



HAL
open science

Rôle et mode d'action des pilines mineures des pili de type IV de *Neisseria meningitidis*

Anne-Flore Imhaus

► **To cite this version:**

Anne-Flore Imhaus. Rôle et mode d'action des pilines mineures des pili de type IV de *Neisseria meningitidis*. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05T019 . tel-01249528

HAL Id: tel-01249528

<https://theses.hal.science/tel-01249528>

Submitted on 4 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

THÈSE

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR de l'Université Paris Descartes

Biologie moléculaire et cellulaire

Spécialité : Infectiologie

Réalisée dans le laboratoire : PARCC - INSERM U970

Présentée par

Anne-Flore IMHAUS

**Rôle et mode d'action des pilines mineures des pili de
type IV de *Neisseria meningitidis***

Dirigée par

Guillaume DUMÉNIL

Soutenue publiquement le Vendredi 27 septembre 2013, devant le jury composé de :

Pr. Claire POYART	Présidente
Dr. Olivera FRANCTIC	Rapporteur
Dr. Eric CASCALES	Rapporteur
Dr. Hélène BIERNE	Examineur
Dr. Rémi FRONZES	Examineur
Dr. Guillaume DUMENIL	Directeur de thèse

Table des matières

INTRODUCTION.....	7
I. Les infections à <i>Neisseria meningitidis</i> : rôle des PT4	9
1. Portage asymptomatique	9
2. Franchissement de l'épithélium	9
3. Infections systémiques et méningées	10
b) Sepsis.....	10
c) Méningites.....	11
d) Mise en évidence des facteurs bactériens par l'analyse clinique.....	11
4. Apport des modèles in vivo dans la compréhension du processus infectieux.....	11
II. Les fimbriae dans le monde bactérien.....	13
1. Pili dépendant de la sortase chez les bactéries à Gram positif.....	13
2. Pili de la voie « Chaperone Usher » chez les bactéries à Gram négatif	14
3. Pili de la voie « Extracellular nucleation precipitation » ou Curli.....	15
4. Les pili de type IV.....	15
a) Les pili de types IV <i>stricto sensu</i>	15
b) Systèmes composés de pilines similaires aux pilines de classe IV	16
III. Fonctions et structure des PT4	18
1. Fonctions des PT4 et rôle dans la pathogénèse.....	18
a) Motilité.....	18
b) Compétence pour la transformation.....	19
c) Adhésion aux cellules de l'hôte	20
d) Agrégation bactérienne	21
e) Réponse cellulaire.....	23
2. Structure des Pili de type IV	25
a) Caractéristiques de séquence de la piline	25
b) Caractéristiques morphologiques et structurales de la piline.....	26
c) Structure du filament et implications	27
IV. Biosynthèse de pili de type IV.....	31
1. Assemblage des pili de type IV.....	31
2. Rôle des composants de la machinerie des pili de type IV.....	32
a) La piline PilE.....	32
b) La prépiline peptidase	34
c) La sécrétine PilQ et son partenaire PilW	35
d) La plateforme d'assemblage dans la membrane interne.....	37
e) Les protéines PilC.....	37
f) Les protéines liant l'ATP	38
g) PilG et PilZ, rôle dans la transition assemblage/rétraction	41
h) Les autres pilines.....	42
3. L'apport d'un système homologue, le système de sécrétion de type II	43
a) Pseudopilus et sécrétion.....	43
b) Relation fonctionnelle entre PT4 et SST2.....	44
V. Rôles et modes d'action des pilines mineures	47
1. Caractéristiques et rôle des pilines mineures	47
a) Caractéristiques et structure des pilines mineures	47
b) Rôle de la piline mineure Comp.....	48
c) Rôle de la piline mineure PilV.....	48
d) Rôle de la piline mineure PilX.....	48
2. Mode d'action des pilines mineures	49
a) Modèle dominant du mode d'action des pilines mineures	49

b) Limites de ce modèle	50
RESULTATS	54
TRAVAUX EN COURS	87
I. Mode d'action des pilines mineures.....	88
1. PilV et PilX ont des fonctions non redondantes dans la biogenèse des pili.....	88
2. Les pilines mineures ne sont pas nécessaires en absence de rétraction	89
3. Interaction des pilines mineures PilV et PilX avec la machinerie des PT4	89
a) Blocage des pilines mineures dans la membrane interne	90
b) Pontage disulfure entre les pilines mineures et PilE.....	91
4. Rôle de la piline mineure ComP sur la biogenèse des pili.....	92
5. Conclusion.....	94
II. Etude Structure/Fonction des pilines mineures PilX et PilV	95
1. Caractérisation de la complémentation des souches <i>pilX</i> et <i>pilV</i>	95
a) Complémentation d'une souche <i>pilX</i>	96
b) Complémentation d'un mutant <i>pilV</i>	97
2. Détermination des régions spécifiques aux pilines mineures PilV et PilX.....	97
a) L'hélice α transmembranaire peut être substituée entre les pilines	98
b) Détermination du rôle du feuillet β	98
c) La région D n'est pas suffisante pour assurer la fonction des pilines mineures	99
3. Etude du rôle des boucles des pilines mineures	100
a) Etude structure/fonction de PilX.....	101
b) Etude structure/fonction de PilV	103
c) Seuls deux résidus de la région D de PilV sont indispensables à sa fonction	104
d) Rôle de la région D de PilV	105
4. Conclusion.....	106
MATERIELS ET METHODES	108
RESULTATS ANNEXES.....	120
I. Une modification post-traductionnelle de la piline majeure induite au contact des cellules hôtes provoque la dissémination de <i>Neisseria meningitidis</i>	121
II. Imagerie de la dynamique moléculaire de la réponse cellulaire induite par <i>Neisseria meningitidis</i>.....	128
DISCUSSION	166
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	186

Table des figures et tableaux

Figure 1 : Les différentes étapes des infections causées par <i>Neisseria meningitidis</i>	9
Figure 2 : Pili dépendant de la sortase chez les bactéries à Gram positif	13
Figure 3 : Pili de la voie Chaperonne Usher et les pili Curli	14
Figure 4 : Pili de type IV chez les bactéries à Gram négatif et positif	15
Figure 5 : Alignement des séquences des pilines similaires aux pilines de classe IV	16
Figure 6 : Appendices des archaebactéries formés par des pilines similaires aux pilines de type IV.....	17
Figure 7 : Mécanisme de la compétence pour la transformation	20
Figure 8 : Mécanisme de l'agrégation bactérienne	22
Figure 9 : Remodelage de la membrane plasmique et recrutement de composants cellulaires induit par <i>N. meningitidis</i>	23
Figure 10 : Alignement des séquences des pilines de classe IV	25
Figure 11 : Structure tridimensionnelle des pilines de classe IV	26
Figure 12 : Modélisation des filaments des pili GC (à gauche) et TCP (à droite)	28
Figure 13 : Organisation génétique des gènes codant les protéines impliquées dans la biogenèse des PT4 ou leurs fonctions	31
Tableau 1 : Classification des différents gènes impliqués dans la machinerie des pili de type IV	32
Figure 14 : Modèle de biogenèse des pili de type IV de <i>N. meningitidis</i>	33
Figure 15 : Variation antigénique subi par PilE et variation de phase subi par les gènes de glycosylation/phosphorylation de PilE	34
Figure 16 : Structure de la sécrétine PilQ et de son partenaire PilW	35
Figure 17 : Complexe de la plateforme de la membrane interne	37
Figure 18 : Modèle pour la rétraction	39
Figure 19 : Rôle de la protéine PilG dans la coordination entre la plateforme de la membrane interne et les moteurs moléculaires	41
Figure 20 : Pseudopilines et pilines mineures	42
Figure 21 : Expression du pseudopilus du SST2 de structure similaire aux PT4.....	43
Figure 22 : Similarités entre les systèmes de piliation et de sécrétion de type II.....	44
Figure 23 : Structures des pseudopilines du T2SS et rôle des pseudopilines mineures.....	45
Figure 24 : Structures des pilines mineures PilX et ComP	47
Figure 25 : Modèle dominant du mode d'action des pilines mineures.....	49
Figure 26 : Les pilines mineures ont des fonctions non redondantes	88
Figure 27 : Le défaut de piliation des souches <i>pilV</i> , <i>pilX</i> et <i>pilV/pilX</i> est restauré par l'absence de rétraction	89
Figure 28 : Le blocage des pilines mineures PilX et PilV dans la membrane interne affecte drastiquement la piliation	90
Figure 29 : Pontage disulfure entre les pilines mineures et PilE	91

Figure 30 : Rôle de la piline mineure ComP dans la biogenèse des pili.....	93
Figure 31 : Complémentation du mutant <i>pilX</i>	95
Figure 32 : Complémentation du mutant <i>SiaD-Opa⁺pilX</i>	96
Figure 33 : Complémentation du mutant <i>pilV</i>	97
Figure 34 : Caractéristiques des pilines mineures	98
Figure 35 : Etude de la spécificité de la piline mineure PilX	99
Figure 36 : Etude de la spécificité de la piline mineure PilV	100
Figure 37 : Etude du rôle des boucles de la piline mineure PilX (partie 1)	101
Figure 38 : Etude du rôle des boucles de la piline mineure PilX (partie 2)	102
Figure 39 : Etude du rôle des boucles de la piline mineure PilV	103
Figure 40 : Etude de l'effet de mutations ponctuelles dans la région D de PilV	104
Figure 41 : Etude du rôle de la région D de PilV	105
Tableau 2 : Amorces utilisées pour le clonage	117
Tableau 3 : Amorces utilisées pour la mutagenèse de PilV utilisant l'amorce PilV-F	117
Tableau 4 : Amorces utilisées pour la mutagenèse de PilV utilisant l'amorce PilV-R.....	118
Tableau 5 : Amorces utilisées pour la mutagenèse de PilX utilisant l'amorce PilX-F.....	118
Tableau 6 : Amorces utilisées pour la mutagenèse de PilX utilisant l'amorce PilX-R.....	118
Tableau 7 : Amorces utilisées pour la mutagenèse de PilE utilisant l'amorce Pile3-R	119
Tableau 8 : Amorces utilisées pour les constructions des protéines chimères	119
Tableau 9 : Etapes de mutagenèse pour les protéines chimères	119
Figure 42 : Modèle du mode d'action des pilines mineures sur la biogenèse des pili	181

Abréviations

AAA : ATPase associated with various cellular activities

ADN : Acide désoxyribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

BFP : Bundle Forming Pili

CREN : Contact regulatory element of *Neisseria*

CU : Chaperone-Usher

DTT : Dithiothreitol

DUS : DNA uptake sequence

ELISA : Enzyme linked Immunosorbent Assay

EPEC : Enteropathogenic *E. coli*

ETEC : Enterotoxigenic *E. coli*

GSP : General secretion pathway

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

LCR : liquide céphalo-rachidien

MBP : Maltose binding protein

MPT : Modification post-traductionnelle

M β CD : Méthyl- β -cyclodextrine

PG : Phosphoglycérol

PT4 : Pili de type IV

SST2 : Système de sécrétion de type II

TCP : Toxin-Coregulated Pilus

UPEC : Uropathogenic *E. coli*

INTRODUCTION

Neisseria meningitidis ou méningocoque, diplocoque à Gram négatif, fait partie de la famille des *Neisseriaceae*, classe des β -protéobactéries et plus particulièrement au groupe des *Neisseria*. Ce groupe comprend de nombreuses espèces dont la plupart vivent sur les muqueuses des mammifères de manière commensale comme *N. sicca*, *N. flava*, *N. flavescens*, *N. mucosa* et *N. lactamica*. Pourtant il comprend également deux importants pathogènes strictement humains : *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*. Cette dernière colonise, souvent de manière asymptomatique, le tractus génital de la femme alors que chez l'homme elle provoque une infection du tractus urogénital : la blennorragie ou gonorrhée (Broomes, 1975). *Neisseria meningitidis* est une bactérie commensale dont l'unique réservoir connu à ce jour est le nasopharynx humain. Cependant, cette bactérie, strictement humaine, cause des septicémies fulgurantes et des méningites.

Comme de nombreux pathogènes, *N. meningitidis* possède des pili de type IV, longs appendices présents à la surface de la bactérie. Etant exposés à la surface des bactéries et étant un facteur essentiel de virulence, les pili de type IV (PT4) sont des cibles potentielles pour le développement de thérapies innovantes visant à soigner les infections causées par *Neisseria meningitidis* et par d'autres pathogènes. Une des particularités des PT4 de *Neisseria* est la présence de pilines mineures qui assurent les fonctions associées aux PT4 et qui font l'objet de cette thèse.

Nous allons tout d'abord décrire brièvement les infections causées par *Neisseria meningitidis*. Ensuite nous décrivons les différentes fibres bactériennes connues pour jouer des fonctions similaires à celles des pili de type IV malgré leurs évolutions divergentes. Par la suite, nous expliquerons leur rôle dans la pathogenèse et décrivons la structure des PT4. Nous présenterons également les mécanismes de biogenèse des PT4 ainsi que du système de sécrétion de type II, machinerie homologue aux PT4. Finalement, nous détaillerons la contribution des pilines mineures à la machinerie des PT4 dans la modulation de leurs fonctions.

