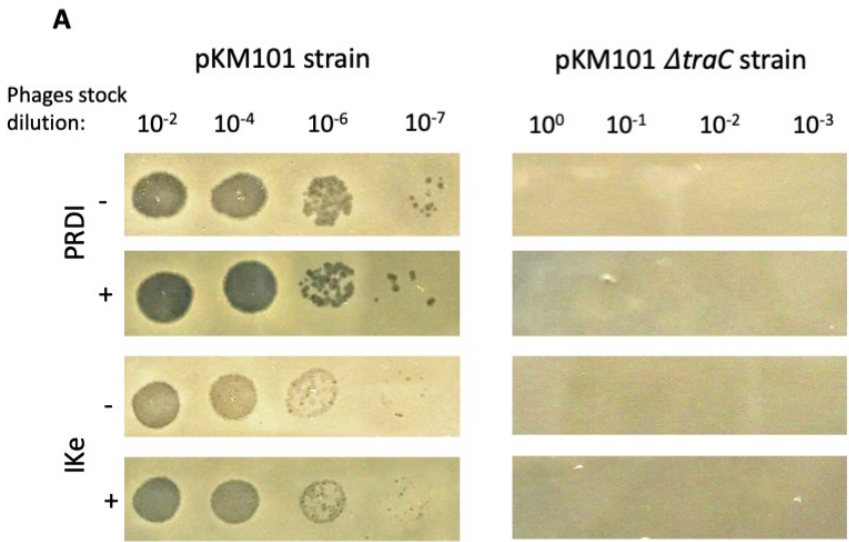
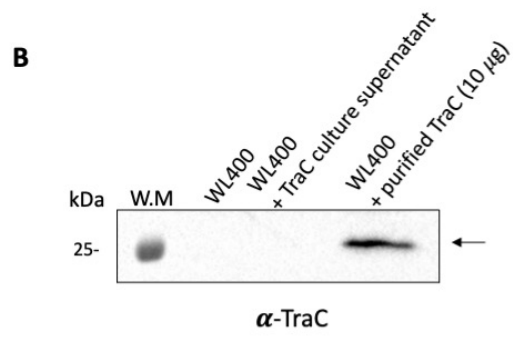
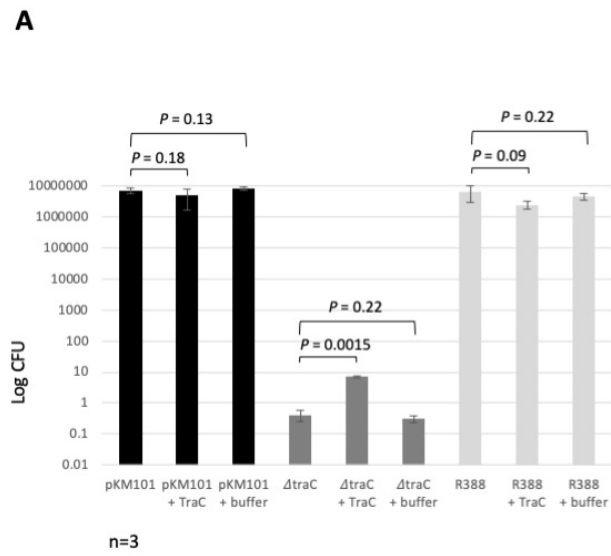
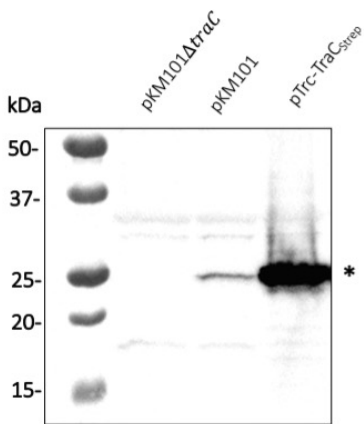


Figure 6

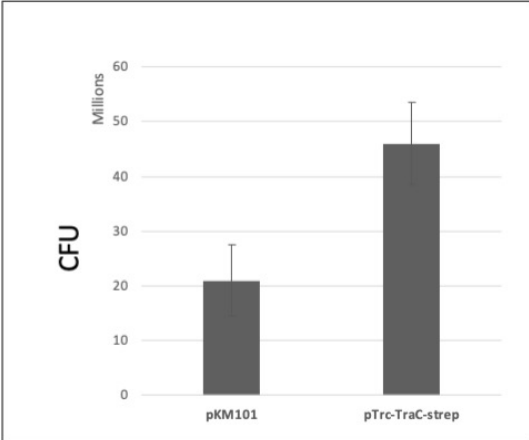


Supplementary Figure 1

A



B



C

	IKe	PRDI
pKM101	S	S
pKM101ΔTraC	R	R
pTrc-TraC _{strep}	S	S

Supplementary Figure 2

10 kDa Protein

P69776 (100%), 8,323.7 Da

Major outer membrane prolipoprotein Lpp OS=Escherichia coli (strain K12) OX=83333 GN=lpp PE=1 SV=1

3 exclusive unique peptides, 8 exclusive unique spectra, 15 total spectra, 26/58 amino acids (44% coverage)

MKATKLV LGA VILGSTLLAG CSSNAK IDQL S SDVQTLNAK VDQLSNDVNA
MR S D V Q A A K D D A A R A N Q R L D N M A T K Y R K

13 kDa Protein

P0ABD8 (100%), 16,687.0 Da

Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase OS=Escherichia coli (strain K12) OX=83333 GN=accB PE=1 SV=1

21 exclusive unique peptides, 29 exclusive unique spectra, 95 total spectra, 110/156 amino acids (71% coverage)

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

50 kDa Protein

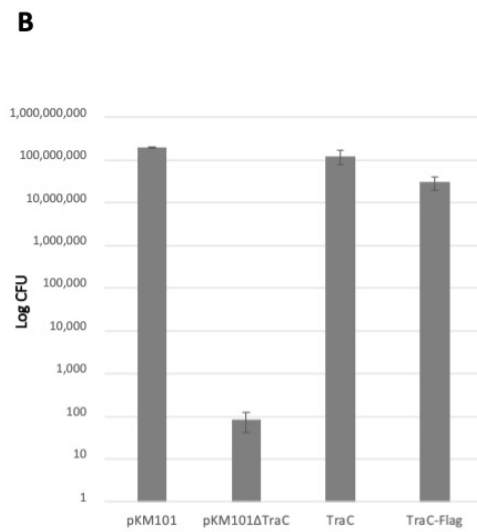
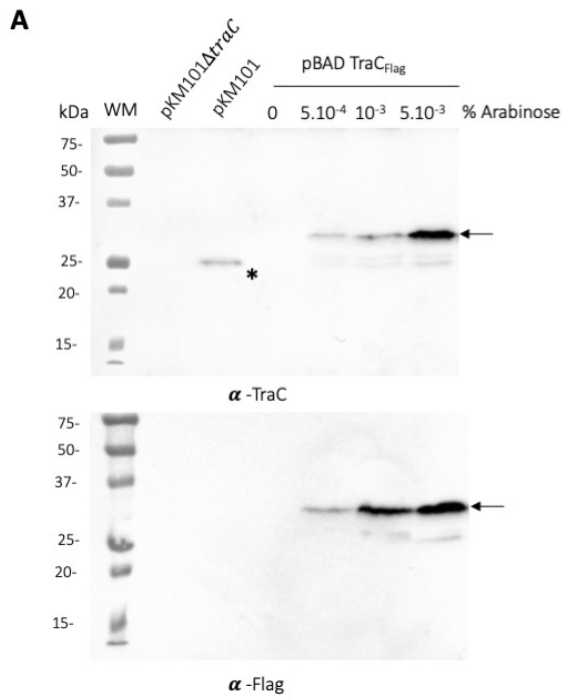
P0A910 (100%), 37,201.0 Da

Outer membrane protein A OS=Escherichia coli (strain K12) OX=83333 GN=ompA PE=1 SV=1

24 exclusive unique peptides, 30 exclusive unique spectra, 77 total spectra, 200/346 amino acids (61% coverage)

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

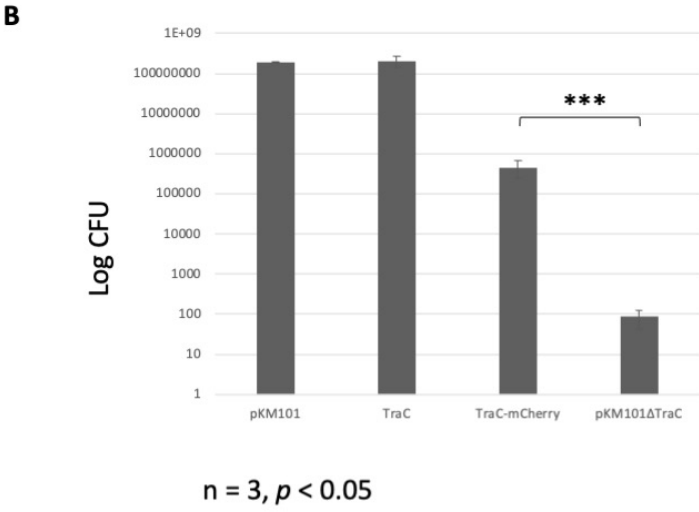
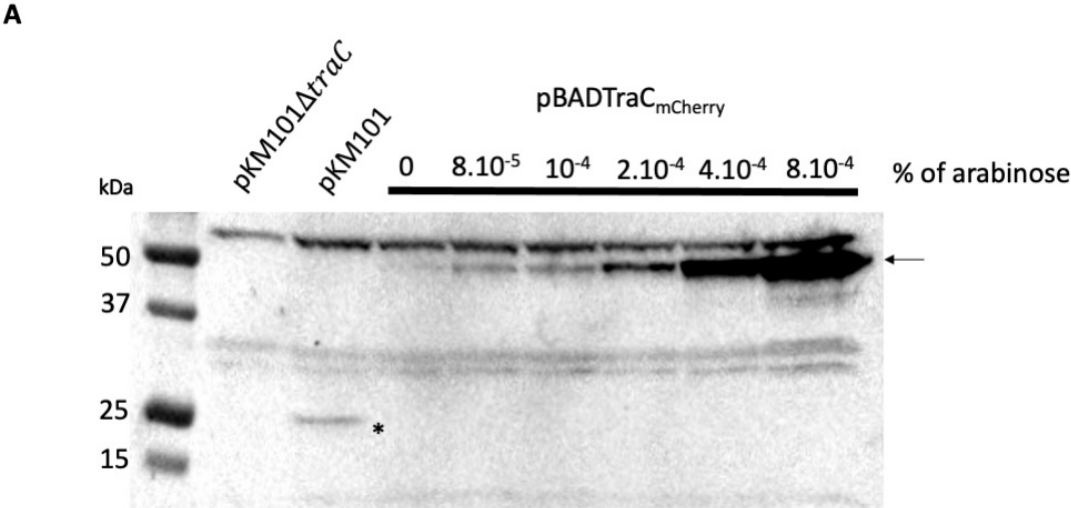
Supplementary Figure 3



C

	IKe	PRDI
pKM101	S	S
pKM101 Δ traC	R	R
TraC	S	S
TraC _{Flag}	S	S

Supplementary Figure 4



Chapitre 4 – Discussion

Les T4SSs représentent une cible importante pour l'amélioration de la santé publique, vue leurs rôles essentiels dans la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques et dans la pathogénicité de plusieurs bactéries. Dans cette thèse, nous avons profité de l'avancement technologique dans la biologie moléculaire et structurale pour répondre à des questions concernant la base moléculaire de l'assemblage et le fonctionnement des T4SSs. Ainsi, nos résultats sur les pili -T et -N du T4SS et sur la protéine TraC du plasmide conjugatif pKM101, contribuent à élucider plus des détails moléculaires sur les T4SSs, nécessaires dans la recherche pour les meilleurs inhibiteurs.

-Analyse structurale des pili -T et -N

Le rôle des pili des T4SSs et leurs contributions durant la conjugaison, représentent toujours un sujet de recherche qui, avec le temps, accumule les données pour obtenir les réponses aux multiples questions sur ces structures extracellulaires filamenteuses. Plusieurs études suggèrent que les pili représentent un canal pour le passage de l'ADN vers la cellule receveuse (126, 134, 143), mais jusqu'à présent il n'existe pas des indices directs pour confirmer cette hypothèse.

La résolution des structures des pili de type F a montré qu'ils sont composés des pilines et des phospholipides (135, 162). La présence des phospholipides, et en stœchiométrie de 1 : 1 avec les pilines, était surprenante et a suscité plusieurs questions sur le rôle et l'importance des phospholipides dans les pili. En plus, le choix du phospholipide semble être sélectif parmi un groupe des phospholipides qui entrent dans la composition de la membrane cellulaire (135). La piline TraA des plasmides de type F est connue de subir une acétylation par la protéine TraX, à la suite de son insertion dans la membrane interne et durant le processus de sa maturation (151-

153). Cependant, l'acétylation a été montrée non essentielle pour la formation du pilus (154). Des modifications de certaines acides aminés de TraA qui se trouvent en contact avec le phospholipide à l'intérieur du pilus, abolissent la formation du pilus et le transfert de l'ADN durant la conjugaison (135), ce qui peut être considéré un indice sur la nécessité des phospholipides pour la formation du pilus. À ce stade, il n'est pas connu comment le phospholipide qui se trouve à côté de chaque TraA dans le pilus est incorporé dans cette structure extracellulaire.

Nos résultats présentés dans le chapitre 2 montrent que les pili -T et -N sont composés aussi d'un assemblage des pilines avec des phospholipides. Leur architecture générale est semblable à celle des pili F avec une forme hélicoïdale de cinq protofilaments. Les structures atomiques des protéines pilines TraA, VirB2 et TraM ainsi que leurs positions et leurs orientations dans le pilus présentent une similarité élevée. La ressemblance dans la structure et la composition entre les pili F, T et N indique une haute conservation de ces structures extracellulaires parmi les T4SSs et les différentes souches bactériennes, ce qui reflète leur importance et leur efficacité pour réaliser le transfert des substrats. Les pili F sont connus de subir des cycles d'extension et de rétraction, ce qui facilite les contacts entre les cellules et augmente le taux de transfert durant la conjugaison. Le mécanisme de ces cycles n'est pas encore défini, mais il a été proposé que la présence des phospholipides dans le pilus F facilite le processus de désintégration des pilines dans la membrane cellulaire durant la rétraction du pilus (50). Contrairement aux pili F, les pili T et N sont plus fragiles et ils sont relâchés dans le milieu extracellulaire où ils participent à la formation des biofilms et des agrégats cellulaires pour favoriser les contacts entre les bactéries (145-147). La présence des phospholipides et l'architecture générale des pili donc ne semblent pas être des critères principaux pour la rétraction des pili, mais peuvent toujours le faciliter.

La position des phospholipides dans le pilus laisse suggérer qu'ils jouent probablement un autre rôle important durant la conjugaison. En effet, la tête de la phosphatidylglycérole, de charge négative, est exposée au lumen du pilus F, et de ce fait elle impose une charge globale négative à l'intérieure du pilus, ce qui facilite probablement le passage de l'ADN chargé négativement à

travers le pilus par des forces de répulsion (135). Nos analyses faites sur le pilus T, suggèrent que le phospholipide à l'intérieure du pilus est la phosphatidylcholine. Ce type du phospholipide est rare chez les bactéries (non présent chez *E. coli*) et la membrane d'*A. tumefaciens* est connue d'être composé de ~22% de phosphatidylcholine (190) . Contrairement à la phosphatidylglycérole, la tête de la phosphatidylcholine est chargée positivement, et elle contribue, avec l'arginine Arg91, à rendre le lumen du pilus T chargé positivement. Cette différence de charge à l'intérieur des pili F et T, peut être expliquée par une sélectivité du phospholipide selon la souche et le substrat transféré. Il sera très intéressant d'étudier l'effet du changement du phospholipide sur la formation des pili et le transfert des nucléoprotéines durant la conjugaison. Nous avons modifié l'unique acide aminé chargé exposé au lumen (Arg91) par une lysine, alanine ou bien un acide glutamique dans le but d'étudier l'effet d'une modification de la charge globale du lumen sur le transfert du substrat chez *A. tumefaciens*. Les trois modifications ont déstabilisé la protéine VirB2 dans la cellule et empêché la formation du pilus. Les trois mutants ont inhibé aussi le transfert de l'ADN oncogène durant les infections réalisées sur la plante, constaté par l'absence de la formation des tumeurs. Des modifications similaires faites sur l'Arg94 de la protéine TraA du pilus F, n'ont pas affecté la formation des pili ni le transfert durant la conjugaison (135). Cependant, la substitution de l'Arg94 par un acide glutamique, a rendu la cellule résistante à l'infection par le phage f1, probablement à cause d'une force répulsive assez importante qui empêche le passage de l'ADN du phage à travers le pilus (135).

La structure du pilus T montre que la chaîne latérale de l'Arg91 se trouve en contact directe avec la tête du phospholipide, ce qui peut expliquer probablement l'importance de cette acide aminé pour la stabilité de VirB2. Si l'Arg91 représente un site essentiel pour la lipidation de VirB2 dans la membrane, alors une modification de l'Arg91 empêche la formation d'une lipoprotéine VirB2 prête pour être acheminée vers le site de nucléation du pilus pour ensuite s'insérer dans un protofilament. Dans ce cas, la protéine VirB2 va être plutôt dégradée par des enzymes de la cellule hôte. La force de liaison engendrée par le groupe guanidine à l'extrémité de la chaîne latérale de l'Arg91 avec la tête de la phosphatidylcholine, est plus élevée que celle de l'amine primaire à l'extrémité de la lysine, ce qui peut expliquer l'effet constaté après la modification de l'Arg91 par

une lysine. Il sera utile dans le futur d'étudier l'importance de l'His66 de la protéine TraM du pilus N, le seul acide aminé chargé et exposé au lumen, sur la formation du pilus et le transfert du substrat durant la conjugaison. Cela peut confirmer l'importance de la charge positive à l'intérieur du pilus. Selon nos résultats structuraux, le phospholipide du pilus N est probablement la phosphatidylglycérole, le même phospholipide présent dans les pili F. Le lumen du pilus N est chargé négativement par la présence de la phosphatidylglycérole et des futures études seront nécessaires pour explorer la relation entre la charge du lumen et le passage des substrats chez le pilus N.