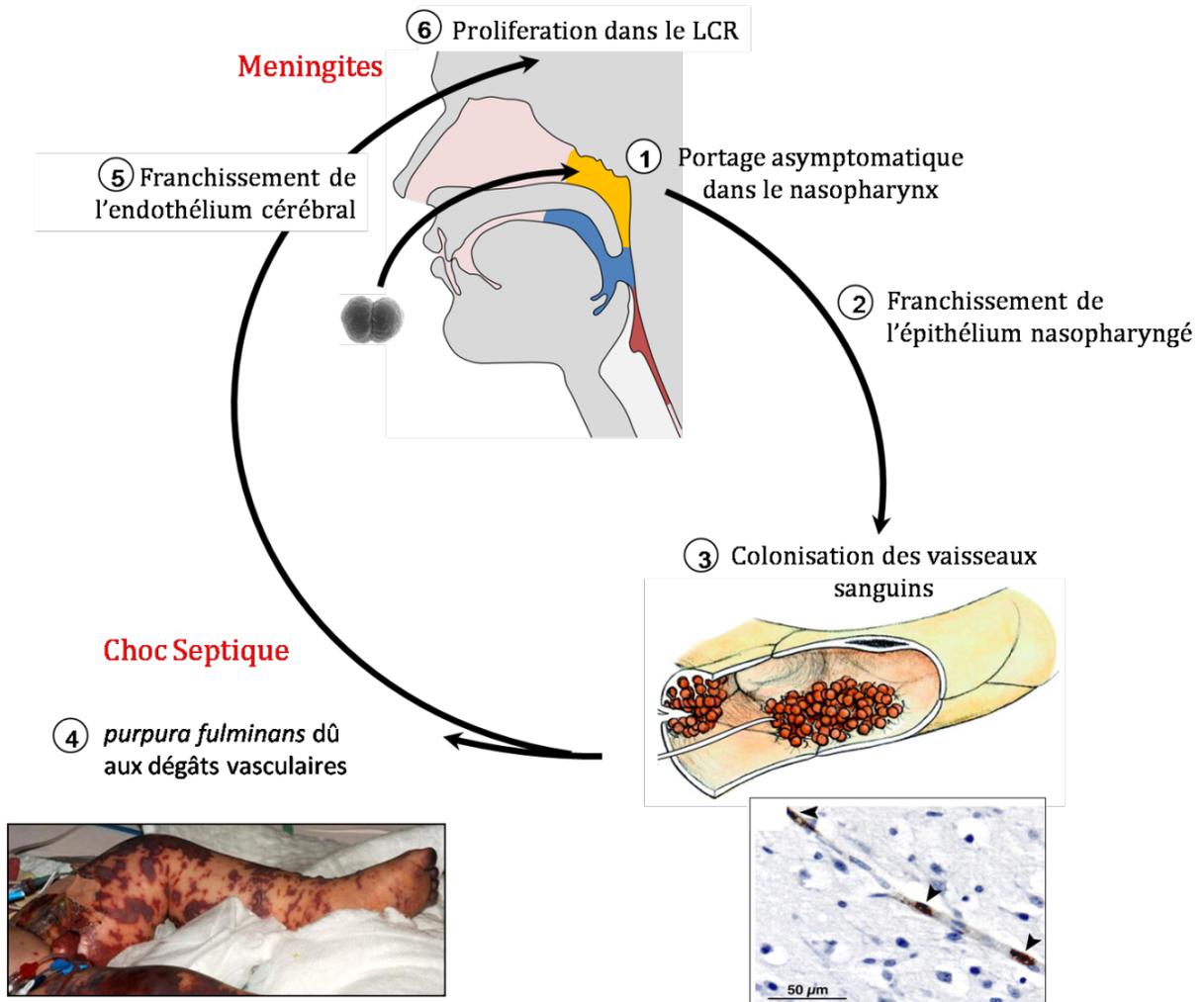


Figure 1 : Les différentes étapes des infections causées par *Neisseria meningitidis*

① Portage asymptomatique du méningocoque dans l'oro-nasopharynx. ② Détachement des bactéries et franchissement de l'épithélium nasopharyngé pour gagner la circulation sanguine. ③ Colonisation de l'endothélium vasculaire responsable soit de septicémies soit des méningites. Agrégats au contact de l'endothélium dans différents tissus dont la peau et le cerveau (Illustration tirée de Melican and Duménil, 2012 et coupe histologique, marquage Gram-Weingert de Mairey et al., 2006). ④ Dégâts vasculaires conduisant au *purpura fulminans*. ⑤ Au niveau du cerveau, franchissement de l'endothélium cérébral pour accéder au LCR. ⑥ Prolifération dans le LCR conduisant aux méningites.

I. Les infections à *Neisseria meningitidis* : rôle des PT4

Les infections par *Neisseria meningitidis* nécessitent plusieurs étapes : (i) une phase de portage asymptomatique du méningocoque dans l'oro-pharynx, (ii) franchissement de la barrière épithéliale, (iii) colonisation de l'endothélium vasculaire qui peut conduire au déclenchement de septicémies et/ou de méningites lorsque les bactéries accèdent au liquide céphalo-rachidien (LCR) (Figure 1).

1. Portage asymptomatique

La muqueuse de l'oro-nasopharynx de l'homme est l'unique réservoir de la bactérie connu à ce jour. La transmission de *N. meningitidis* d'un individu à l'autre est réalisée par transfert de gouttelettes aérosols ou par contact direct (Caugant & Maiden, 2009). Malgré la présence de la capsule polysaccharidique, *N. meningitidis* demeure sensible à la dessiccation. Sa transmission requiert donc un contact suffisamment étroit entre ces personnes (Virji, 2009).

Les études de portage, par prélèvement dans la gorge ou lors d'ablation des amygdales, montrent que *N. meningitidis* est retrouvée dans l'oro-nasopharynx de 5 à 30% de la population, mais peut atteindre 100% en cas d'épidémies (Caugant *et al.*, 1994, Cartwright *et al.*, 1987, Griffiss & Artenstein, 1976, Sim *et al.*, 2000). Le portage de *N. meningitidis* est rare chez les enfants en bas âge, il n'augmente qu'après l'âge de 5 ans avec un taux variant de 24 à 37% chez les 15-24 ans et de moins de 10% au-delà (Cartwright *et al.*, 1987, Caugant *et al.*, 1994, Yazdankhah & Caugant, 2004). Cependant ce portage peut être plus élevé pour les militaires, les étudiants ou les personnes défavorisées, notamment en raison de leur promiscuité (Cardenosa *et al.*, 2001, Davies *et al.*, 1996, Neal *et al.*, 2000, Cartwright *et al.*, 1991b).

2. Franchissement de l'épithélium

Le processus infectieux de *N. meningitidis* est initié lorsque le méningocoque franchit les cellules épithéliales et gagne la circulation sanguine. Malgré un portage important au sein de la population, les maladies invasives à méningocoque restent relativement faibles. En effet, le méningocoque ne déclenche la maladie que dans 1 à 2 cas pour 10⁵ habitants en France et dans les pays industrialisés (Parent du Chatelet *et al.*, 2007). La situation est cependant différente dans les pays d'Afrique sub-saharienne dits de la « ceinture de la méningite » où le

méningocoque est responsable d'épidémies de grande envergure pouvant toucher des milliers de personnes avec une incidence de 10-10 000 pour 10⁵ habitants (Stephens, 2007). Le caractère brutal et parfois épidémique de la maladie ainsi que son évolution fulminante chez certains individus en font un germe particulièrement redouté car malgré une antibiothérapie adaptée, le pronostic reste sévère. Les séquelles neurologiques sont fréquentes et entre 16 à 52% de ces infections restent mortelles (Brandtzaeg & van Deuren, 2012).

Plusieurs facteurs environnementaux impliqués dans le franchissement de la barrière nasopharyngéenne ont pu être déterminés par des études épidémiologiques. Ces études montrent que le passage du méningocoque dans la circulation sanguine dépend de l'altération des muqueuses par l'environnement ou par la co-infection avec d'autres pathogènes permettant un accès direct à travers l'épithélium (Roberts, 2008). Ainsi le contact avec un air sec et poussiéreux augmente le risque de maladie invasive par *N. meningitidis*. Par exemple, le souffle de l'Harmattan en Afrique sub-saharienne, un vent chaud et sec, précède les épidémies de la ceinture de la méningite (Sultan *et al.*, 2005, Yaka *et al.*, 2008). De plus le tabagisme (actif ou passif) est une source irritant les voies respiratoires supérieures associée aux infections de *N. meningitidis* (Murray *et al.*, 2012). De même, la grippe et les syndromes grippaux précèdent l'apparition de cas de maladies méningococciques (Cartwright *et al.*, 1991a, Hubert *et al.*, 1992).

3. Infections systémiques et méningées

Arrivé dans la circulation sanguine, le méningocoque provoque le développement de méningites (37 à 49% de ces infections), de sepsis dont la forme la plus grave est le *purpura fulminans* (10 à 18% des cas) ou de combinaisons des deux (7 à 12% des patients) (Brandtzaeg & van Deuren, 2012).

b) Sepsis

La présence du méningocoque dans le sang déclenche de nombreux symptômes non spécifiques ressemblant à ceux d'une grippe comme la fièvre, des frissons et des douleurs articulaires. Cependant, l'évolution du sepsis vers un choc septique, dont la forme la plus grave est le *purpura fulminans*, peut conduire au décès. L'étude du sérum des patients montre une corrélation entre l'état d'inflammation et la sévérité du sepsis (van Deuren *et al.*, 1995). En effet, la présence de méningocoque dans le sang induit le déclenchement d'une réponse inflammatoire avec des concentrations élevées de cytokines pro-inflammatoires notamment IL-6, IL-8 et TNF α (Girardin *et al.*, 1988, Waage *et al.*, 1989). De plus, les études histologiques *post-mortem* ou

réalisées à partir de biopsies révèlent la présence d'infiltration de monocytes ou de neutrophiles polynucléaires (Harrison *et al.*, 2002, Guarner *et al.*, 2004, Dupin *et al.*, 2012). Des congestions vasculaires ainsi que des thromboses ont été également observées au niveau des lésions purpuriques (Sotto *et al.*, 1976, Harrison *et al.*, 2002). L'ensemble de ces dommages vasculaires est associé avec une perte de l'étanchéité de vaisseaux conduisant à une hypotension et aux hémorragies à l'origine des lésions purpuriques caractéristiques du *purpura fulminans* (Faust *et al.*, 2001, Harrison *et al.*, 2002).

c) Méningites

L'évolution de la maladie vers une méningite se traduit par l'apparition de symptômes comme la raideur de la nuque, des céphalées et des photophobies, qui sont caractéristiques du syndrome méningé. Le diagnostic repose sur la présence du méningocoque dans le liquide céphalo rachidien (LCR) découverte par ponction lombaire. Cependant, les mécanismes par lesquels le méningocoque sort de la circulation sanguine pour rejoindre le LCR restent méconnus.

d) Mise en évidence des facteurs bactériens par l'analyse clinique

Que ce soit dans le cas de septicémies ou de méningites, de nombreuses études histologiques révèlent la présence d'agrégats bactériens en étroite association avec les capillaires dans différents organes incluant la peau, le foie, le rein et le cerveau ce qui suggère que le méningocoque adhère directement aux vaisseaux sanguins (Hill & Kinney, 1947, Pron *et al.*, 1997, Guarner *et al.*, 2004, Mairey *et al.*, 2006, Dupin *et al.*, 2012). Par ailleurs, plusieurs études cliniques montrent que les souches retrouvées dans le sang et le LCR sont capsulées et piliées (DeVoe & Gilchrist, 1975, Stephens *et al.*, 1982). Or la capsule polysaccharide du méningocoque, attribut indispensable à la survie dans le sang, réduit fortement l'accessibilité des protéines membranaires (Hardy *et al.*, 2000, McNeil *et al.*, 1994, Stephens *et al.*, 1993, Virji *et al.*, 1993a). Les pili de type IV seraient alors la structure principale requise pour assurer l'adhésion initiale sur cellules endothéliales et les interactions entre les bactéries dans les agrégats (Nassif *et al.*, 1997).

4. Apport des modèles in vivo dans la compréhension du processus infectieux

Du fait de l'évolution rapide de la pathologie, les études cliniques décrivent uniquement les étapes tardives du processus infectieux et les événements précoces de la maladie restent encore

mal connus. Par ailleurs, l'absence de modèles animaux adéquats, due à la spécificité d'espèce, a ralenti la compréhension de la pathogenèse. Cependant la mise au point récente d'un modèle animal au sein du laboratoire a permis de comprendre ces étapes précoces de l'infection et de mettre en évidence les facteurs bactériens nécessaires.

Ce modèle expérimental animal est basé sur la greffe de peau humaine chez la souris, dans laquelle des vaisseaux dermiques humains sont introduits. Ce modèle permet l'irrigation des capillaires humains où l'infection par le méningocoque est alors permise. Il est en effet observé des agrégats bactériens le long des capillaires humains. Ce modèle reproduit de plus les observations cliniques à savoir la sécrétion de cytokines IL-6 et IL-8, le recrutement de polynucléaires neutrophiles ainsi que la perte d'étanchéité des vaisseaux. En absence de pili, aucun agrégat bactérien n'a pu être retrouvé et les bactéries ne déclenchent pas cette cascade de l'inflammation et les dégâts vasculaires. Cette étude souligne ainsi l'importance de l'adhésion et de la colonisation locale du méningocoque dans le déclenchement des sepsis (Melican & Dumenil, 2013, Melican *et al.*, 2013).

Outre une meilleure compréhension du processus infectieux, cette étude a démontré le rôle des pili de type IV dans la colonisation des vaisseaux et par conséquent leur importance dans le déclenchement de la pathologie. De plus, seuls les PT4 permettent la formation d'agrégats bactériens observés sur les études histologiques (Helaine *et al.*, 2005, Park *et al.*, 2001). Les PT4 sont donc les facteurs de virulence essentiels de la colonisation des vaisseaux par le méningocoque.

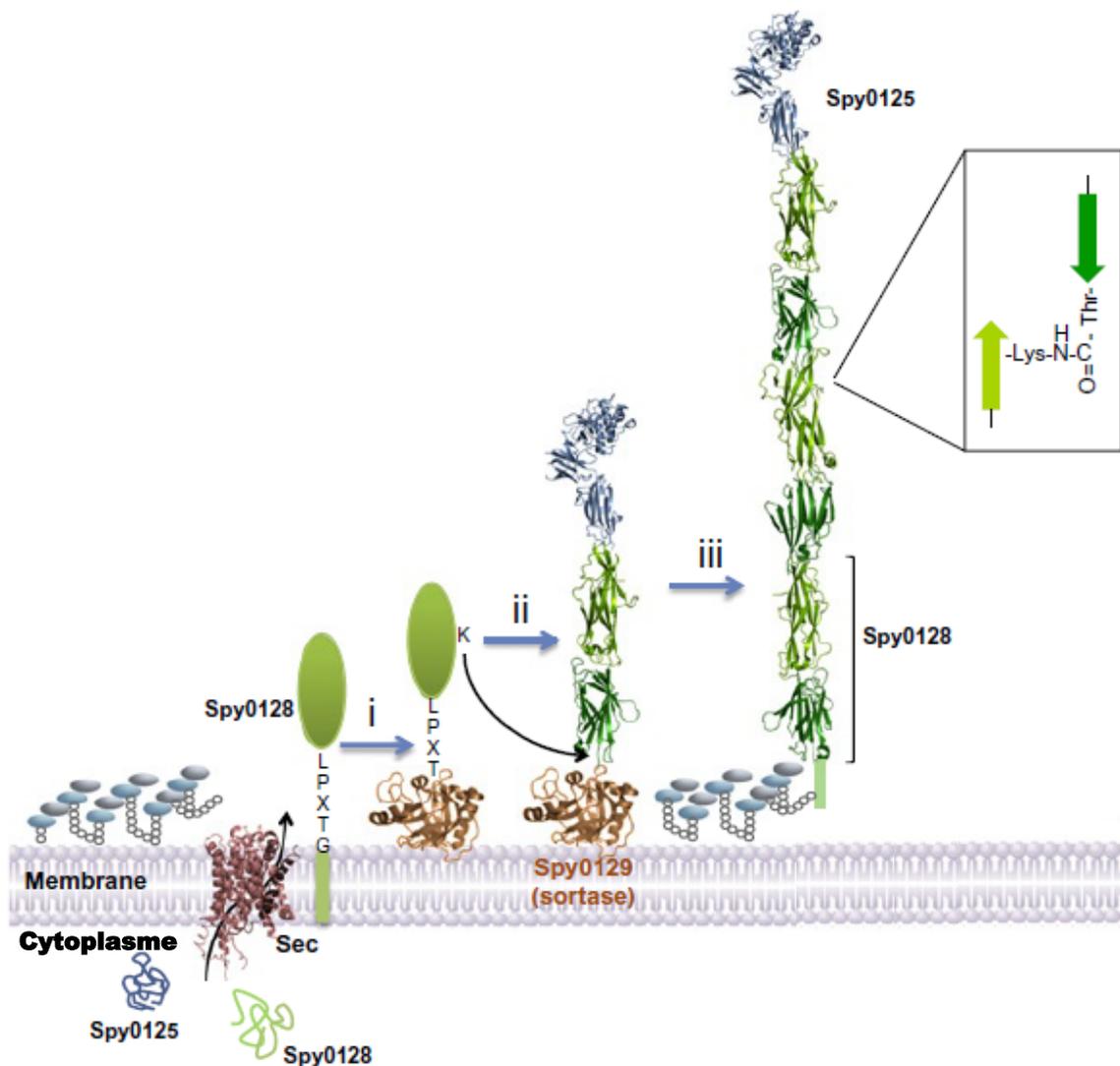


Figure 2 : Pili dépendant de la sortase chez les bactéries à Gram positif

Les pili sont formés par l'assemblage d'une piline majoritaire (Spy0128, en vert) et d'une ou plusieurs pilines accessoires (Spy0125, en bleu). Après sécrétion par la voie Sec, les pilines sont retenues à la membrane par un segment transmembranaire. Elles sont ensuite prises en charges par la sortase (Spy0129, en marron). L'assemblage nécessite la formation d'un intermédiaire réactionnel formé par liaison covalente entre la piline et la sortase. La piline est ensuite intégrée à la base de la fibre par liaison covalente entre une thréonine de la piline n et une lysine de la piline $n+1$ (voir encadrement). La sortase sera libérée lorsque le pilus sera attaché au peptidoglycane (Gerven et al., 2011).

II. Les fimbriae dans le monde bactérien

La capacité des bactéries à interagir avec leur environnement est un élément déterminant pour leur survie et leur virulence. Les facteurs bactériens permettant l'adhésion sont regroupés sous le terme d'adhésines. Il peut s'agir de protéines localisées à la surface des bactéries ou bien dans des structures filamenteuses nommées pili ou fimbriae. L'exposition de filaments est une stratégie qui a été privilégiée par de nombreuses espèces bactériennes commensales et pathogènes. Outre l'adhésion, ces structures permettent aux bactéries la motilité, la formation de biofilms et l'échappement au système immunitaire, ce qui fait de ces pili des puissants facteurs de virulence. Plusieurs pili structurellement différents ont été décrits au cours des cinquante dernières années (Van Gerven *et al.*, 2011, Fronzes *et al.*, 2008, Telford *et al.*, 2006). Bien que ces pili confèrent aux bactéries des propriétés similaires, leur morphologie, la structure des sous-unités ainsi que leur assemblage est totalement différent. Malgré des origines évolutives probablement indépendantes, tous ces types de pili semblent tout de même parfois partager quelques points communs au niveau de leur composition ou de leur mécanisme d'assemblage. Un classement récent regroupe ces différents pili en fonction du mode d'assemblage de la fibre.

1. Pili dépendant de la sortase chez les bactéries à Gram positif

Les « Pili assemblés par la sortase » font référence à l'enzyme nommée sortase responsable de leur assemblage. On retrouve ces pili dans les espèces *Streptococcus* et *Corynebacterium* et ils sont nécessaires pour l'adhésion des bactéries aux cellules hôtes (Telford *et al.*, 2006, Mandlik *et al.*, 2008). Ces pili peuvent former une fibre de plusieurs microns de long pour 5 à 10 nm de diamètre, associée au peptidoglycane.

Ces pili sont obtenus par une polymérisation covalente entre les pilines majeures. Outre la piline majeure, il existe une ou deux pilines accessoires qui ne sont pas indispensables pour la synthèse de ces pili et qui sont présentes à l'extrémité distale et le long de la fibre (Ton-That & Schneewind, 2003). Chez les streptocoques de groupe A (GAS) et *C. diphtheria*, les pilines accessoires permettent de favoriser l'attachement initial des bactéries aux cellules de l'hôte (Telford *et al.*, 2006, Mandlik *et al.*, 2007).

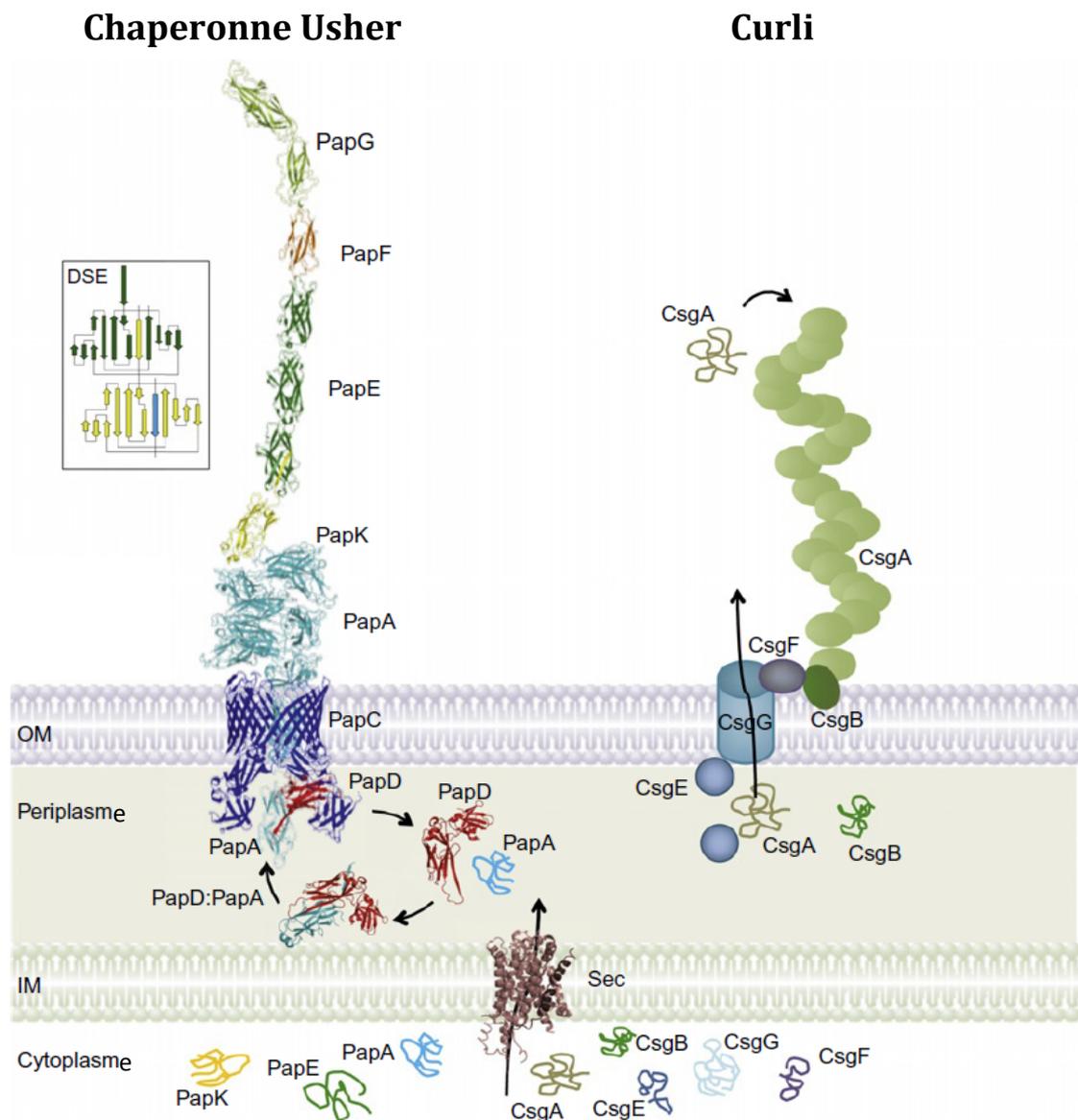


Figure 3 : Pili de la voie Chaperonne Usher et les pili Curli

A gauche: les pili de la voie Chaperonne Usher. Les pili sont initiés par la formation de la fibrille composée des pilines minoritaires (PapG, PapF, PapE, PapK) puis sont étendus en une fibre formée par l'assemblage de la piline PapA. Au niveau du périplasme les pilines sont prises en charges par la chaperonne PapD (en rouge). Leur sortie et leur assemblage sont réalisés par le pore « usher » PapC (en bleu). L'assemblage des pilines est permis par l'interaction d'un brin β de la piline $n+1$ qui s'intercale dans le feuillet β de la piline n (voir encadrement).

A droite: les pili Curli de la voie « Extracellular nucleation precipitation ». La piline majeure CsgA (en vert clair) est sécrétée par le pore CsgG vers le milieu extérieur. Les pilines s'auto-assemblent en fibre à l'extérieur grâce au nucléateur CsgB (en vert foncé). Les protéines CsgE et CsgF sont nécessaires pour la biogenèse des Curli mais leur rôle n'est pas connu (Gerven et al., 2011).

Les sous-unités sont tout d'abord sécrétées par la machinerie Sec et retenues dans la membrane grâce à un domaine hydrophobe. Les pilines sont ensuite clivées par l'enzyme sortase au niveau du motif LPXTG adjacent à leur domaine transmembranaire (Navarre & Schneewind, 1994). A l'issue de ce clivage, un intermédiaire formé par liaison covalente entre la sortase et la piline est ainsi créé. La polymérisation du pilus s'effectue à l'extrémité distale par une attaque nucléophile sur un deuxième motif conservé entre les pilines (Ton-That et al., 2004). Finalement le pilus est chargé sur un pentapeptide de lipide II, précurseur du peptidoglycane, libérant ainsi la sortase et fixant le pilus à la membrane de façon covalente (Ton-That et al., 2004, Navarre & Schneewind, 1994) (Figure 2).

2. Pili de la voie « Chaperone Usher » chez les bactéries à Gram négatif

La voie « chaperone-usher » (CU) est certainement le système d'assemblage le mieux caractérisé puisque de nombreuses études structurales ont été réalisées sur les pili de type I et les pili P de *Escherichia coli* depuis une vingtaine d'année. Ces pili sont retrouvés dans un grand nombre de bactéries comme *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bordetella* et *Actinobacter*. Ce sont des facteurs de virulence particulièrement importants puisqu'ils permettent l'adhésion des souches *E. coli* uropathogènes (UPEC) aux cellules de la vessie (Mulvey *et al.*, 1998, Martinez *et al.*, 2000).