Nous avons résolu les structures des pili N et T à 3 Å et 3.2 Å respectivement, ce qui représente la meilleure résolution obtenue pour les pili des T4SSs à ce jour. Les structures révèlent une multitude d'interactions hydrophobes entre les pilines (TraM pour le pilus N et VirB2 pour le pilus T), et entre les pilines et les phospholipides, qui maintiennent les milliers des sous unités assemblées dans une structure hélicoïdale filamenteuse. Les structures atomiques des protéines pilines, TraM et VirB2, représentent une grande similarité entre eux et avec la protéine TraA du pilus F, malgré une faible similarité entre les acides aminés de chaque protéine. TraM et VirB2, comme TraA, possèdent trois hélices alpha ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$), avec les extrémités N- et C-terminales orientées vers l'extérieure du pilus, et une loupe située entre $\alpha 2$ et $\alpha 3$ et orientée vers le lumen du pilus. Cette grande conservation structurale entre les pilines des T4SSs et des souches différentes, indiquent, encore une fois, l'importance et l'efficacité d'une telle architecture pour le fonctionnement des T4SSs et pour le transfert des différents substrats. Une comparaison des boucles chez TraA, TraM et VirB2, montre la présence d'un acide aminé chargé positivement (Arg94, His66 et Arg91 respectivement). Nos résultats ont montré que la modification de l'Arg91 de VirB2 déstabilise la protéine dans la cellule. En revanche, le changement d'Arg94 de TraA en Glu n'a pas eu d'impact sur l'assemblage du pilus et la conjugaison (135). Il sera donc intéressant d'étudier l'effet de la modification de l'His66 (TraM) sur la stabilité de la protéine, la formation du pilus et le transfert du substrat.

La protéine VirB2 du plasmide Ti et son homologue TrbC du plasmide RP4 sont connues de subir une étape de cyclisation pendant leurs processus de maturation (155-157). Selon les données obtenues par spectrométrie de masse sur des pili purifiés, les auteurs proposent que ces deux pilines deviennent des protéines cycliques après une liaison covalente de leurs côtés N- et C-terminales qui nécessite la libération d'une molécule d'eau (155-157). Nos résultats sur la structure de VirB2, ne montrent pas une protéine cyclique, et les extrémités N- et C-terminales de VirB2 sont trop éloignées pour former une liaison covalente, bien que la structure manque les quatre premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale (QASG). Nous suggérons la possibilité d'une liaison à l'intérieure de VirB2 au lieu des deux extrémités. En effet, nous avons trouvé une densité additionnelle autour de la Cys64, qui se trouve en face la Ser111 dans la structure de VirB2. La cystéine pourrait former une liaison thioether avec la sérine en libérant une molécule d'eau, ce qui serait conforme avec les résultats des études antérieures (155-157). Nous allons analyser VirB2 par spectrométrie de masse pour tenter d'identifier la nature de la modification sur la Cys64.

Une des prochaines étapes sera d'obtenir des échantillons concentrés des pili T et N. La concentration des pili est un facteur cruciale pour la résolution des structures par microscopie cryo-électronique, et l'optimisation de la préparation des grilles sera nécessaire pour pouvoir visualiser un nombre plus élevé des pili. Nous espérons résoudre les structures des pili T et N à une meilleure résolution pour avoir plus des détails atomiques sur les protéines pilines et sur les phospholipides, ainsi que sur les interactions qui maintiennent la structure de deux pili. Les pili T et N se composent d'une protéine majeure, le piline, ainsi que la protéine VirB5 qui a été localisée sur le bout du pilus T. Nous voulons donc résoudre la structure du bout des pili T et N pour confirmer la présence de VirB5 et TraC, et visualiser leurs modes d'assemblages et leurs interactions avec les protéines pilines. Ces informations seront d'une grande importance pour comprendre la biogenèse et l'assemblage du pilus ainsi que le mécanisme de reconnaissance et d'interaction avec la cellule hôte durant la conjugaison.

Le diamètre du lumen des pili T et N (~2nm) est convenable pour le passage de l'ADN simple brin avec la relaxase dépliée, mais en absence des indices directes, le passage de l'ADN à travers le pilus reste une hypothèse. Parmi les prochaines étapes, nous souhaitons résoudre la structure des pili T et N avec de l'ADN dans leurs lumens. Nous allons mélanger les pili purifiés avec de l'ADN simple brin pour permettre le passage de l'ADN à travers les pili, avant de procéder avec la microscopie cryo-électronique. La structure du pilus avec l'ADN aidera à comprendre le mécanisme du passage de l'ADN à travers le pilus, et l'effet des phospholipides et la charge globale du lumen sur ce passage.

-Caractérisation structurale et fonctionnelle de TraC

Nos résultats obtenus sur la composition et la structure des pili T et N ouvrent la possibilité d'autres études structurales dans le futur, notamment sur la structure et l'assemblage des protéines VirB5 sur le bout du pilus. Cependant, durant ma thèse, et considérant que les études sur les pili représentent plusieurs défis et peuvent prendre un temps considérable pour obtenir les résultats attendus, nous avons choisi d'étudier en même temps les protéines VirB5 qui constituent le composant mineur du pilus. Nous voulons caractériser les VirB5 dans la cellule afin de mieux comprendre leur fonction durant la conjugaison et la biogenèse du pilus, ainsi que leur rôle durant l'infection par les phages.

Les protéines VirB5 sont essentielles pour le transfert des substrats vers les cellules cibles, et elles ont été localisées dans la membrane interne, le périplasme, et exposées à la surface cellulaire. Ces emplacements peuvent représenter des points de transit pour les protéines VirB5 avant leur incorporation finale dans le pilus. Dans une étude antérieure réalisée sur TraC, une protéine homologue de VirB5, des mutants ont été identifiés capables d'inhiber la biogenèse du pilus sans affecter le transfert durant la conjugaison. D'autres mutants de TraC ont rendu la cellule résistante à l'infection par le phage Ike, sans perturber la sensibilité envers le phage PRDI (165). Ces résultats peuvent être interprétés par la présence des interactions protéine-protéine de

VirB5, qui interviennent dans le transfert conjugatif, la biogenèse du pilus et l'attachement des phages. En plus, les protéines VirB5, vu leur localisation extracellulaire, sont considérées des adhésines potentielles qui probablement jouent un rôle dans la reconnaissance et l'adhésion à la cellule receveuse avant le transfert du substrat.

La protéine TraC du plasmide conjugatif pKM101 est connue d'être sécrétée dans le milieu extracellulaire sous forme soluble indépendamment des autres sous unités du T4SS. Nous avons surexprimé et purifié TraC de la membrane, du périplasma et du milieu extracellulaire à fin d'étudier les interactions de TraC dans ces différentes localisations. L'étiquette STREP II a été utilisée pour purifier TraC par colonne d'affinité. Cette technique a été montrée très spécifique, et généralement la protéine fusionnée à STREP II est éluée sans la présence des contaminants. La présence d'autres protéines peut donc indiquer une interaction spécifique, ou bien non spécifique, avec la protéine d'intérêt, à l'exception de la protéine BCCP (biotin carboxyl carrier protein) qui est la seule protéine biotinylée chez *E. coli* et donc elle peut s'attacher à la colonne streptavidine utilisée pour la purification par affinité (191). En effet, nous avons détecté la présence des protéines autres que TraC après la purification. L'analyse par spectrométrie de masse a révélé la présence de la protéine OmpA dans l'échantillon de TraC membranaire purifiée, et la protéine LPP (major outer lipoprotein) après la purification de TraC sécrétée. L'interaction entre TraC et OmpA ou LPP est probablement non spécifique ou pas stable, vu que l'analyse du produit de la purification par affinité a été analysé par chromatographie d'exclusion et les résultats ont montré la présence de TraC monomérique.

La voie de translocation de TraC du périplasma vers la membrane extérieure n'est pas encore bien définie, mais une étude récente suggère un rôle des protéines Bam (β -barrel assembly machinery) dans ce transport (167). Il est possible que TraC se localise à proximité de OmpA dans la membrane extérieure, ou bien que les deux protéines entrent en contact transitoire lors de leur translocation vers la surface. La protéine TraN du plasmide F est exposée à la surface cellulaire, et elle se lie à OmpA de la cellule receveuse pour stabiliser le contact entre les deux cellules durant la conjugaison (192). Il n'existe pas un homologue de TraN dans le plasmide pKM101 mais Il sera intéressant d'étudier une possible interaction de TraC avec OmpA.

LPP est la protéine la plus abondante et elle se trouve dans le périplasme et à la surface cellulaire (193). Il était intéressant de trouver que LPP est co-purifiée avec TraC sécrétée, et pas avec TraC membranaire ou bien périplasmique. Actuellement nous n'avons pas une explication pour ces résultats, et il est nécessaire de confirmer davantage si LPP interagit avec TraC durant sa sécrétion dans le milieu extracellulaire. Le profil d'élution de TraC (périplasmique, membranaire et sécrétée) ne change pas en présence ou bien absence des autres sous unités du T4SS, exprimées à partir du plasmide pKM101. Cela peut indiquer que les interactions entre TraC et OmpA ou bien LPP sont reliées au mécanisme de translocation et de sécrétion de TraC.

Dans une étude antérieure, la structure de TraC a été résolue par cristallographie. Les résultats ont indiqué que TraC périplasmique est un monomère (165). Nous avons utilisé le SEC-MALS et le « crosslinking » pour étudier TraC purifiée à partir des trois différentes localisations cellulaires forme des multimers. Les profils d'élution des trois formes de TraC par la chromatographie d'exclusion de tailles (SEC), ont été identiques et ils indiquent un poids moléculaire proche de celui d'un monomère de TraC. Plusieurs concentrations de TraC (jusqu'à 10 mg/ml) ont été utilisés pour les analyses par SEC, à fin d'étudier l'effet de la concentration sur l'état de TraC en solution, mais nous n'avons pas détecté une différence dans le profil d'élution. Pour calculer la taille exacte de TraC périplasmique, nous avons utilisé le SEC-MALS, et les résultats ont confirmé l'état monomérique et monodisperse de TraC. Nous avons donc conclu que TraC membranaire et TraC sécrétée sont des monomères aussi. Cependant, en présence d'un agent de réticulation (DSS ou glutaraldehyde), TraC purifiée forme des complexes de poids moléculaires qui correspondent à des dimères et des multimères de TraC, visualisés par immunobuvardage. Des complexes de tailles similaires ont été détectés après une expérience de réticulation *in vivo* avec des cellules surexprimant TraC. La formation de ces complexes peut être expliquée par l'existence des interaction transitoires non spécifiques entre les monomères de TraC.