Les pili CU sont formés par polymérisation de la piline majeure (PapA chez *E. coli*) en simple hélice formant une fibre de 7 à 8 nm d'épaisseur et 2µm de long. A l'extrémité distale de ce pilus, on retrouve une coiffe composée d'une ou plusieurs pilines mineures (PapG, PapE, PapF et PapK chez *E. coli*) assemblées en fibrille plus fine (2 à 3 nm d'épaisseur) et plus flexible. L'adhésine PapG est présente en copie unique au sommet des pili P, tandis qu'on retrouve 5 à 10 sous-unités PapE à l'intérieur de cette fibrille. Les protéines ultra-minoritaires PapF et PapK quant à elles, assurent respectivement la jonction fibrille-adhésine et fibre-fibrille.

Le mode d'assemblage des pili CU repose sur l'intervention d'une protéine chaperone périplasmique (PapD pour le pili P d'*E. coli*) qui prend en charge les pilines dès leur arrivée dans le périplasme par la machinerie Sec. Cette interaction permet d'une part de prévenir l'agrégation prématurée entre les pilines et d'autre part de catalyser leur repliement correct et nécessaire à l'assemblage des pili. Ce complexe chaperone/piline est ensuite recruté par la région N-Terminale périplasmique du « usher » tandis que sa région C-Terminale du « usher » qui forme le pore permet non seulement le passage des pilines vers la surface, mais aussi leur assemblage (Knight *et al.*, 2000, Sauer *et al.*, 2004, Waksman & Hultgren, 2009). L'ordre d'assemblage des pilines est défini selon l'affinité entre la chaperonne et les pilines et entre les pilines elles-

Gram négatif

Gram positif

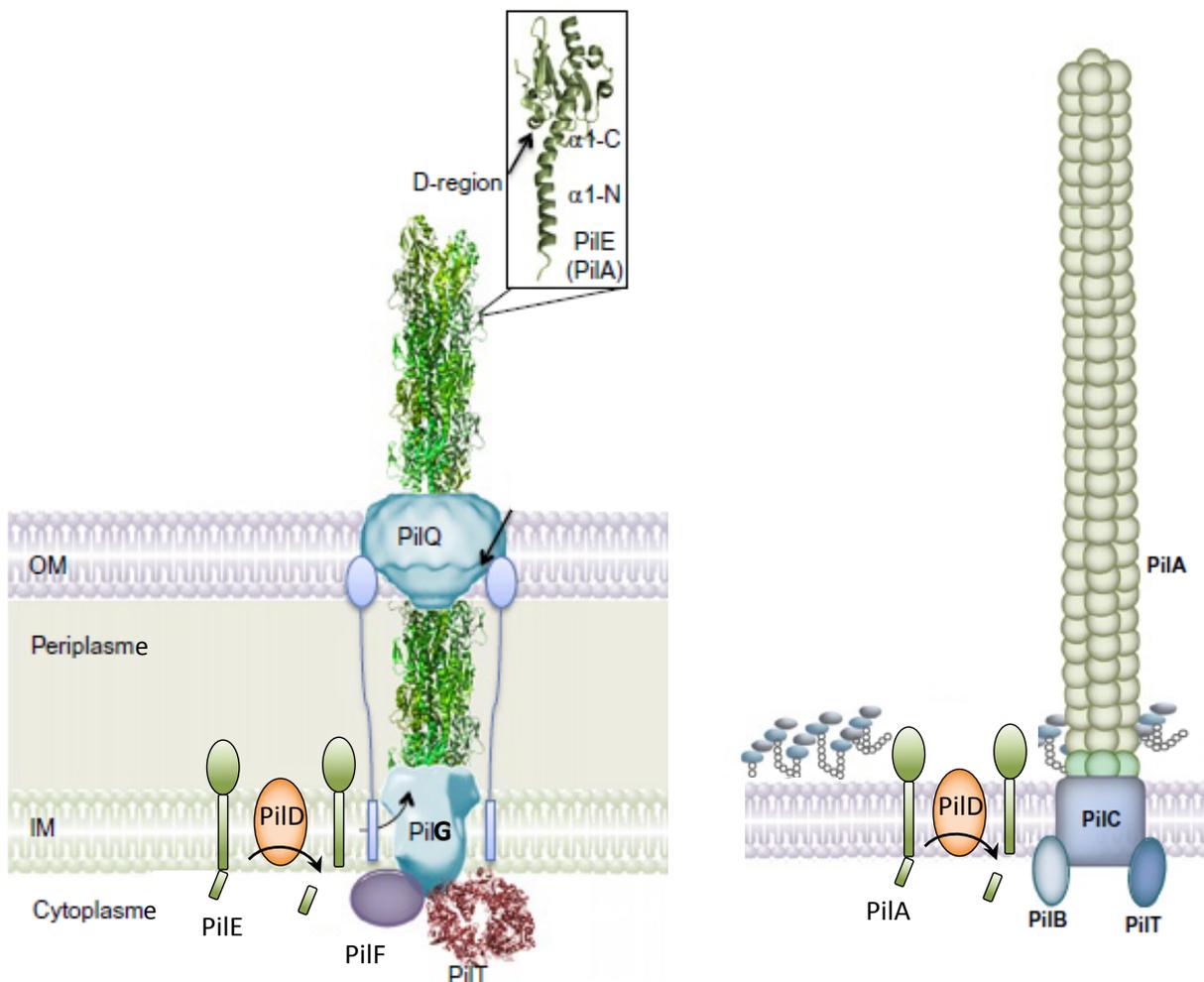


Figure 4 : Pili de type IV chez les bactéries à Gram négatif et positif

A gauche: les PT4 des bactéries à Gram négatif. Les PT4 sont formés par l'assemblage d'une piline majeure PilE (en vert, structure visible dans l'encadrement). Cette piline est d'abord clivée par l'enzyme PilD (en orange), puis ensuite assemblée en une fibre dynamique, qui est allongée par l'ATPase PilF ou rétractée par l'ATPase PilT. La sortie de la fibre est permise par le pore formé d'un multimère PilQ. Un complexe de plusieurs protéines périplasmiques permettent d'aligner les composants de la membrane interne face au pore.

A droite: Les PT4 des bactéries à Gram positif. La machinerie est beaucoup plus simple, car il n'y a qu'une seule membrane à franchir. Les pilines PilA (en vert), préalablement clivées par PilD (en orange), sont assemblées en fibre au niveau de la protéine membranaire PilC (en bleue). L'énergie d'assemblage est fournie par l'ATPase PilB, alors que PilT est nécessaire pour la rétraction. Schéma adapté de (Gerven et al., 2011).

mêmes. La synthèse de ce pilus est initiée avec l'adhésine PapG et est bloquée par la piline mineure « terminateur » PapH qui s'insère au niveau basal (Verger et al., 2006)(Figure 3).

3. Pili de la voie « Extracellular nucleation precipitation » ou Curli

Les pili de la voie, dite « extracellular nucleation-precipitation », sont très différents puisqu'ils sont obtenus après précipitation de la sous-unité constitutive à l'extérieur de la bactérie. Ces pili, nommés aussi Curli, sont retrouvés dans des espèces d'*Escherichia* et de *Salmonella* et ils participent à l'agrégation entre les bactéries, la formation de biofilm et à l'interaction avec les cellules de l'hôte (Epstein & Chapman, 2008).

Les pili Curli sont des fibres de 4 à 7 nm d'épaisseur formées par la précipitation des sous-unités constitutives qui adoptent une structure en feuillets β croisés, c'est-à-dire que les feuillets β sont orientés perpendiculairement à l'axe de la fibre. Outre cet assemblage propre aux fibres amyloïdes, les pili Curli sont extrêmement résistants aux fortes températures et à l'action des protéases (Nelson et al., 2005).

Chez *E. coli*, les sous-unités CsgA et CsgB (100 résidus) sont directement sécrétées dans le milieu extracellulaire par le pore de la membrane externe formé par oligomérisation de CsgG (Robinson et al., 2006). Toutefois, l'assemblage de ces pili n'est pas anarchique. En effet, la piline mineure CsgB à la base de la fibre agit comme un nucléateur qui induit la polymérisation du composant majoritaire de ces pili, CsgA (Hammar *et al.*, 1996, Chapman *et al.*, 2002). L'assemblage de la fibre nécessite deux protéines solubles CsgE et CsgF qui interagissent avec CsgG et qui pourraient alors agir comme des chaperonnes, cependant leur rôle exact n'est pas encore connu (Chapman et al., 2002) (Figure 3).

4. Les pili de type IV

a) Les pili de types IV *stricto sensu*

Les PT4 sont des polymères de 6 à 9 nm d'épaisseur et de plusieurs microns de longueur. Les sous-unités constitutives de ces pili sont nommées pilines de type IV. Leurs propriétés et leur assemblage en triple hélice sont propres aux pili de type IV et seront détaillés dans une prochaine section (Craig et al., 2006). Ces fibres sont probablement les plus répandues parmi les bactéries à Gram négatif, où elles sont retrouvées aussi bien chez des espèces commensales que pathogènes comme les *E. coli* entéropathogènes (EPEC), *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio*

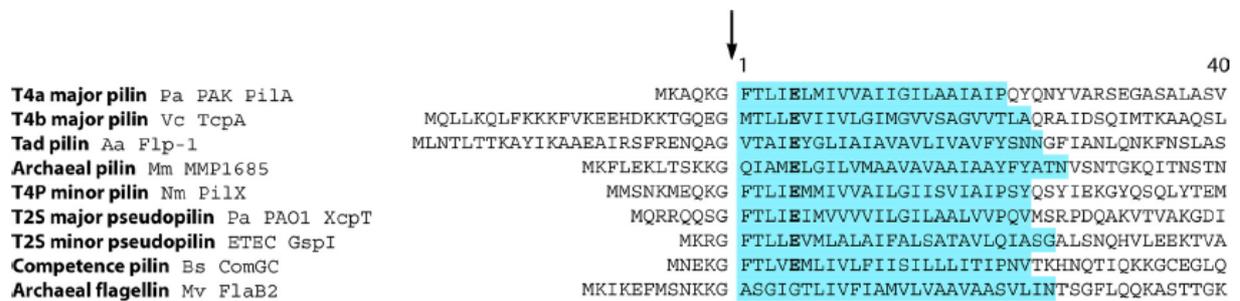


Figure 5 : Alignement des séquences des pilines similaires aux pilines de classe IV

Alignement des séquences des pilines de classe IV et les pilines similaires. La séquence signal et les 40 premiers résidus de la forme mature sont alignés à partir du site de clivage indiqué par une flèche. Elles partagent toutes un peptide signal de classe III qui sera clivé entre le résidu Gly-1 et Phe+1. Les résidus Gly-1 et Glu+5 sont très conservés, néanmoins le premier résidu de la forme mature varie. Le segment transmembranaire, indiqué en bleu, a été prédit par Gebious Pro v5.0.3 (Adapté de Giltner et al., 2012).

Pa, *P. aeruginosa*; Vc, *V. cholerae*; Aa *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Mm, *Methanococcus maripaludis*; Nm, *N. meningitidis*; ETEC, enterotoxigenic *E. coli*; Bs, *Bacillus subtilis*; Mv, *Methanococcus voltae*.

cholerae et les *Neisseria*. On les retrouve également dans d'autres phyla comme les Cyanobactéries (*Nostoc punctiforme* et *Microcystis aeruginosa*), les Thermus/Deinococcus (*Thermus thermophilus* et *Deinococcus geothermalis*) et les Firmicutes (*Clostridium perfringens* et *Ruminococcus albus*), mais cette liste est loin d'être exhaustive (Pelicic, 2008, Mattick, 2002). L'alternance de cycles d'élongation et de rétraction des PT4 est une caractéristique importante de cette classe de pili (Mattick, 2002, Maier *et al.*, 2002) (Figure 4).

b) Systèmes composés de pilines similaires aux pilines de classe IV

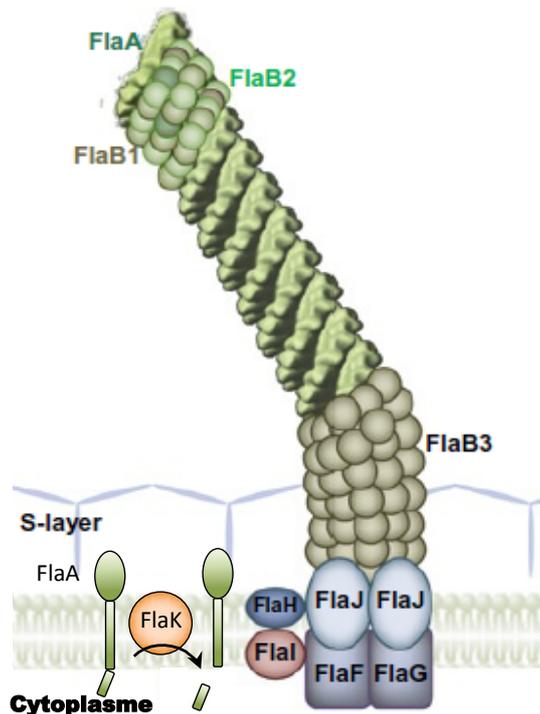
Plusieurs appendices formés par l'assemblage de protéines homologues aux pilines de type IV ont été retrouvés chez les bactéries à Gram positif et chez les archaebactéries (Figure 5). Cependant, ces pili ne présentent pas la même structure que les PT4.

On retrouve par exemple le système de compétence de *Bacillus subtilis*. Ce système requiert la formation d'un pseudopilus formé par l'assemblage de 40 à 100 sous-unités ComGC, similaires aux pilines de type IV (Chung *et al.*, 1998, Chung & Dubnau, 1998). Cependant à la différence des PT4, le maintien du pseudopilus nécessite la formation de ponts disulfures entre les sous-unités (Chen *et al.*, 2006). De plus la rétraction du pseudopilus qui apporte l'ADN aux autres composants de la machinerie situés dans la membrane bactérienne dépend d'une force proton motrice (Maier *et al.*, 2004).

Un autre système proche des PT4 est le flagelle des archaebactéries. Bien que les flagelles des archaebactéries soient fonctionnellement proches des flagelles bactériens, leur structure, leur mode d'assemblage et la machinerie sont homologues au système des PT4 (Ng *et al.*, 2008, Ellen *et al.*, 2010). Cependant, la base des flagelles dépendante de l'assemblage de la flagelline FlaB3 forme un crochet retrouvé également chez les flagelles bactériens (Ellen *et al.*, 2010). Outre la motilité, les flagelles des archaebactéries jouent un rôle dans l'adhérence sur des surfaces abiotiques et l'établissement de contacts dans les biofilms, comme cela a été montré chez *Sulfolobus solfataricus* et *Pyrococcus furiosus* (Albers & Pohlschroder, 2009, Zolghadr *et al.*, 2010) (Figure 6).

Un deuxième appendice retrouvé chez les archaebactéries est similaire aux PT4. Ces pili sont des hétéropolymères composés de l'assemblage de deux sous-unités EpdA et EpdB chez *Methanococcus maripaludis* et de UpsA et UpsB chez *Sulfolobus solfataricus*. Bien que ces sous-unités présentent des similarités avec les pilines de type IV, la structure quaternaire de cette fibre est totalement différente des PT4. En effet, les deux sous-unités sont arrangées en

Flagelles



Pili Ups

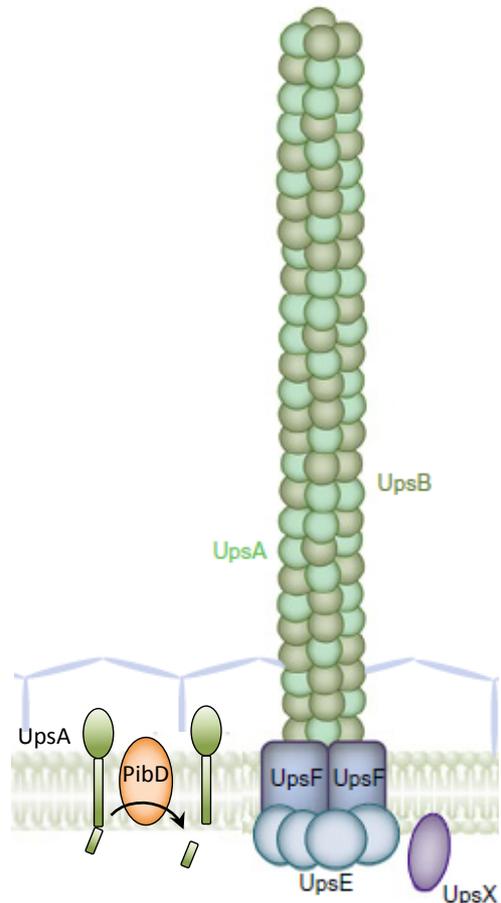


Figure 6 : Appendices des archaebactéries formés par des pilines similaires aux pilines de type IV.

Ces deux systèmes sont composés de sous-unités similaires aux pilines de type IV.

A gauche: les flagelles des archaebactéries sont formés par l'assemblage des flagellines majoritaires FlaB1 et FlaB2. La partie distale est formée par la flagelline mineure FlaA, alors que la partie proximale en forme de crochet est composée de la flagelline FlaB3. Toutes ces flagellines sont similaires aux pilines de type IV et sont clivées par une enzyme FlaK (en orange).

A droite: les pili Ups sont formés par de deux pilines UpsA et UpsB. Après leur clivage par PibD (en orange), les pilines (en vert) sont assemblées en simple hélice délimitant un canal central. Cet assemblage est permis par l'ATPase UpsE (en bleu clair) au niveau du pore formé pas la protéine transmembranaire UpsF (en bleu foncé) (Gerven et al., 2011).

simple hélice et laissent apparaître une cavité centrale plus petite que celle de la seringue des systèmes de sécrétion de type III (Wang et al., 2008). Ces pili permettent l'adhésion sur des surfaces abiotiques et facilitent la formation de biofilms (Henze *et al.*, 2012, Zolghadr et al., 2010). De plus, les Pili Ups (UV-induced Pili of *Sulfolobus*) induisent la formation d'agrégats bactériens en réponse à l'irradiation par des rayons ultra-violet ou à des dommages de l'ADN causés par la bleomycine ou la mitomycine C (Frols *et al.*, 2007, Frols *et al.*, 2008). Ce mécanisme permet l'échange de matériel génétique afin de réparer les dommages de l'ADN (Ajon et al., 2011) (Figure 6).

Les PT4 et les systèmes apparentés sont donc présents dans un grand nombre de bactéries. Outre leur rôle d'adhésine, ces PT4 permettent un large éventail de fonctions. Certaines de ces fonctions sont permises par une propriété propre aux PT4, la rétraction.

III. Fonctions et structure des PT4

1. Fonctions des PT4 et rôle dans la pathogénèse

Les PT4 confèrent aux bactéries un éventail de fonctions très diverses. Chez les *Neisseria*, les pili permettent la motilité, l'import d'ADN exogène, l'adhésion aux cellules épithéliales et endothéliales et l'induction de voies de signalisation aboutissant à la formation de projections membranaires de la cellule hôte au sein de la microcolonie, qui caractérise la réponse cellulaire.

a) Motilité

Le méningocoque est capable de se déplacer par « twitching motility ». Le terme twitching motility fut employé initialement pour décrire des déplacements de cellules individuelles indépendants des flagelles, consistant en des mouvements intermittents avec des directions changeantes et ressemblant à un mouvement brownien (Henrichsen, 1972). Finalement, ce type de motilité se rencontre essentiellement chez les bactéries à Gram négatif qui expriment à leur surface des PT4 (Henriksen & Henrichsen, 1975). Ce type de motilité est dirigé par un cycle d'élongation des PT4, l'ancrage des PT4 à une surface, suivi de la rétraction des PT4 ; la rétraction permettant le déplacement du corps bactérien.

La « twitching motility » joue un rôle important dans la pathogénèse et la perte de cette faculté diminue nettement le pouvoir pathogène chez *Pseudomonas aeruginosa*. En effet, des souches de *P. aeruginosa* déficientes pour la motilité par twitching présentent une virulence diminuée dans les modèles murins et les modèles d'infections de couches des cellules épithéliales de cornée. Ces souches ne présentent aucun défaut dans l'adhésion ou l'invasion, mais ne sont plus capables de sortir des cellules et s'accumulent à l'intérieur de celles-ci (Comolli *et al.*, 1999, Zolfaghar *et al.*, 2003, Alarcon *et al.*, 2009). Chez *N. meningitidis*, la fonction exacte de cette motilité n'est pas clairement établie, cependant il est probable que cette motilité soit également nécessaire pour coloniser de nouveaux sites d'infection et pour la formation de biofilms (Giron *et al.*, 1997, O'Toole & Kolter, 1998, Singh *et al.*, 2000).

Cette motilité particulière a surtout été étudiée chez *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae* et *M. xanthus*. La « twitching motility » repose essentiellement sur la rétraction des pili médiée par

l'ATPase cytosolique PilT (Bradley, 1980, Wall & Kaiser, 1999). Chez *N. gonorrhoeae* par exemple, la force produite par la rétraction des pili a été mesurée grâce à l'utilisation d' « optical tweezers » ou pinces optiques. Cette force varie d'une espèce à l'autre, chez *P. aeruginosa* elle a été estimée à 10-20pN, alors que chez les *Neisseria* elle peut atteindre 100pN (Merz *et al.*, 2000, Skerker & Berg, 2001, Maier *et al.*, 2002). L'association d'une dizaine de fibres de PT4 en faisceau (bundle) permet d'accroître cette force de l'ordre du NanoNewton. Une telle force permettrait de déplacer l'équivalent de 1000 bactéries, ce qui en fait le moteur moléculaire le plus puissant jamais décrit (Biais *et al.*, 2008).

b) Compétence pour la transformation

Le mécanisme de transformation repose sur la capture d'un ADN exogène via les PT4 suivie de son incorporation dans le génome par recombinaison homologue. De manière générale, la compétence pour la transformation est très importante pour la survie et l'évolution des bactéries (Ochman *et al.*, 2000). En effet, la transformation de l'ADN exogène permet un changement phénotypique contribuant à l'échappement au système immunitaire de l'hôte, comme décrit pour les gènes de la capsule, ou permet de récupérer des gènes de résistance aux antibiotiques. Par ailleurs, il a été montré que les motifs d'ADN favorisant la compétence retrouvés à l'intérieur d'une phase ouverte de lecture sont préférentiellement insérés dans des gènes de maintenance et de réparation de l'ADN, indiquant que ce mécanisme a un rôle dans la réparation de l'ADN endommagé (Davidsen *et al.*, 2004, Treangen *et al.*, 2008).

Une des particularités de la compétence pour la transformation de *Neisseria meningitidis*, qu'elle partage avec *Haemophilus influenzae*, est la spécificité pour l'ADN transformant. En effet, un motif de 10 nucléotides (5'-GCCGTCTGAA-3'), appelé DUS pour « DNA uptake sequences », est nécessaire pour une compétence optimale. Ce motif est retrouvé réparti sur l'ensemble du génome. On dénombre jusqu'à 2000 copies de ce motif DUS dans le génome des *Neisseria*, ce qui correspond à 1% du génome, favorisant ainsi la transformation par de l'ADN homospécifique. Il a été montré que le nombre de motifs DUS sur l'ADN transformant augmente la fréquence de transformation (Ambur *et al.*, 2012). De plus, il existe une corrélation entre le taux de recombinaison et la densité de DUS présent dans une région d'ADN donné, confirmant un rôle de marqueurs de recombinaison des DUS (Budroni *et al.*, 2011). Ce motif n'influe pas sur la liaison de l'ADN exogène mais sur la capture de l'ADN dans l'enveloppe bactérienne (Aas *et al.*, 2002b). Il est reconnu par la piline mineure ComP (Cehovin *et al.*, 2013).

Comme certaines bactéries, les *Neisseria* sont naturellement compétentes pour la transformation par de l'ADN exogène (Avery *et al.*, 1944, Hamilton & Dillard, 2006). Contrairement à d'autres bactéries pathogènes, comme *B. subtilis* ou *S. pneumoniae*, la compétence du méningocoque est toujours activée et ne dépend pas des facteurs environnementaux. Les mécanismes de la transformation peuvent être découpés en plusieurs étapes. La fixation de l'ADN exogène constitue la première étape de la transformation. A une étape de fixation fait suite une étape de capture lors de laquelle l'ADN franchit la membrane externe. L'ADN devient ainsi résistant à l'ajout de DNase dans le milieu. Une fois dans le périplasme, l'ADN serait pris en charge par la protéine périplasmique de 8kDa ComE (Chen & Gotschlich, 2001). L'ADN est ensuite transmis à ComA, protéine de la membrane interne, permettant son passage à travers la membrane interne. Ce passage s'accompagne également de la dégradation d'un des deux brins (Chaussee & Hill, 1998). Finalement, l'ADN est intégré dans le chromosome bactérien par l'intervention de RecA permettant la recombinaison homologue (Hamilton & Dillard, 2006). La fréquence de transformation chez le méningocoque est de 10^{-3} à 10^{-1} événements par bactérie et par génération (Hamilton & Dillard, 2006, Treangen *et al.*, 2008).

Les PT4 jouent un rôle crucial dans la compétence pour la transformation au niveau de deux premières étapes. En effet des mutants non piliés présentent une efficacité de transformation 1000 fois moins importante que la souche sauvage (Drake & Koomey, 1995, Freitag *et al.*, 1995). En absence de pili, les bactéries fixent 100 fois moins d'ADN (Aas *et al.*, 2002b). L'ADN exogène se fixerait aux PT4 par des interactions électrostatiques non spécifiques (Craig *et al.*, 2006). De plus, La translocation de l'ADN exogène du milieu extérieur vers le périplasme se produit à travers le pore PilQ par l'intervention de l'ATPase PilT qui rétracte le pilus (Aas *et al.*, 2002b). Chez *N. gonorrhoeae*, un mutant *pilT* qui est incapable de rétracter ces pili n'est pas compétent bien qu'il soit capable de fixer l'ADN exogène (Wolfgang *et al.*, 1998) (Figure 7).

c) Adhésion aux cellules de l'hôte

L'adhésion est la première étape de la colonisation de l'épithélium et de l'endothélium. Les PT4 sont des facteurs de colonisation communs à de nombreux micro-organismes à Gram négatif tels que *E. coli* (EPEC), *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae* et *N. meningitidis*. Les PT4 permettent l'adhésion des bactéries sur des surfaces abiotiques et biotiques (Pelicic, 2008). L'observation au microscope électronique a permis d'observer un contact direct entre les pili

des bactéries et les cellules épithéliales (Mikaty et al., 2009). Des études *in vitro* réalisées sur des cellules épithéliales et endothéliales humaines ont par la suite confirmé le rôle des pili dans l'adhésion du méningocoque. Elles ont toutes montré que des mutants non piliés présentent une capacité d'adhésion aux cellules 1000 fois inférieure à celle des bactéries piliées (Virji et al., 1991, Virji et al., 1993b).