Le rôle de la sécrétion de TraC à l'extérieure de la cellule n'est pas encore définie, et TraC est la seule protéine à être sécrétée parmi la famille des VirB5. En plus, le phénotype des cellules qui

expriment le plasmide pKM101 Δ *traC*, durant la conjugaison, peut être partiellement restauré en présence des cellules portant un plasmide pKM101 non transmissible (166, 168). Le mécanisme de ce phénomène, appelé « extra-complémentation », n'est pas encore connu. Nous avons étudié l'effet de TraC purifiée sur le taux de transfert de l'ADN durant la conjugaison sur des souches exprimant pKM101 ou bien pKM101 Δ *traC*. Nos résultats ont montré que l'ajout de TraC purifiée favorise le transfert de l'ADN pour la souche pKM101 Δ *traC*, détecté par une augmentation de 200 fois du taux de transfert, ce qui suggère un rôle de TraC secrétée durant la conjugaison. Nous avons également montré que TraC purifiée s'attache aux cellules receveuses, utilisées pour réaliser les tests de la conjugaison. Nous n'avons pas encore caractérisé les détails de cette interaction, et il sera intéressant d'identifier les cibles de TraC sur la surface de la cellule receveuse, ce qui pourra contribuer à confirmer le rôle d'adhésine de TraC extracellulaire. En effet, plusieurs études antérieures proposent des protéines VirB5 comme des adhésines durant la conjugaison et l'infection des cellules hôtes (121, 167, 170, 194, 195). Nos résultats suggèrent donc un rôle de TraC extracellulaire durant la conjugaison, probablement en favorisant le contact entre les cellules par l'intermédiaire des interactions spécifiques, ou bien non spécifiques, avec les cellules receveuses.

Nous avons également détecté TraC dans des vésicules membranaires purifiées à partir de surnageant d'une culture des cellules portant pKM101. Les vésicules membranaires existent dans presque toutes les bactéries à Gram-négatif, et jouent un rôle important dans de nombreuses fonctions bactériennes, notamment la communication cellulaire, la formation de biofilms et la pathogénicité (196). La présence de TraC dans les vésicules membranaires suggère un rôle de ces vésicules dans le phénomène de l'extra-complémentation, et ouvre la possibilité d'un partage des composants des T4SSs entre les bactéries voisines pour augmenter la possibilité du transfert des matériels génétiques bénéfiques pour la survie des bactéries sous certaines conditions. Des analyses protéomiques sur les vésicules membranaires seront nécessaires afin de savoir si d'autres composants du T4SS sont présents. Il est aussi important d'étudier l'effet des vésicules membranaires sur la conjugaison et l'infection par les bactériophages.

TraC est le composant mineur du pilus et elle est supposée de localiser sur le bout du pilus, comme son homologue VirB5 chez *A. tumefaciens* (121). Le pilus conjugatif du T4SS représente le site de reconnaissance et d'adhésion pour des phages spécifiques avant l'infection de la cellule, et donc TraC peut faire partie du site d'interaction avec les phages (165, 166, 168). Nous avons étudié l'effet de TraC purifiée sur le taux d'infection des cellules par les phages Ike et PRDI. Nos résultats n'ont pas montré un effet de TraC sur le taux d'infection pour les souches exprimant pKM101 ou bien pKM101 Δ traC. Ces résultats n'écartent pas la possibilité d'une interaction entre TraC et les phages. En effet, nous avons détecté la formation d'un complexe de haut poids moléculaire entre TraC et PRDI en présence de l'agent de réticulation, le DSS. La présence d'une autre protéine en proximité de TraC, ou bien un changement de conformation de TraC sur le pilus, peuvent être nécessaire pour compléter l'interaction entre TraC et les phages.

La voie de translocation et de sécrétion de TraC est indépendante du T4SS (166, 168). Pour étudier l'effet de la présence du T4SS sur la localisation cellulaire de TraC, nous avons utilisé la microscopie à fluorescence à haute résolution. En appliquant deux approches différentes, l'immunodétection et la fusion de TraC à la protéine fluorescente mCherry, TraC a été localisée sur les pôles et/ou sur le périmètre de la cellule. Une étape de perméabilisation des cellules était nécessaire pour l'immunodétection de TraC suggérant qu'elle n'est pas exposée à la surface de la cellule. Dans une étude récente, TraC a été localisée sur la surface cellulaire seulement, par la même approche d'immunodétection, mais sans la perméabilisation des cellules (167). L'absence d'une accumulation polaire de TraC dans cette étude peut donc indiquer que TraC sur les pôles se localise dans la membrane interne ou bien dans le périplasme, inaccessible à la détection sans perméabiliser la cellule. Chez *A. tumefaciens*, la localisation polaire de VirB5 nécessite la présence de deux protéines du T4SS : VirB8 et VirB9 (122). Nos résultats ont montré que la localisation cellulaire de TraC ne change pas en présence du T4SS, ni en présence des cellules receveuses dans le milieu de culture. Dans une étude antérieure, le complexe VirB₃₋₁₀ provenant du plasmide R388, a été purifié et sa structure résolue à basse résolution (18Å et 23Å) (53). L'étude suggère que l'homologue de VirB5 se localise dans l'IMC en 12 copies. L'absence d'un effet de la présence du T4SS sur la localisation de TraC, observé dans nos expériences, est probablement dû à la limitation

de la résolution par l'approche microscopique utilisée (~150 nm), où il est difficile de distinguer un assemblage de TraC dans un complexe, d'une accumulation polaire sous une forme d'une réserve de TraC. Une approche alternative sera d'utiliser la microscopie électronique pour visualiser l'immunodétection de TraC par des billes d'or sur des coupes fines des cellules.

L'accumulation de TraC sur les pôles peut représenter le site de nucléation du pilus à la suite d'un signal inconnu, comme chez *A. tumefaciens*, où le pilus du T4SS a été montré de se former sur les pôles de la cellule. Il sera important d'étudier le mécanisme qui contrôle la voie de TraC après son passage vers le périplasma, et de savoir si la translocation de TraC vers la membrane externe ou bien son accumulation sur les pôles de la cellule, sont indépendantes ou bien régulées par des signaux spécifiques.

Conclusion

Le but général de cette thèse était d'étudier la structure du pilus des T4SSs à haute résolution, afin d'avoir plus de détails sur la composition et les interactions moléculaires essentielles à la formation de ces structures extracellulaires. Les pili jouent un rôle important durant le transfert des substrats par le T4SS vers les cellules cibles. Cependant, il n'est pas encore connu si les substrats passent à travers le pilus avant d'être injectés dans la cellule receveuse. Les données structurales sur les pili peuvent donc révéler des indices directs qui contribuent à répondre à cette question. Nous avons montré que les pili -T et -N sont composés d'assemblage du complexe piline-phospholipide, comme le pilus F, ce qui confirme la présence des phospholipides à travers les pilis des T4SSs. La spécificité et l'importance des phospholipides pour la formation et le fonctionnement des pili restent inconnues. Nos résultats ont montré aussi la conservation de la présence d'un acide aminé chargé positivement à l'intérieur du pilus, et la contribution des phospholipides sur la charge globale du lumen du pilus.

Nous avons étudié aussi un homologue de VirB5 provenant du plasmide pKM101, la protéine TraC, qui représente le composant mineur du pilus et elle entre dans la composition du complexe de la membrane interne (IMC) du T4SS. TraC est essentielle pour l'assemblage du pilus et pour le fonctionnement du T4SS durant la conjugaison qui favorise la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques. Ainsi, TraC représente un cible potentiel pour le développement des inhibiteurs pour la conjugaison, afin de limiter la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques. Nous espérons que les résultats présentés dans cette thèse, contribueront à l'amélioration des connaissances sur l'assemblage et le fonctionnement des T4SSs, et aideront à élucider le mécanisme du transfert des substrats vers la cellule cible.

Bibliographie

1. Miethke M, Pieroni M, Weber T, Bronstrup M, Hammann P, Halby L, et al. Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. *Nature Reviews Chemistry*. 2021;5(10):726-49.
2. O'Neill J. Tackling Drug-resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. 2016.
3. Coates ARM, Halls G, Hu Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? *British Journal of Pharmacology*. 2011;163(1):184-94.
4. Jian Z, Zeng L, Xu T, Sun S, Yan S, Yang L, et al. Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control. *Journal of basic microbiology*. 2021.
5. Garau G, Di Guilmi AM, Hall BG. Structure-based phylogeny of the metallo-beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(7):2778-84.
6. Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*. 2016;387(10014):176-87.
7. Cooper MA, Shlaes D. Fix the antibiotics pipeline. *Nature*. 2011;472(7341):32-.
8. Laxminarayan R, Matsoso P, Pant S, Brower C, Rottingen J-A, Klugman K, et al. Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *Lancet*. 2016;387(10014):168-75.
9. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022;399(10325):629-55.
10. Cassini A, Hogberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infectious Diseases*. 2019;19(1):56-66.
11. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 2018;31(4).
12. Botelho J, Schulenburg H. The Role of Integrative and Conjugative Elements in Antibiotic Resistance Evolution. *Trends Microbiol*. 2021;29(1):8-18.
13. Alharthi S, Alavi SE, Moyle PM, Ziora ZM. Sortase A (SrtA) inhibitors as an alternative treatment for superbug infections. *Drug Discovery Today*. 2021;26(9):2164-72.
14. Boudaher E, Shaffer CL. Inhibiting bacterial secretion systems in the fight against antibiotic resistance. *MedChemComm*. 2019;10(5):682-92.
15. Costa TRD, Harb L, Khara P, Zeng LY, Hu B, Christie PJ. Type IV secretion systems: Advances in structure, function, and activation. *Mol Microbiol*. 2021;115(3):436-52.
16. Costa TRD, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M, et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(6):343-59.
17. Gerlach RG, Hensel M. Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 2007;297(6):401-15.
18. Christie PJ. The Mosaic Type IV Secretion Systems. *EcoSal Plus*. 2016;7(1).
19. Galan JE, Waksman G. Protein-Injection Machines in Bacteria. *Cell*. 2018;172(6):1306-18.

20. Kubori T, Nagai H. The Type IVB secretion system: an enigmatic chimera. *Curr Opin Microbiol.* 2016;29:22-9.
21. Asrat S, Davis KM, Isberg RR. Modulation of the host innate immune and inflammatory response by translocated bacterial proteins. *Cell Microbiol.* 2015;17(6):785-95.
22. Locht C, Coutte L, Mielcarek N. The ins and outs of pertussis toxin. *Febs Journal.* 2011;278(23):4668-82.
23. Stingl K, Muller S, Scheidgen-Kleyboldt G, Clausen M, Maier B. Composite system mediates two-step DNA uptake into *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(3):1184-9.
24. Tzfira T, Citovsky V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology.* 2006;17(2):147-54.
25. Frick-Cheng AE, Pyburn TM, Voss BJ, McDonald WH, Ohi MD, Cover TL. Molecular and Structural Analysis of the *Helicobacter pylori* cag Type IV Secretion System Core Complex. *mBio.* 2016;7(1):10.
26. Nagai H, Kubori T. Type IVB secretion systems of *Legionella* and other Gram-negative bacteria. *Front Microbiol.* 2011;2.
27. Qiu JZ, Luo ZQ. *Legionella* and *Coxiella* effectors: strength in diversity and activity. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(10):591-605.
28. Sgro GG, Oka GU, Souza DP, Cenens W, Bayer-Santos E, Matsuyama BY, et al. Bacteria-Killing Type IV Secretion Systems. *Front Microbiol.* 2019;10:20.
29. Jaboulay C, Godeux A, Doublet P, Vianney A. Regulatory Networks of the T4SS Control: From Host Cell Sensing to the Biogenesis and the Activity during the Infection. *J Mol Biol.* 2021;433(9).
30. Lederberg J, Tatum EL. GENE RECOMBINATION IN *ESCHERICHIA-COLI*. *Nature.* 1946;158(4016):558-.
31. Cascales E, Christie PJ. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol.* 2003;1(2):137-49.
32. Guglielmini J, de la Cruz F, Rocha EPC. Evolution of Conjugation and Type IV Secretion Systems. *Molecular Biology and Evolution.* 2013;30(2):315-31.
33. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(9):722-32.
34. Cabezon E, Ripoll-Rozada J, Pena A, de la Cruz F, Arechaga I. Towards an integrated model of bacterial conjugation. *Fems Microbiol Rev.* 2015;39(1):81-95.
35. Darbari VC, Waksman G. Structural Biology of Bacterial Type IV Secretion Systems. *Annual Review of Biochemistry, Vol 84.* 2015;84:603-29.
36. Grohmann E, Christie PJ, Waksman G, Backert S. Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* 2018;107(4):455-71.
37. Aguilar J, Zupan J, Cameron TA, Zambryski PC. *Agrobacterium* type IV secretion system and its substrates form helical arrays around the circumference of virulence-induced cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(8):3758-63.
38. Hamilton HL, Dominguez NM, Schwartz KJ, Hackett KT, Dillard JP. *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Mol Microbiol.* 2005;55(6):1704-21.

39. Hofreuter D, Odenbreit S, Henke G, Haas R. Natural competence for DNA transformation in *Helicobacter pylori*: identification and genetic characterization of the *comB* locus. *Mol Microbiol.* 1998;28(5):1027-38.
40. Cenens W, Andrade MO, Llontop E, Alvarez-Martinez CE, Sgro GG, Farah CS. Bactericidal type IV secretion system homeostasis in *Xanthomonas citri*. *PLoS Pathog.* 2020;16(5).
41. Bayer-Santos E, Cenens W, Matsuyama BY, Oka GU, Di Sessa G, Mininel ID, et al. The opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* utilizes a type IV secretion system for interbacterial killing. *PLoS Pathog.* 2019;15(9).
42. Klein TA, Ahmad S, Whitney JC. Contact-Dependent Interbacterial Antagonism Mediated by Protein Secretion Machines. *Trends Microbiol.* 2020;28(5):387-400.
43. Novick RP. PLASMID INCOMPATIBILITY. *Microbiological Reviews.* 1987;51(4):381-95.
44. Helmuth R, Achtman M. CELL-CELL INTERACTIONS IN CONJUGATING *ESCHERICHIA-COLI* - PURIFICATION OF F-PILI WITH BIOLOGICAL-ACTIVITY. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75(3):1237-41.
45. Beaver JW, Burrus V, Hochhut B, Waldor MK. Comparison of SXT and R391, two conjugative integrating elements: definition of a genetic backbone for the mobilization of resistance determinants. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2002;59(12):2065-70.
46. Lawley TD, Klimke WA, Gubbins MJ, Frost LS. F factor conjugation is a true type IV secretion system. *Fems Microbiology Letters.* 2003;224(1):1-15.
47. Wang YA, Yu X, Silverman PM, Harris RL, Egelman EH. The Structure of F-Pili. *J Mol Biol.* 2009;385(1):22-9.
48. Clarke M, Maddera L, Harris RL, Silverman PM. F-pili dynamics by live-cell imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(46):17978-81.
49. Komano T, Yoshida T, Narahara K, Furuya N. The transfer region of *Incl1* plasmid R64: similarities between R64 *tra* and *Legionella icm/dot* genes. *Mol Microbiol.* 2000;35(6):1348-59.
50. Darbari VC, Waksman G. Structural Biology of Bacterial Type IV Secretion Systems. In: Kornberg RD, editor. *Annual Review of Biochemistry, Vol 84. Annual Review of Biochemistry.* 842015. p. 603-29.
51. Christie PJ. Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research.* 2004;1694(1-3):219-34.
52. Christie PJ, Whitaker N, Gonzalez-Rivera C. Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research.* 2014;1843(8):1578-91.
53. Low HH, Gubellini F, Rivera-Calzada A, Braun N, Connery S, Dujeancourt A, et al. Structure of a type IV secretion system. *Nature.* 2014;508(7497):550-+.
54. Zupan J, Hackworth CA, Aguilar J, Ward D, Zambryski P. *VirB1** promotes T-Pilus formation in the vir-type IV secretion system of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.* 2007;189(18):6551-63.
55. Christie PJ, Atmakuri K, Krishnamoorthy V, Jakubowski S, Cascales E. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol.* 2005;59:451-85.
56. Shirasu K, Koukolikovanicola Z, Hohn B, Kado CI. 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. *Mol Microbiol.* 1994;11(3):581-8.

57. Dang TAT, Christie PJ. The VirB4 ATPase of *Agrobacterium tumefaciens* is a cytoplasmic membrane protein exposed at the periplasmic surface. *J Bacteriol.* 1997;179(2):453-62.

58. Arechaga I, Pena A, Zunzunegui S, Fernandez-Alonso MD, Rivas G, de la Cruz F. ATPase activity and oligomeric state of TrwK, the VirB4 homologue of the plasmid R388 type IV secretion system. *J Bacteriol.* 2008;190(15):5472-9.

59. Fronzes R, Christie PJ, Waksman G. The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(10):703-14.

60. Dang TA, Zhou XR, Graf B, Christie PJ. Dimerization of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB4 ATPase and the effect of ATP-binding cassette mutations on the assembly and function of the T-DNA transporter. *Mol Microbiol.* 1999;32(6):1239-53.

61. Durand E, Oomen C, Waksman G. Biochemical Dissection of the ATPase TraB, the VirB4 Homologue of the *Escherichia coli* pKM101 Conjugation Machinery. *J Bacteriol.* 2010;192(9):2315-23.

62. Khara P, Song L, Christie PJ, Hu B. In Situ Visualization of the pKM101-Encoded Type IV Secretion System Reveals a Highly Symmetric ATPase Energy Center. *mBio.* 2021;12(5):e0246521-e.

63. Hu B, Khara P, Christie PJ. Structural bases for F plasmid conjugation and F pilus biogenesis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(28):14222-7.

64. Alvarez-Rodriguez I, Arana L, Ugarte-Urbe B, Gomez-Rubio E, Martin-Santamaria S, Garbisu C, et al. Type IV Coupling Proteins as Potential Targets to Control the Dissemination of Antibiotic Resistance. *Front Mol Biosci.* 2020;7:19.

65. Planet PJ, Kachlany SC, DeSalle R, Figurski DH. Phylogeny of genes for secretion NTPases: Identification of the widespread tadA subfamily and development of a diagnostic key for gene classification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(5):2503-8.

66. Rashkova S, Spudich GM, Christie PJ. Characterization of membrane and protein interaction determinants of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB11 ATPase. *J Bacteriol.* 1997;179(3):583-91.