Outre la présence des PT4 à la surface des bactéries, l'adhésion dépend également des caractéristiques intrinsèques de la piline Pile. En effet, l'expression de certains variants de piline module la capacité des bactéries à adhérer sur les cellules humaines (Lambden et al., 1980, Nassif et al., 1993, Nassif et al., 1994). De plus, les modifications post-traductionnelles (MPT), en particulier les glycosylations, pourraient modifier l'adhésivité des pili (Virji et al., 1993b). Dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa*, l'adhésion bactérienne est beaucoup mieux comprise. En effet, des études ont pu montrer que la région D de la piline PilA semble directement responsable de l'interaction avec le carbohydrate β GalNAc(1-4) β Gal présent dans des glycolipides cellulaires de surface comme l'asialo-GM1 ou l'asialo-GM2 (Krivan et al., 1988, Campbell et al., 1997, Hazes et al., 2000).

Malgré de nombreux efforts, l'identification du récepteur cellulaire permettant l'adhésion des *Neisseria* n'a pas encore abouti. Initialement, des études ont mis en évidence le rôle du récepteur MCP (membrane cofacteur protéin, CD46), une glycoprotéine transmembranaire impliquée dans la régulation de la cascade du complément, dans l'adhésion de *N. meningitidis* permise par les PT4 (Kallstrom et al., 1997, Kallstrom et al., 2001, Johansson et al., 2003). Cependant, l'interaction directe des PT4 avec le CD46 n'est très certainement pas l'élément clé de l'adhésion, puisque l'inhibition de l'expression du CD46 par ARN interférence dans des cellules épithéliales n'affecte pas l'adhésion de *N. gonorrhoeae* (Kirchner et al., 2005). D'ailleurs l'existence d'un récepteur unique semble peu probable, ce qui expliquerait la difficulté rencontrée pour déterminer les potentiels récepteurs. Des travaux récents montrent que les résidus osidiques contenus dans le lait humain ou bovin inhibent l'adhésion dépendante des pili, ce qui suggère une interaction entre certains sucres et les pili (Hakkarainen et al., 2005).

d) Agrégation bactérienne

N. meningitidis se rassemble en agrégats de plusieurs centaines de bactéries, en suspension liquide et à la surface des cellules (Figure 8). La formation d'agrégats bactériens nécessite la présence des PT4 car les mutants non piliés sont non agrégatifs. L'agrégation est une

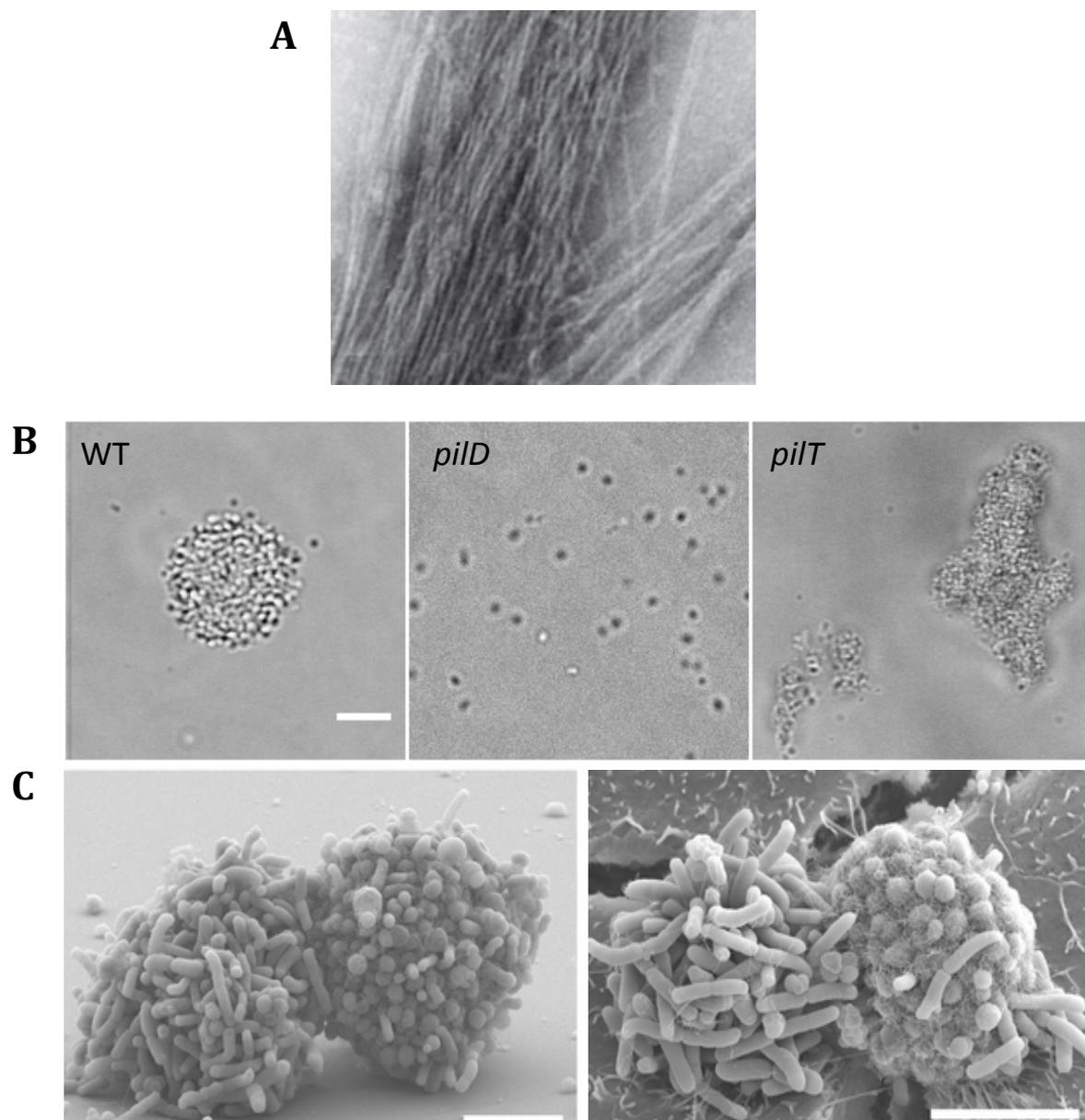


Figure 8 : Mécanisme de l'agrégation bactérienne.

A. Faisceaux de plusieurs pili visualisés par microscopie électronique (Carbonnelle et al., 2006). **B.** Agrégat observé en transmission. Les agrégats de la souche parentale sont sphériques et dynamiques. L'agrégation dépend des PT4, une souche *pilD* n'agrège pas. La souche *pilT* est hyper-agrégative, mais les agrégats présentent une structure différente (Images prises par Valentina Lo-Schiavo). Barre d'échelle: 10µm. **C.** Agrégats formés par *N. elongata* et *N. meningitidis* observés en microscopie électronique sur une surface abiotique (à gauche) et sur des cellules épithéliales (à droite). Barre d'échelle: 5µm (Higashi et al., 2011).

propriété importante qui permet la formation de microcolonies demi-sphériques à la surface des cellules de l'hôte, ce qui influence la colonisation des cellules (Marceau et al., 1995). De plus, la propriété agrégative des bactéries confère à la microcolonie une résistance contre des facteurs de défense de l'hôte (Clavijo et al., 2010). En effet, il a été démontré que la capacité des bactéries *E. coli* (ETEC) à agréger augmente la résistance aux antibiotiques et au lysozyme. De plus, les agrégats formés par *V. cholerae* permettent d'augmenter la résistance à l'action du complément (Chiang et al., 1995, Kirn et al., 2000). La formation d'agrégats, tout comme un biofilm, éviterait ainsi à l'ensemble des bactéries d'être au contact de facteurs toxiques. Ainsi les bactéries situées à l'extérieur de l'agrégat formeraient une barrière physique limitant la diffusion des molécules toxiques et permettant la survie des bactéries au centre de l'agrégat.

L'agrégation entre les bactéries dépend la capacité intrinsèque des PT4 à s'associer entre eux via des interactions électrostatiques (Taylor et al., 1987, Craig et al., 2006) (Figure 8A). Il existe deux types d'interactions selon l'orientation des fibres : la formation de « bundle » ou faisceaux entre des fibres parallèles de même orientation et provenant de la même bactérie et une interaction entre des fibres antiparallèles provenant de deux bactéries distinctes. Chez *V. cholerae*, il a clairement été montré que l'agrégation des bactéries nécessite deux phases d'interaction entre les pili TCP (Toxin Coregulated Pilus) : tout d'abord la formation de faisceaux entre les pili d'une même bactérie et ensuite l'enroulement de plusieurs faisceaux provenant de plusieurs bactéries. Ce découpage des mécanismes de l'agrégation permet d'expliquer pourquoi des bactéries incapables de former des faisceaux de pili n'agrègent plus et pourquoi des bactéries capables de former des faisceaux ne sont pas toutes capables d'agréger (Jude & Taylor, 2011).

La formation de ces interactions est directement dépendante des caractéristiques intrinsèques de la piline majeure. En effet, il a été observé que l'expression de certains variants de piline, notamment chez *N. meningitidis*, *E. coli* (ETEC) et *V. cholerae* altère la capacité des bactéries à agréger, vraisemblablement en modifiant les charges en surface des pili (Humphries et al., 2009, Park et al., 2001, Kirn et al., 2000). Chez *N. meningitidis*, un variant de la piline, la piline SA est incapable de former des bundles parallèles et antiparallèles (Marceau et al., 1995, Nassif et al., 1993).

Outre la surface électrostatique des pili, l'agrégation entre les bactéries nécessite une régulation de la dynamique des pili. En effet, les mutants *pilT* ne pouvant pas rétracter les pili, présentent une hyper-piliation et une hyper-agrégation. Ces agrégats ont une morphologie bien particulière. Contrairement à une souche parentale présentant des agrégats de taille homogène et de forme sphérique, les agrégats formés par un mutant *pilT* ont une forme irrégulière et de

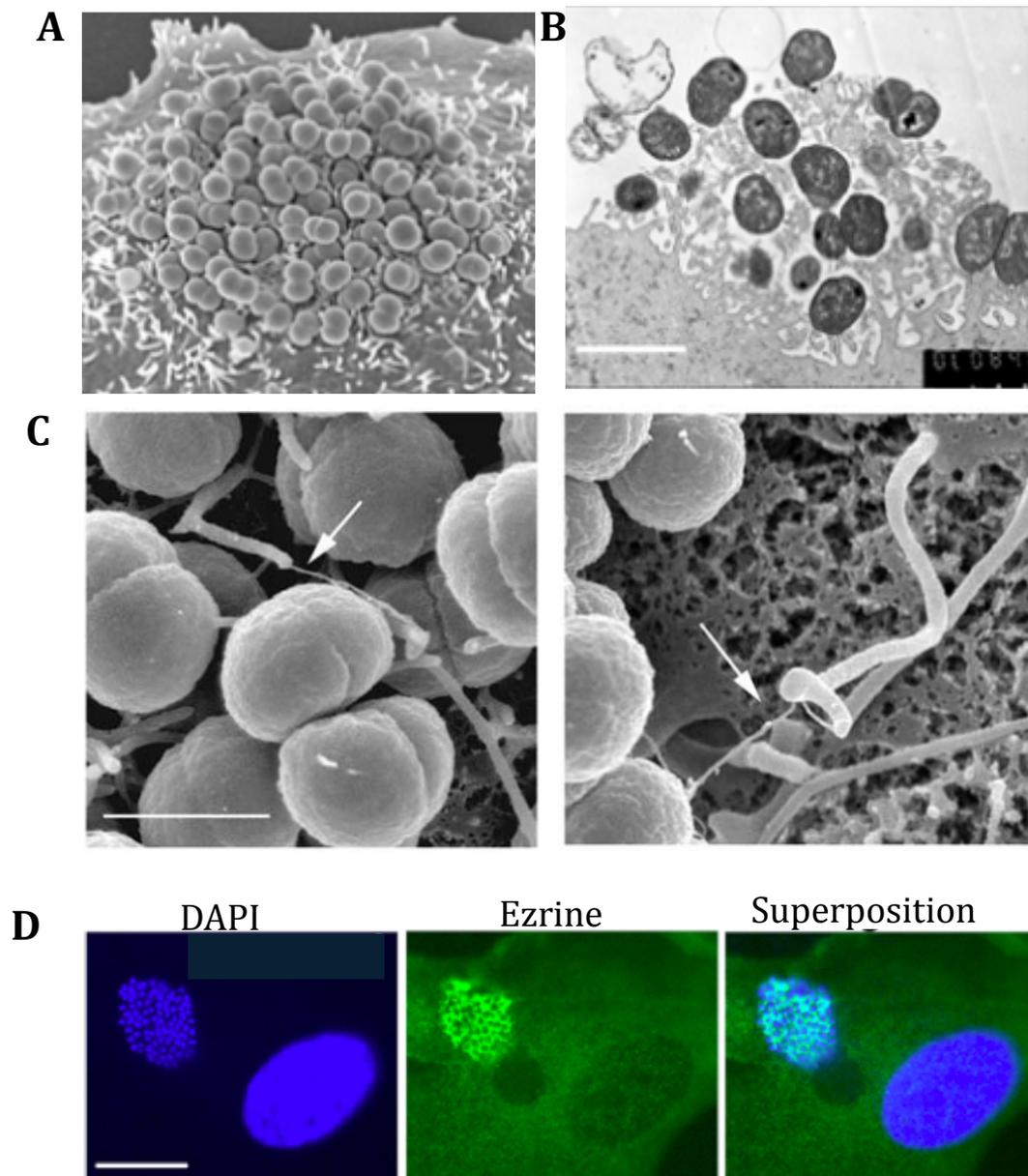


Figure 9 : Remodelage de la membrane plasmique et recrutement de composants cellulaires induit par *N. meningitidis*

A. Microcolonie de méningocoques sur une cellule épithéliale visualisée par microscopie électronique à balayage. **B.** Visualisation des projections cellulaires en microscopie électronique à transmission. Barre d'échelle: 1 μ m. **C.** Visualisation de l'interaction directe entre les pili (flèche blanche) et les projections membranaires par Microscopie électronique à balayage. Barre d'échelle: 1 μ m. **D.** Recrutement des composants cellulaires dans une structure en « nid d'abeille » retrouvée sous la microcolonie: les bactéries sont visualisées par un marquage DAPI (à gauche, en bleu) et l'eitrine est utilisé comme marqueur (au centre, en vert). Barre d'échelle: 10 μ m (Mikaty et al., 2009).

taille plus importante (Figure 8B). Le phénotype de l'agrégation peut être mesuré de deux façons : soit par une étude visuelle au microscope, soit par une étude cinétique de sédimentation. Dans le cas d'un mutant *pilT*, la sédimentation complète des agrégats est atteinte plus rapidement que la sédimentation d'une souche parentale.

e) Réponse cellulaire

Après son adhésion aux cellules épithéliales et endothéliales, *N. meningitidis* se multiplie pour former des microcolonies et induit un remodelage local de la membrane plasmique de la cellule eucaryote, qui aboutit à la formation de projections membranaires autour des bactéries et au sein de la microcolonie (Eugene *et al.*, 2002, Merz & So, 1997, Nassif *et al.*, 2002, Stephens *et al.*, 1983) (Figure 9A et 9B). Cette déformation membranaire, accompagnée du recrutement de nombreux composants cellulaires, est permise par les PT4 (Merz *et al.*, 1999, Mikaty *et al.*, 2009) (Figure 9C).

Le méningocoque est constamment soumis à des forces hydrodynamiques s'exerçant dans l'organisme, et plus particulièrement dans la circulation sanguine. Ces forces sont à prendre en considération puisqu'elles influent sur toutes les étapes de colonisation des vaisseaux par les bactéries, en commençant par l'adhésion. En effet, il a été montré que les contraintes de cisaillement induites par le flux sanguin sont un paramètre important qui module la capacité du méningocoque à adhérer aux vaisseaux (Mairey *et al.*, 2006). L'adhésion du méningocoque nécessite des contraintes de cisaillement extrêmement faibles d'une valeur inférieure à 0.5 dyne/cm², qui n'est retrouvée qu'au niveau des capillaires de façon transitoire.

Cependant, une fois adhérentes, les microcolonies formées par le méningocoque sont capables de résister à des fortes contraintes de cisaillement allant jusqu'à 100 dynes/cm², valeur correspondant aux valeurs maximales observées dans la circulation sanguine chez l'homme. Deux types d'interaction co-existent au sein de la colonie : d'une part, l'adhésion entre la bactérie et la cellule de l'hôte et d'autre part l'agrégation entre les bactéries. Cette dernière est une interaction beaucoup plus faible que celle intervenant lors de l'adhésion. Ainsi les projections cellulaires induites par le méningocoque permettraient à toutes les bactéries d'être au contact de la cellule et d'y établir de fortes interactions. Cette réorganisation cellulaire permettrait par conséquent le maintien de la cohésion de la microcolonie à la surface des cellules hôtes (Mikaty *et al.*, 2009).

Outre le maintien des microcolonies au contact des cellules, l'induction de cette réponse cellulaire serait responsable de la perte d'étanchéité des vaisseaux sanguins. En effet, il a été récemment montré que les microcolonies à la surface de cellules endothéliales cérébrales induisent une délocalisation des protéines responsables de la formation des jonctions adhérentes comme VE-cadhérine et p120-caténine et celles impliquées dans les jonctions serrées comme ZO-1, ZO-2 et claudine. Ce recrutement est directement dépendant de la relocalisation du complexe de polarité Par3/Par6/PKC ζ sous les microcolonies. Ainsi le détournement de ces protéines permettrait d'ouvrir les jonctions s'établissant entre les cellules endothéliales et pourrait permettre aux bactéries de traverser la barrière hémato-encéphalique par voie paracellulaire (Coureuil et al., 2009).

Simultanément à la déformation de la membrane plasmique de la cellule hôte, de nombreux composants cellulaires sont recrutés sous la microcolonie formant une structure alvéolaire en nids d'abeille nommée également « plaque corticale » (Merz et al., 1999). Cette plaque corticale est composée de nombreuses protéines membranaires comme CD44, CD46, ICAM-1, ICAM-2, VCAM et Erb2 (Doulet *et al.*, 2006, Hoffmann *et al.*, 2001, Eugene et al., 2002, Lambotin *et al.*, 2005, Merz et al., 1999, Weyand *et al.*, 2006).

Un recrutement important d'actine et de cortactine est également observable dans les plaques corticales, ainsi que la présence de protéines cytosoliques appartenant à la famille des ERM (Ezrin Radixin Moesin) comme l'eitrine et la moesine (Merz et al., 1999, Eugene et al., 2002) (Figure 9D). Ces dernières sont activées par phosphorylation et permettent alors de faire le lien entre certains récepteurs membranaires et l'actine (Weyand et al., 2006, Niggli & Rossy, 2008).

La réorganisation du cytosquelette requiert des voies de signalisation impliquant les GTPases Rho, Rac1, Cdc42 ainsi que la kinase Src (Hoffmann et al., 2001, Eugene et al., 2002, Lambotin et al., 2005, Merz et al., 1999). Récemment, il a été montré que le recrutement et l'activation du récepteur β 2-adrénergique permet d'activer la voie Src via les β arrestines (Coureuil et al., 2010). Ce mécanisme conduit à la phosphorylation de la cortactine et promeut la polymérisation d'actine (Coureuil et al., 2010, Hoffmann et al., 2001). Outre les voies de signalisation, la membrane plasmique semble jouer un rôle important puisque la déplétion en cholestérol inhibe la formation des projections membranaires (Mikaty et al., 2009).



Figure 10 : Aligement des séquences des pilines de classe IV

Aligement des séquences de pilines de type IVa et IVb. Aligement des séquences signal et des trente premiers résidus de la forme mature correspondant à l'hélice $\alpha 1N$. La séquence signal des pilines de classe IVb sont plus grandes. Le résidu Phe+1 n'est pas toujours observé pour les pilines de classe IVb, alors que le résidu Gly-1 et le résidu Glu+5 sont très conservé pour les pilines de classe IVa et IVb.

ETEC, enterotoxigenic *E.coli*; Bs, *Bacillus subtilis*; Mv, *Methanococcus voltae*; EHEC, enterohaemorrhagic *E. coli*; EPEC, enteropathogenic *E. coli*.

2. Structure des Pili de type IV

Les PT4 sont formés par l'assemblage des pilines de type IV. Ces pilines présentent une architecture scindée en deux domaines, une hélice α N-Terminale hydrophobe et un domaine globulaire. Cette caractéristique aboutit à un assemblage propre aux PT4. En effet, les pilines s'assemblent en fibre hélicoïdale dont le cœur est maintenu par des interactions hydrophobes entre les hélices α , alors que les domaines globulaires définissent la surface de la fibre.

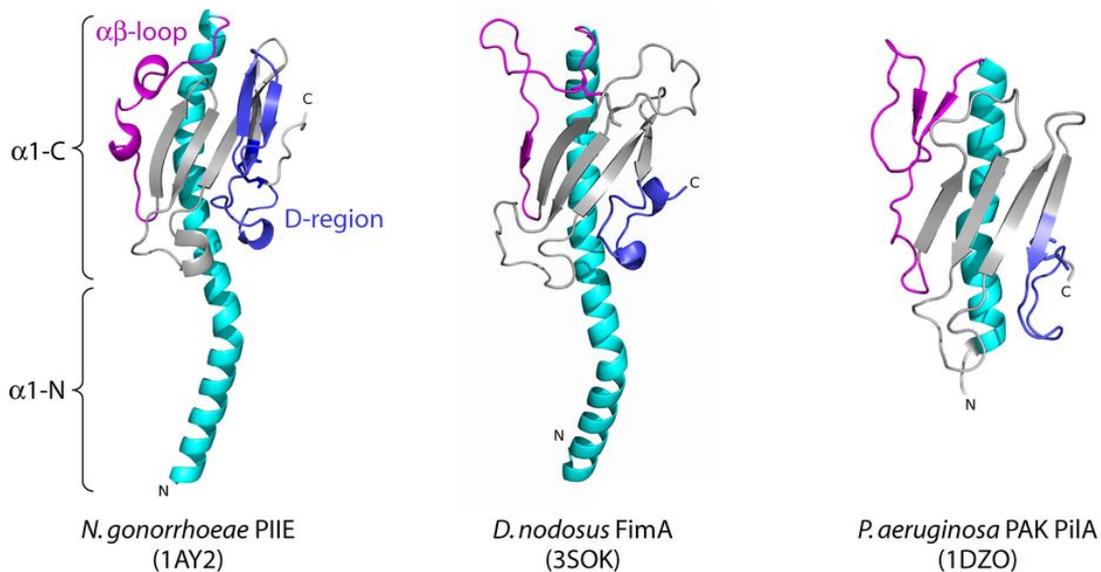
a) Caractéristiques de séquence de la piline

La sous-unité majoritaire des PT4, la piline, est composée d'une séquence N-Terminale conservée d'une cinquantaine de résidus, appelée également région constante et d'une séquence C-Terminale extrêmement variable d'une espèce à l'autre et dans laquelle seule la présence d'un pont disulfure est conservée. La piline est synthétisée sous forme d'un précurseur qui est clivé par la prépiline peptidase PilD. Cette maturation dépend de la présence en N-Terminal d'un peptide signal basique composé de cinq à trente résidus dont le dernier est généralement un résidu glycine (Lory & Strom, 1997). L'enzyme PilD méthyle le premier résidu de la forme mature. Cette méthylation dépend d'un résidu glutamate, en position +5, très conservé entre les pilines (Strom & Lory, 1991). Basé sur les différences de séquences peptidiques, les pilines formant des PT4 ont été divisées en deux classes, les pilines de type IVa et IVb (Figure 10).

Les pilines de type IVa sont caractérisées par un peptide signal court de cinq à six acides aminés. La protéine mature, commençant par une phénylalanine, est constituée d'environ 150 résidus. Les pilines de type IVa sont retrouvées chez des espèces bactériennes très différentes : *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* ou *Moraxella lacunata*.

Les pilines de type IVb se distinguent d'une part par un peptide signal basique de plus grande taille pouvant aller de 13 à 30 acides aminés, et d'autre part par le fait que le premier résidu de la piline mature n'est pas une phénylalanine mais plutôt une méthionine comme dans la piline TcpA de *V. cholerae*, une valine ou une leucine comme dans la piline BfpA d'EPEC (Figure 10). De plus, les pilines matures de classe IVb sont plus grandes, avec une taille d'environ 190 résidus. Contrairement aux PT4 de classe a (PT4a), les PT4 de classe b (PT4b) sont essentiellement produits par des espèces colonisant le système digestif. On retrouve le "Toxin-Coregulated Pilus" (TCP) chez *V. cholerae* (Faast *et al.*, 1989, Shaw & Taylor, 1990), le "Bundle-Forming Pilus" (BFP) chez les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et le longus chez *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) (Giron *et al.*, 1994, Giron *et al.*, 1991, Donnenberg *et al.*, 1992). Ce

A Pilines de classe IVa



B Pilines de classe IVb

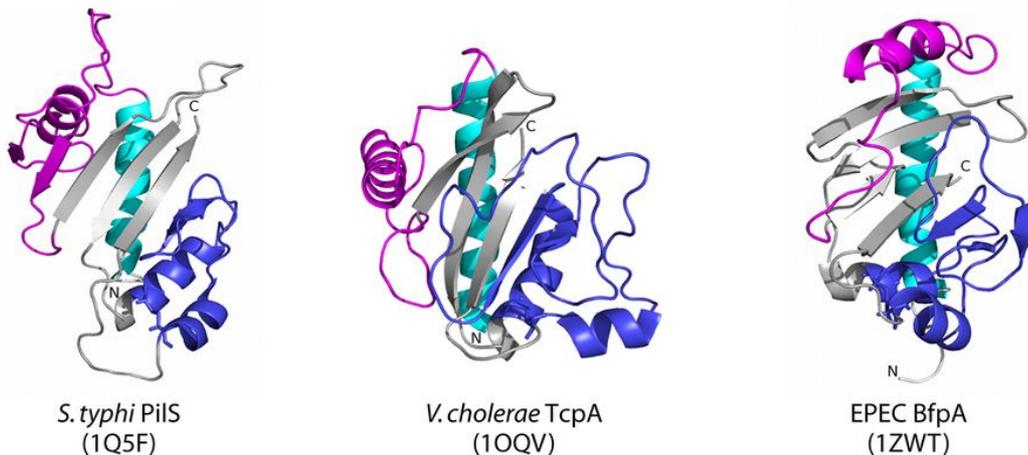


Figure 11 : Structure tridimensionnelle des pilines de classe IV

Représentation en ruban de la structure des pilines majeures. Les pilines présentent une longue hélice α (en cyan) connecté à un feuillet β de 4 à 5 brins β (en gris) par l'intermédiaire de la boucle α/β (en magenta), et une région D (en bleu) maintenu par un pont disulfure. L'hélice α est scindée en deux: l'hélice $\alpha 1N$ d'une vingtaine de résidus hydrophobes et l'hélice $\alpha 1C$ amphiphile au contact du feuillet β . Les pilines de classe IVb présentent un domaine globulaire plus grand que celui des pilines de classe IVa . En effet, les régions α/β et les régions D présentent des structures secondaires plus complexes (Giltner et al., 2012).