67. Yeo HJ, Savvides SN, Herr AB, Lanka E, Waksman G. Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Mol Cell.* 2000;6(6):1461-72.

68. Savvides SN, Yeo HJ, Beck MR, Blaesing F, Lurz R, Lanka E, et al. VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies: new insights into bacterial type IV secretion. *Embo Journal.* 2003;22(9):1969-80.

69. Bhatti M, Gomez JAL, Christie PJ. The expanding bacterial type IV secretion lexicon. *Res Microbiol.* 2013;164(6):620-39.

70. Cabezon E, Sastre JI, delaCruz F. Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation. *Molecular & General Genetics.* 1997;254(4):400-6.

71. Alvarez-Martinez CE, Christie PJ. Biological Diversity of Prokaryotic Type IV Secretion Systems. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009;73(4):775-808.

72. Hormaeche I, Iloro I, Arrondo JLR, Goni FM, de la Cruz F, Alkorta I. Role of the transmembrane domain in the stability of TrwB, an integral protein involved in bacterial conjugation. *J Biol Chem.* 2004;279(12):10955-61.

73. Atmakuri K, Cascales E, Christie PJ. Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Mol Microbiol.* 2004;54(5):1199-211.
74. Llosa M, Zunzunegui S, de la Cruz F. Conjugative coupling proteins interact with cognate and heterologous VirB10-like proteins while exhibiting specificity for cognate relaxosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(18):10465-70.
75. Gomis-Ruth FX, Coll M. Structure of TrwB, a gatekeeper in bacterial conjugation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33(9):839-43.
76. Lai EM, Chesnokova O, Banta LM, Kado CI. Genetic and environmental factors affecting T-Pilin export and T-Pilus biogenesis in relation to flagellation of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.* 2000;182(13):3705-16.
77. Redzej A, Ukleja M, Connery S, Trokter M, Felisberto-Rodrigues C, Cryar A, et al. Structure of a VirD4 coupling protein bound to a VirB type IV secretion machinery. *Embo Journal.* 2017;36(20):3080-95.
78. Matilla I, Alfonso C, Rivas G, Bolt EL, de la Cruz F, Cabezon E. The Conjugative DNA Translocase TrwB Is a Structure-specific DNA-binding Protein. *J Biol Chem.* 2010;285(23):17537-44.
79. Jakubowski SJ, Kerr JE, Garza I, Krishnamoorthy V, Bayliss R, Waksman G, et al. *Agrobacterium* VirB10 domain requirements for type IV secretion and T pilus biogenesis. *Mol Microbiol.* 2009;71(3):779-94.
80. Rivera-Calzada A, Fronzes R, Savva CG, Chandran V, Lian PW, Laeremans T, et al. Structure of a bacterial type IV secretion core complex at subnanometre resolution. *Embo Journal.* 2013;32(8):1195-204.
81. Hapfelmeier S, Domke N, Zambryski PC, Baron C. VirB6 is required for stabilization of VirB5 and VirB3 and formation of VirB7 homodimers in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.* 2000;182(16):4505-11.
82. Mossey P, Hudacek A, Das A. *Agrobacterium tumefaciens* Type IV Secretion Protein VirB3 Is an Inner Membrane Protein and Requires VirB4, VirB7, and VirB8 for Stabilization. *J Bacteriol.* 2010;192(11):2830-8.
83. Shamaei-Tousi A, Cahill R, Frankel G. Interaction between protein subunits of the type IV secretion system of *Bartonella henselae*. *J Bacteriol.* 2004;186(14):4796-801.
84. Giraldo AMV, Sivanesan D, Carle A, Paschos A, Smith MA, Plesa M, et al. Type IV Secretion System Core Component VirB8 from *Brucella* Binds to the Globular Domain of VirB5 and to a Periplasmic Domain of VirB6. *Biochemistry.* 2012;51(18):3881-90.
85. Mary C, Fouillen A, Bessette B, Nanci A, Baron C. Interaction via the N terminus of the type IV secretion system (T4SS) protein VirB6 with VirB10 is required for VirB2 and VirB5 incorporation into T-pili and for T4SS function. *J Biol Chem.* 2018;293(35):13415-26.
86. Giraldo AMV, Mary C, Sivanesan D, Baron C. VirB6 and VirB10 from the *Brucella* type IV secretion system interact via the N-terminal periplasmic domain of VirB6. *Febs Letters.* 2015;589(15):1883-9.
87. Jakubowski SJ, Krishnamoorthy V, Cascales E, Christie PJ. *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 domains direct the ordered export of a DNA substrate through a type IV secretion system. *J Mol Biol.* 2004;341(4):961-77.

88. Jakubowski SJ, Krishnamoorthy V, Christie PJ. Agrobacterium tumefaciens VirB6 protein participates in formation of VirB7 and VirB9 complexes required for type IV secretion. *J Bacteriol.* 2003;185(9):2867-78.
89. Kumpar RB, Das A. Functional analysis of the Agrobacterium tumefaciens T-DNA transport pore protein VirB8. *J Bacteriol.* 2001;183(12):3636-41.
90. Das A, Xie YH. Construction of transposon Tn3phoA: its application in defining the membrane topology of the Agrobacterium tumefaciens DNA transfer proteins. *Mol Microbiol.* 1998;27(2):405-14.
91. Kumar RB, Xie YH, Das A. Subcellular localization of the Agrobacterium tumefaciens T-DNA transport pore proteins: VirB8 is essential for the assembly of the transport pore. *Mol Microbiol.* 2000;36(3):608-17.
92. Krall L, Wiedemann U, Unsin G, Weiss S, Domke N, Baron C. Detergent extraction identifies different VirB protein subassemblies of the type IV secretion machinery in the membranes of Agrobacterium tumefaciens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(17):11405-10.
93. Yuan Q, Carle A, Gao C, Sivanesan D, Aly KA, Hoppner C, et al. Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *J Biol Chem.* 2005;280(28):26349-59.
94. Ward DV, Draper O, Zupan JR, Zambryski PC. Peptide linkage mapping of the Agrobacterium tumefaciens vir-encoded type IV secretion system reveals protein subassemblies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(17):11493-500.
95. Das A, Xie YH. The Agrobacterium T-DNA transport pore proteins VirB8, VirB9, and VirB10 interact with one another. *J Bacteriol.* 2000;182(3):758-63.
96. Hoppner C, Carle A, Sivanesan D, Hoepfner S, Baron C. The putative lytic transglycosylase VirB1 from Brucella suis interacts with the type IV secretion system core components VirB8, ViB9 and VirB11. *Microbiology-Sgm.* 2005;151:3469-82.
97. Terradot L, Bayliss R, Oomen C, Leonard GA, Baron C, Waksman G. Structures of two core subunits of the bacterial type IV secretion system,, VirB8 from Brucella suis and ComB10 from Helicobacter pylori. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(12):4596-601.
98. Bailey S, Ward D, Middleton R, Grossmann JG, Zambryski PC. Agrobacterium tumefaciens VirB8 structure reveals potential protein-protein interaction sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(8):2582-7.
99. Porter CJ, Bantwal R, Bannam TL, Rosado CJ, Pearce MC, Adams V, et al. The conjugation protein TcpC from Clostridium perfringens is structurally related to the type IV secretion system protein VirB8 from Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol.* 2012;83(2):275-88.
100. Goessweiner-Mohr N, Grumet L, Arends K, Pavkov-Keller T, Gruber CC, Gruber K, et al. The 2.5 angstrom Structure of the Enterococcus Conjugation Protein TraM resembles VirB8 Type IV Secretion Proteins. *J Biol Chem.* 2013;288(3):2018-28.
101. Kuroda T, Kubori T, Bui XT, Hyakutake A, Uchida Y, Imada K, et al. Molecular and structural analysis of Legionella DotI gives insights into an inner membrane complex essential for type IV secretion. *Sci Rep.* 2015;5.
102. Paschos A, den Hartigh A, Smith MA, Atluri VL, Sivanesan D, Tsolis RM, et al. An In Vivo High-Throughput Screening Approach Targeting the Type IV Secretion System Component VirB8 Identified Inhibitors of Brucella abortus 2308 Proliferation. *Infect Immun.* 2011;79(3):1033-43.

103. Casu B, Smart J, Hancock MA, Smith M, Sygusch J, Baron C. Structural Analysis and Inhibition of TraE from the pKM101 Type IV Secretion System. *J Biol Chem*. 2016;291(45):23817-29.
104. Casu B, Arya T, Bessette B, Baron C. Fragment-based screening identifies novel targets for inhibitors of conjugative transfer of antimicrobial resistance by plasmid pKM101. *Sci Rep*. 2017;7:7.
105. Casu B, Mary C, Sverzhinsky A, Fouillen A, Nanci A, Baron C. VirB8 homolog TraE from plasmid pKM101 forms a hexameric ring structure and interacts with the VirB6 homolog TraD. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(23):5950-5.
106. Chandran V, Fronzes R, Duquerroy S, Cronin N, Navaza J, Waksman G. Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature*. 2009;462(7276):1011-U66.
107. Fronzes R, Schafer E, Wang LC, Saibil HR, Orlova EV, Waksman G. Structure of a Type IV Secretion System Core Complex. *Science*. 2009;323(5911):266-8.
108. Sgro GG, Costa TRD, Cenens W, Souza DP, Cassago A, de Oliveira LC, et al. Cryo-EM structure of the bacteria-killing type IV secretion system core complex from *Xanthomonas citri*. *Nat Microbiol*. 2018;3(12):1429-40.
109. Fernandez D, Dang TAT, Spudich GM, Zhou XR, Berger BR, Christie PJ. The *Agrobacterium tumefaciens* virB7 gene product, a proposed component of the T-complex transport apparatus, is a membrane-associated lipoprotein exposed at the periplasmic surface. *J Bacteriol*. 1996;178(11):3156-67.
110. Fernandez D, Spudich GM, Zhou XR, Christie PJ. The *Agrobacterium tumefaciens* virB7 lipoprotein is required for stabilization of virB proteins during assembly of the T-complex transport apparatus. *J Bacteriol*. 1996;178(11):3168-76.
111. Baron C, Thorstenson YR, Zambryski PC. The lipoprotein VirB7 interacts with VirB9 in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*. 1997;179(4):1211-8.
112. Spudich GM, Fernandez D, Zhou XR, Christie PJ. Intermolecular disulfide bonds stabilize VirB7 homodimers and VirB7/VirB9 heterodimers during biogenesis of the *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(15):7512-7.
113. Sagulenko V, Sagulenko E, Jakubowski S, Spudich E, Christie PJ. VirB7 lipoprotein is exocellular and associates with the *Agrobacterium tumefaciens* T pilus. *J Bacteriol*. 2001;183(12):3642-51.
114. Jakubowski SJ, Cascales E, Krishnamoorthy V, Christie PJ. *Agrobacterium tumefaciens* VirB9, an outer-membrane-associated component of a type IV secretion system, regulates substrate selection and T-pilus biogenesis. *J Bacteriol*. 2005;187(10):3486-95.
115. Beaupre CE, Bohne J, Dale EM, Binns AN. Interactions between VirB9 and VirB10 membrane proteins involved in movement of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. *J Bacteriol*. 1997;179(1):78-89.
116. Guglielmini J, Neron B, Abby SS, Pilar Garcillan-Barcia M, de la Cruz F, Rocha EPC. Key components of the eight classes of type IV secretion systems involved in bacterial conjugation or protein secretion. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(9):5715-27.
117. Cascales E, Christie PJ. *Agrobacterium* VirB10, an ATP energy sensor required for type IV secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(49):17228-33.

118. Baron C, Llosa M, Zhou S, Zambryski PC. VirB1, a component of the T-complex transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*, is processed to a C-terminal secreted product, VirB1. *J Bacteriol.* 1997;179(4):1203-10.
119. Zahrl D, Wagner M, Bischof K, Bayer M, Zavec B, Beranek A, et al. Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology-Sgm.* 2005;151:3455-67.
120. Llosa M, Zupan J, Baron C, Zambryski P. The N- and C-terminal portions of the *Agrobacterium* VirB1 protein independently enhance tumorigenesis. *J Bacteriol.* 2000;182(12):3437-45.
121. Aly KA, Baron C. The VirB5 protein localizes to the T-pilus tips in *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiology-Sgm.* 2007;153:3766-75.
122. Judd PK, Kumar RB, Das A. Spatial location and requirements for the assembly of the *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(32):11498-503.
123. Wallden K, Williams R, Yan J, Lian PW, Wang LC, Thalassinou K, et al. Structure of the VirB4 ATPase, alone and bound to the core complex of a type IV secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(28):11348-53.
124. Kerr JE, Christie PJ. Evidence for VirB4-Mediated Dislocation of Membrane-Integrated VirB2 Pilin during Biogenesis of the *Agrobacterium* VirB/VirD4 Type IV Secretion System. *J Bacteriol.* 2010;192(19):4923-34.
125. Arutyunov D, Frost LS. F conjugation: Back to the beginning. *Plasmid.* 2013;70(1):18-32.
126. Babic A, Lindner AB, Vulic M, Stewart EJ, Radman M. Direct visualization of horizontal gene transfer. *Science.* 2008;319(5869):1533-6.
127. Sagulenko E, Sagulenko V, Chen J, Christie PJ. Role of *Agrobacterium* VirB11 ATPase in T-pilus assembly and substrate selection. *J Bacteriol.* 2001;183(20):5813-25.
128. Hu B, Khara P, Song LQ, Lin AS, Frick-Cheng AE, Harvey ML, et al. In Situ Molecular Architecture of the *Helicobacter pylori* Cag Type IV Secretion System. *mBio.* 2019;10(3):15.
129. Oikonomou CM, Jensen GJ. Electron Cryotomography of Bacterial Secretion Systems. *Microbiology Spectrum.* 2019;7(2).
130. Ripoll-Rozada J, Zunzunegui S, de la Cruz F, Arechaga I, Cabezon E. Functional Interactions of VirB11 Traffic ATPases with VirB4 and VirD4 Molecular Motors in Type IV Secretion Systems. *J Bacteriol.* 2013;195(18):4195-201.
131. Ilangovan A, Kay CWM, Roier S, El Mkami H, Salvadori E, Zechner EL, et al. Cryo-EM Structure of a Relaxase Reveals the Molecular Basis of DNA Unwinding during Bacterial Conjugation. *Cell.* 2017;169(4):708-21.
132. Matson SW, Ragonese H. The F-plasmid TraI protein contains three functional domains required for conjugative DNA strand transfer. *J Bacteriol.* 2005;187(2):697-706.
133. Cascales E, Christie PJ. Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science.* 2004;304(5674):1170-3.
134. Shu AC, Wu CC, Chen YY, Peng HL, Chang HY, Yew TR. Evidence of DNA transfer through F-pilus channels during *Escherichia coli* conjugation. *Langmuir.* 2008;24(13):6796-802.
135. Costa TRD, Ilangovan A, Ukleja M, Redzej A, Santini JM, Smith TK, et al. Structure of the Bacterial Sex F Pilus Reveals an Assembly of a Stoichiometric Protein-Phospholipid Complex. *Cell.* 2016;166(6):1436-+.

136. Trokter M, Waksman G. Translocation through the Conjugative Type IV Secretion System Requires Unfolding of Its Protein Substrate. *J Bacteriol.* 2018;200(6).
137. Vergunst AC, Schrammeijer B, den Dulk-Ras A, de Vlaam CMT, Regensburg-Tuink TJG, Hooykaas PJJ. VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science.* 2000;290(5493):979-82.
138. Nagai H, Cambronne ED, Kagan JC, Amor JC, Kahn RA, Roy CR. A C-terminal translocation signal required for Dot/Icm-dependent delivery of the *Legionella* RalF protein to host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(3):826-31.
139. Burstein D, Zusman T, Degtyar E, Viner R, Segal G, Pupko T. Genome-Scale Identification of *Legionella pneumophila* Effectors Using a Machine Learning Approach. *PLoS Pathog.* 2009;5(7):12.
140. Kubori T, Hyakutake A, Nagai H. *Legionella* translocates an E3 ubiquitin ligase that has multiple U-boxes with distinct functions. *Mol Microbiol.* 2008;67(6):1307-19.
141. Giselda Del Giudice M, Hans Dohmer P, Manuel Spera J, Tomas Laporte F, Ines Marchesini M, Czibener C, et al. VirJ Is a *Brucella* Virulence Factor Involved in the Secretion of Type IV Secreted Substrates. *J Biol Chem.* 2016;291(23):12383-93.
142. Marchesini MI, Morrone Seijo SM, Guaimas FF, Comerci DJ. A T4SS Effector Targets Host Cell Alpha-Enolase Contributing to *Brucella abortus* Intracellular Lifestyle. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6.
143. Harrington LC, Rogerson AC. THE F-PILUS OF *ESCHERICHIA-COLI* APPEARS TO SUPPORT STABLE DNA TRANSFER IN THE ABSENCE OF WALL-TO-WALL CONTACT BETWEEN CELLS. *J Bacteriol.* 1990;172(12):7263-4.
144. Silverman PM, Clarke MB. New insights into F-pilus structure, dynamics, and function. *Integrative Biology.* 2010;2(1):25-31.
145. Bradley DE. MORPHOLOGICAL AND SEROLOGICAL RELATIONSHIPS OF CONJUGATIVE PILI. *Plasmid.* 1980;4(2):155-69.
146. Bradley DE, Taylor DE, Cohen DR. SPECIFICATION OF SURFACE MATING SYSTEMS AMONG CONJUGATIVE DRUG-RESISTANCE PLASMIDS IN *ESCHERICHIA-COLI-K-12*. *J Bacteriol.* 1980;143(3):1466-70.
147. Paranchych W, Frost LS. THE PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF PILI. *AdvMicrobPhysiol.* 1988;29:53-114.
148. Manchak J, Anthony KG, Frost LS. Mutational analysis of F-pilin reveals domains for pilus assembly, phage infection and DNA transfer. *Mol Microbiol.* 2002;43(1):195-205.
149. Schmidt-Eisenlohr H, Domke N, Angerer C, Wanner G, Zambryski PC, Baron C. Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.* 1999;181(24):7485-92.
150. Cellini C, Kalogeraki VS, Winans SC. The hydrophobic TraM protein of pKM101 is required for conjugal transfer and sensitivity to donor-specific bacteriophage. *Plasmid.* 1997;37(3):181-8.
151. Majdalani N, Moore D, Maneewannakul S, Ippenlher K. Role of the propilin leader peptide in the maturation of F pilin. *J Bacteriol.* 1996;178(13):3748-54.
152. Majdalani N, Ippenlher K. Membrane insertion of the F-pilin subunit is Sec independent but requires leader peptidase B and the proton motive force. *J Bacteriol.* 1996;178(13):3742-7.

153. Zechner EL, Lang S, Schildbach JF. Assembly and mechanisms of bacterial type IV secretion machines. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*. 2012;367(1592):1073-87.
154. Maneewannakul K, Maneewannakul S, Ippenihler K. CHARACTERIZATION OF TRAX, THE F-PLASMID LOCUS REQUIRED FOR ACETYLATION OF F-PILIN SUBUNITS. *J Bacteriol*. 1995;177(11):2957-64.
155. Eisenbrandt R, Kalkum M, Lai EM, Lurz R, Kado CI, Lanka E. Conjugative pili of IncP plasmids, and the Ti plasmid T pilus are composed of cyclic subunits. *J Biol Chem*. 1999;274(32):22548-55.
156. Lai EM, Eisenbrandt R, Kalkum M, Lanka E, Kado CI. Biogenesis of T pili in *Agrobacterium tumefaciens* requires precise VirB2 propilin cleavage and cyclization. *J Bacteriol*. 2002;184(1):327-30.
157. Kalkum M, Eisenbrandt R, Lanka E. Protein circlets as sex pilus subunits. *Current Protein & Peptide Science*. 2004;5(5):417-24.
158. Hospenthal MK, Costa TRD, Waksman G. A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(6):365-79.
159. Amin H, Ilangovan A, Costa TRD. Architecture of the outer-membrane core complex from a conjugative type IV secretion system. *Nat Commun*. 2021;12(1):6834-.
160. Brinton CC. NON-FLAGELLAR APPENDAGES OF BACTERIA. *Nature*. 1959;183(4664):782-6.
161. Bradley DE. MORPHOLOGY OF PILI DETERMINED BY THE N-INCOMPATIBILITY GROUP PLASMID N3 AND INTERACTION WITH BACTERIOPHAGE-PR4 AND BACTERIOPHAGE-IKE. *Plasmid*. 1979;2(4):632-6.
162. Zheng WL, Pena A, Low WW, Wong JLC, Frankel G, Egelman EH. Cryoelectron-Microscopic Structure of the pKpQIL Conjugative Pili from Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Structure*. 2020;28(12):1321-+.
163. Harb L, Chamakura K, Khara P, Christie PJ, Young R, Zeng LY. ssRNA phage penetration triggers detachment of the F-pilus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(41):25751-8.
164. Meng R, Jiang MQ, Cui ZC, Chang EY, Yang KL, Jakana J, et al. Structural basis for the adsorption of a single-stranded RNA bacteriophage. *Nat Commun*. 2019;10:8.
165. Yeo HJ, Yuan Q, Beck MR, Baron C, Waksman G. Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM101. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(26):15947-52.
166. Schmidt-Eisenlohr H, Domke N, Baron C. TraC of IncN plasmid pKM101 associates with membranes and extracellular high-molecular-weight structures in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1999;181(18):5563-71.
167. Gonzalez-Rivera C, Khara P, Awad D, Patel R, Li YG, Bogisch M, et al. Two pKM101-encoded proteins, the pilus-tip protein TraC and Pep, assemble on the *Escherichia coli* cell surface as adhesins required for efficient conjugative DNA transfer. *Mol Microbiol*. 2019;111(1):96-117.
168. Winans SC, Walker GC. CONJUGAL TRANSFER SYSTEM OF THE INCN PLASMID PKM101. *J Bacteriol*. 1985;161(1):402-10.
169. Cao PB, Wall D. Self-identity reprogrammed by a single residue switch in a cell surface receptor of a social bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(14):3732-7.
170. Kwok T, Zabler D, Urman S, Rohde M, Hartig R, Wessler S, et al. *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature*. 2007;449(7164):862-U4.

171. Bragagnolo N, Rodriguez C, Samari-Kermani N, Fours A, Korouzhdehi M, Lysenko R, et al. Protein Dynamics in F-like Bacterial Conjugation. *Biomedicines*. 2020;8(9).
172. Gordon JE, Christie PJ. The Agrobacterium Ti Plasmids. *Microbiology Spectrum*. 2014;2(6).
173. Hawes MC, Smith LY. REQUIREMENT FOR CHEMOTAXIS IN PATHOGENICITY OF AGROBACTERIUM-TUMEFACIENS ON ROOTS OF SOIL-GROWN PEA-PLANTS. *J Bacteriol*. 1989;171(10):5668-71.
174. Zhu J, Oger PM, Schrammeijer B, Hooykaas PJJ, Farrand SK, Winans SC. The bases of crown gall tumorigenesis. *J Bacteriol*. 2000;182(14):3885-95.
175. Yuan ZC, Liu P, Saenkham P, Kerr K, Nester EW. Transcriptome profiling and functional analysis of *Agrobacterium tumefaciens* reveals a general conserved response to acidic conditions (pH 5.5) and a complex acid-mediated signaling involved in *Agrobacterium*-plant interactions. *J Bacteriol*. 2008;190(2):494-507.
176. Stachel SE, Zambryski PC. VIR A AND VIR G CONTROL THE PLANT-INDUCED ACTIVATION OF THE T-DNA TRANSFER PROCESS OF A-TUMEFACIENS. *Cell*. 1986;46(3):325-33.
177. Lee YW, Jin SG, Sim WS, Nester EW. Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(26):12245-9.
178. Peng WT, Lee YW, Nester EW. The phenolic recognition profiles of the *Agrobacterium tumefaciens* VirA protein are broadened by a high level of the sugar binding protein ChvE. *J Bacteriol*. 1998;180(21):5632-8.
179. Gao R, Lynn DG. Environmental pH sensing: Resolving the VirA/VirG two-component system inputs for *Agrobacterium* pathogenesis. *J Bacteriol*. 2005;187(6):2182-9.
180. Jin SG, Roitsch T, Christie PJ, Nester EW. THE REGULATORY VIRG PROTEIN SPECIFICALLY BINDS TO A CIS-ACTING REGULATORY SEQUENCE INVOLVED IN TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION OF AGROBACTERIUM-TUMEFACIENS VIRULENCE GENES. *J Bacteriol*. 1990;172(2):531-7.
181. Pazour GJ, Das A. CHARACTERIZATION OF THE VIRG BINDING-SITE OF AGROBACTERIUM-TUMEFACIENS. *Nucleic Acids Research*. 1990;18(23):6909-13.
182. Gelvin SB. *Agrobacterium Biology From Basic Science to Biotechnology Preface*. *Agrobacterium Biology: from Basic Science to Biotechnology*. 2018;418:V-VII.
183. Kunik T, Tzfira T, Kapulnik Y, Gafni Y, Dingwall C, Citovsky V. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(4):1871-6.
184. Mary C, Baron C. Molecular basis of plant infection with *Agrobacterium tumefaciens* via a type IV secretion system. *Biochemistry and Cell Biology*. 2019;97(3):215-23.
185. Oyedemi BOM, Shinde V, Shinde K, Kakalou D, Stapleton PD, Gibbons S. Novel R-plasmid conjugal transfer inhibitory and antibacterial activities of phenolic compounds from *Mallotus philippensis* (Lam.) Mull. Arg. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2016;5:15-21.
186. Lakshmi VV, Padma S, Polasa H. ELIMINATION OF MULTIDRUG-RESISTANT PLASMID IN BACTERIA BY PLUMBAGIN, A COMPOUND DERIVED FROM A PLANT. *Current Microbiology*. 1987;16(3):159-61.
187. Arya T, Oudouhou F, Casu B, Bessette B, Sygusch J, Baron C. Fragment-based screening identifies inhibitors of ATPase activity and of hexamer formation of Cag alpha from the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Sci Rep*. 2019;9:10.

188. Lin A, Jimenez J, Derr J, Vera P, Manapat ML, Esvelt KM, et al. Inhibition of Bacterial Conjugation by Phage M13 and Its Protein g3p: Quantitative Analysis and Model. *Plos One*. 2011;6(5).
189. Shaffer CL, Good JAD, Kumar S, Krishnan KS, Gaddy JA, Loh JT, et al. Peptidomimetic Small Molecules Disrupt Type IV Secretion System Activity in Diverse Bacterial Pathogens. *mBio*. 2016;7(2):10.
190. Aktas M, Danne L, Moller P, Narberhaus F. Membrane lipids in *Agrobacterium tumefaciens*: biosynthetic pathways and importance for pathogenesis. *Frontiers in Plant Science*. 2014;5.
191. Wang WWS, Das D, Suresh MR. Biotin carboxyl carrier protein co-purifies as a contaminant in core-streptavidin preparations. *Molecular Biotechnology*. 2005;31(1):29-40.
192. Klimke WA, Rypien CD, Klinger B, Kennedy RA, Rodriguez-Maillard JM, Frost LS. The mating pair stabilization protein, TraN, of the F plasmid is an outer-membrane protein with two regions that are important for its function in conjugation. *Microbiology-Sgm*. 2005;151:3527-40.
193. Cowles CE, Li Y, Semmelhack MF, Cristea IM, Silhavy TJ. The free and bound forms of Lpp occupy distinct subcellular locations in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2011;79(5):1168-81.
194. Backert S, Fronzes R, Waksman G. VirB2 and VirB5 proteins: specialized adhesins in bacterial type-IV secretion systems? *Trends Microbiol*. 2008;16(9):409-13.
195. Barden S, Niemann HH. Adhesion of Several Cell Lines to *Helicobacter pylori* CagL Is Mediated by Integrin alpha V beta 6 via an RGD LXXL Motif. *J Mol Biol*. 2015;427(6):1304-15.
196. Huang W, Meng L, Chen Y, Dong Z, Peng Q. Bacterial outer membrane vesicles as potential biological nanomaterials for antibacterial therapy. *Acta biomaterialia*. 2021.