A. Les pilines de classe IVa. PilE de *N. gonorrhoeae*, FimA de *D. nodosus* et PilA de *P. aeruginosa*. **B.** Les pilines de classe IVb. PilS de *S. typhi*, TcpA de *V. cholerae* et BfpA des EPEC. Les références de la banque PDB sont inscrites sous les structures.

groupe comprend également les pili de *S. enterica* serovar *typhi* (Zhang et al., 2000) et les CFA/III des ETEC (Taniguchi *et al.*, 1995, Giron et al., 1997).

b) Caractéristiques morphologiques et structurales de la piline

Les études structurales des pilines sont particulièrement laborieuses en raison de leur insolubilité. En effet, ces protéines sont très hydrophobes et présentent une tendance accrue à auto-agrégéer pour former des filaments résistants aux fortes températures et aux détergents (Li et al., 2012). Cependant, les premiers résultats de cristallographie par diffraction des rayons X ont été obtenus avec l'intégralité des pilines de *N. gonorrhoeae* et de *P. aeruginosa* par dissociation des pili et solubilisation des pilines en présence de détergent (Parge *et al.*, 1995, Craig *et al.*, 2003). Par la suite, les structures d'autres pilines ont pu être déterminées à partir de formes tronquées dont une partie de la région hydrophobe N-terminale a été délétée, comme par exemple pour la piline PilA de la souche de *P. aeruginosa* K122-4 ou encore la piline de type IVb TcpA de *Vibrio cholerae* (Hazes et al., 2000, Audette *et al.*, 2004, Craig et al., 2003) (Figure 11).

i) *Architecture commune entre les pilines*

A l'heure actuelle, de nombreuses structures cristallographiques de pilines de types IVa et IVb ont été déterminées (Craig et al., 2003, Parge et al., 1995, Giltner *et al.*, 2012, Xu *et al.*, 2004). L'analyse de ces différentes structures montre que la piline mature se compose sommairement de deux parties : une région N-terminale qui adopte une structure en hélice α d'une cinquantaine de résidus (hélice $\alpha 1$), et une tête globulaire qui comporte des feuilletts β antiparallèles composés de 4 à 5 brins β et un pont disulfure qui délimite une boucle correspondant à la région D (Fig). La partie N-Terminale de l'hélice $\alpha 1$ ($\alpha 1N$) est hydrophobe alors que la partie C-Terminale ($\alpha 1C$) est amphiphile. Alors que la face hydrophobe de l'hélice $\alpha 1C$ interagit avec la partie globulaire de la piline, la face hydrophile, elle, est exposée à la surface de la protéine mais sera cachée lors de l'assemblage du pilus.

ii) *Variabilité au niveau de l'hélice α N-Terminale*

L'hélice $\alpha 1$ des pilines présente une légère courbure due à la présence d'une proline en position 22 et d'une glycine ou d'une proline en position 42 dans les pilines de type IVa. Ces résidus ne sont pas conservés dans les pilines de type IVb, néanmoins des résidus glycines en

position 11, 14 et 19 permettent d'assurer cette torsion. Par ailleurs, même si les différentes pilines caractérisées montrent une légère flexibilité de la région N-terminale, la variation observée dans cette région n'excède pas 10 Å, ce qui est en faveur d'un mécanisme commun d'assemblage pour tous les PT4 (Giltner et al., 2012).

iii) Variabilité au niveau du domaine globulaire

Le feuillet β est entouré de deux régions structurellement variables : la boucle α/β qui permet la connection entre l'hélice α 1 et le feuillet β et en partie C-Terminale la région disulfure ou région D qui est délimitée par la présence d'un pont disulfure.

La boucle α/β peut être composée de différentes structures secondaires. Parmi les pilines de type IVa, on observe une absence de structures secondaires dans le cas de la piline GC de *N. gonorrhoeae* et de la piline K122-4 de *P. aeruginosa*, tandis que la piline PAK de *P. aeruginosa* porte un petit feuillet β composé de trois brins β . Il existe également une variabilité au niveau de cette boucle α/β entre les pilines de type IVb. Ces pilines présentent toutes en N-Terminal de cette boucle une hélice α de longueur variable. Cette région présente également un feuillet β composé de 2 ou 3 brins β dans le cas des pilines PilS de *S. typhi* et BfpA des EPEC.

La région D présente également une grande variabilité. Dans le cas le plus simple, la piline de *P. aeruginosa* comporte une séquence peptidique de douze résidus non structurée. La piline GC de *N. gonorrhoeae*, quant à elle, présente deux brins β antiparallèles. La région D des pilines de type IVb présente, quant à elle, une boucle plus large d'une cinquantaine de résidus contenant une hélice α et deux brins β .

Malgré les différences topologiques, les pilines de type IV partagent une architecture commune. Le cœur conservé de la piline fait de l'hélice α et du feuillet β permet l'assemblage du pilus et se retrouve enfoui à l'intérieur de la fibre tandis que les parties variables contenant la boucle α/β et la région D sont exposées à la surface du pilus (Giltner et al., 2012, Forest & Tainer, 1997, Parge et al., 1995).

c) Structure du filament et implications

Ces données structurales sont d'un très grand intérêt pour la compréhension de l'assemblage et de la fonction des PT4, car elles ont permis de proposer un modèle pour leur organisation (Figure 12).

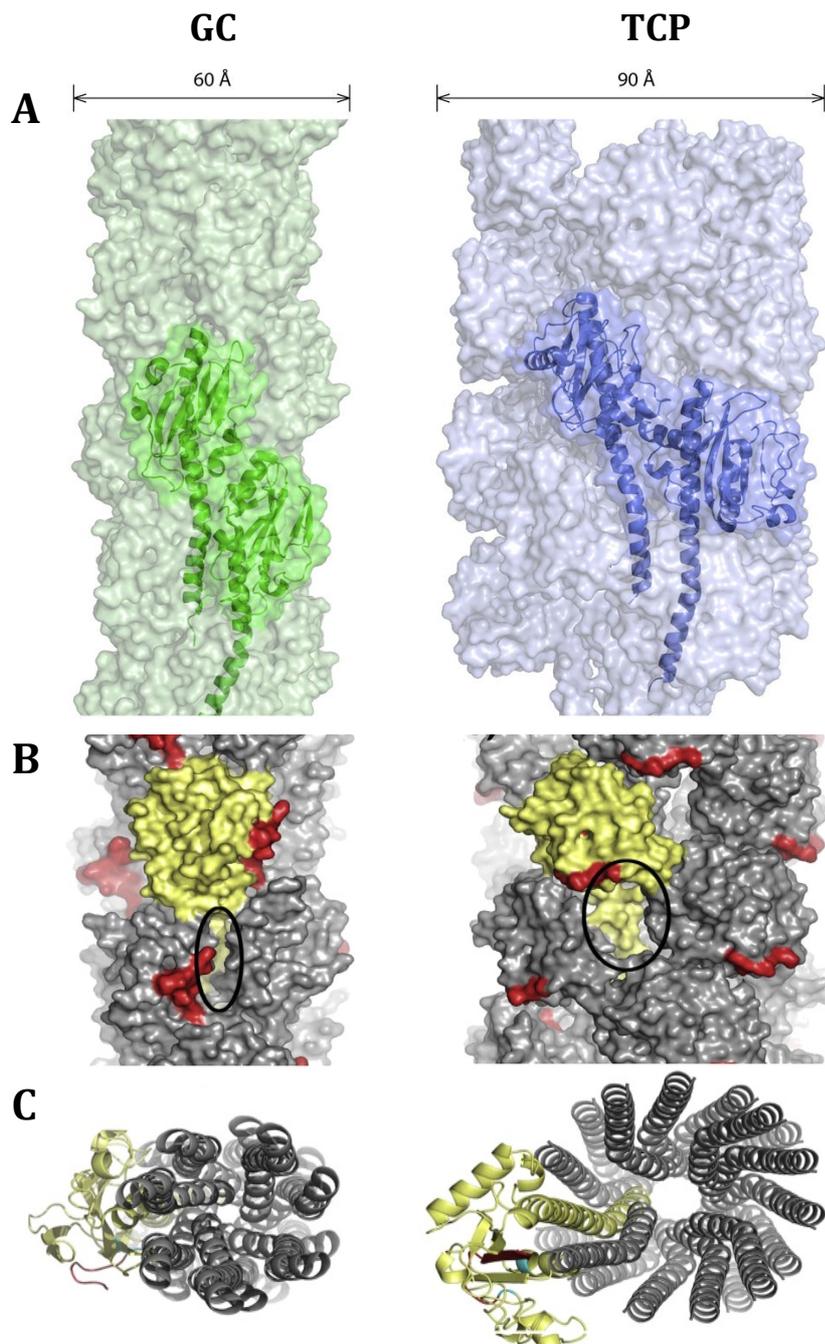


Figure 12 : Modélisation des filaments des pili GC (à gauche) et TCP (à droite)

Dans l'assemblage des PT4 de classe IVa, les pilines sont en étroite interaction au niveau de l'hélice α et également au niveau de la région D et la région α/β . Du fait de l'élargissement du feuillet β , les pilines de classe IVb présentent un assemblage moins compact où seul l'hélice α permet la cohésion entre les pilines. Les références de la banque PDB sont 2HIL pour le pilus GC et 1OR9 pour le pilus TCP.

A. Représentation de la surface des fibres et représentation en ruban de l'assemblage de deux sous-unités (Giltner et al., 2012). **B.** Représentation de la surface des pili. En jaune, représentation d'une seule sous-unités. Le cercle indique l'accessibilité au solvant de l'hélice α . **C.** Vue du haut de l'assemblage des hélices α (Li et al., 2012).

i) *Modèle du pilus GC de N. gonorrhoeae*

Plusieurs modélisations ont été proposées pour le filament du pilus formé par *N. gonorrhoeae*. La plus récente et la plus précise s'est appuyée à la fois sur la structure de la piline de *N. gonorrhoeae* et sur les données obtenues en cryomicroscopie sur des PT4 purifiés (Craig et al., 2006). Dans ce modèle, les pilines s'assemblent en fibre avec une organisation hélicoïdale où l'hélice α 1N est positionnée parallèlement et à proximité de l'axe du pilus alors que le domaine globulaire est dirigé vers l'extérieur de la fibre. Ainsi, cette structure confirme que les hélices α 1N interagissent par des interactions hydrophobes et s'enroulent latéralement pour permettre l'empilement des pilines au sein de la fibre, alors que le feuillet β parallèle à l'axe du pilus permet l'exposition de la boucle α/β et de la région D. Cependant, ces régions participent également à la cohésion des sous-unités du pilus. En effet, dans ce modèle la région D d'une sous-unité interagit avec la région α/β de la sous-unité adjacente. Il est important de préciser que, dans le cas de *N. gonorrhoeae*, la piline PilE subit des variations antigéniques au niveau de ces régions, permettant à la bactérie de modifier les structures exposées à la surface de la fibre. Ce mécanisme de variation antigénique, qui sera détaillé dans une prochaine section, permet de modifier les propriétés des pili et d'échapper au système immunitaire de l'hôte. De plus, le long de la fibre apparaît une alternance de régions chargées positivement et négativement qui selon les auteurs permettrait à l'ADN exogène de s'entourer autour du pilus par des interactions électrostatiques (Craig et al., 2006).

Ce modèle est cohérent avec les données expérimentales. Tout d'abord, chez *N. meningitidis*, certaines mutations ponctuelles dans la région N-Terminale suffisent à empêcher l'assemblage des pili, indiquant l'importance de l'hélice α dans l'empaquetage des pilines (Aas et al., 2007, Park et al., 2001). De plus, ce modèle du pilus est consistant avec les expériences de cartographie des zones de la piline exposée à la surface du pilus effectuées chez la souche MS11 de *N. gonorrhoeae* (Forest et al., 1996). En effet, les anticorps dirigés contre les peptides 13 à 31 et 18 à 36 de la piline, qui ciblent donc la région N-terminale, ne sont pas capables de reconnaître le pilus, suggérant que ces épitopes ne sont plus accessibles et enfouis à l'intérieur du pilus. Contrairement à la région N-Terminale, les domaines 110-120 et 115-127 sont exposés à la surface des pili.

ii) *Modèle du pilus PAK de P. aeruginosa*

La structure du pilus PAK a également pu être définie (Craig et al., 2004). Cette structure est très similaire à celle du pilus du gonocoque. En effet, les hélices α 1N sont enfouies à

l'intérieur du pilus tandis que la partie globulaire de la piline forme la surface hydrophile du pilus. De plus, les régions α/β et la région D participent également à la cohésion des pilines, comme cela est observé pour le pilus du gonocoque. Dans cette structure, la région D de la piline permettant l'adhésion des bactéries sur les cellules n'est accessible que par l'extrémité distale du pilus, ce qui est également observé expérimentalement (Lee et al., 1994). Il a été montré que *N. gonorrhoeae* est capable de synthétiser des pili fonctionnels à partir de la piline PAK, indiquant un mode d'assemblage commun entre ces deux systèmes (Winther-Larsen et al., 2007).

iii) *Modèle du pilus TCP de V. cholerae*

Chez *V. cholerae*, le pilus présente la même architecture dans laquelle la région N-Terminale des hélices α est orientée vers l'intérieur du filament et le domaine globulaire forme la surface du pilus. Néanmoins, en raison de l'élargissement du feuillet β des pilines de type IVb, les paramètres d'hélicité varient. De plus, contrairement au modèle proposé pour le pilus de *N. gonorrhoeae*, les domaines globulaires de TcpA ne forment que peu d'interaction entre eux et le maintien des sous-unités TcpA est conféré principalement par les interactions hydrophobes de l'hélice $\alpha 1N$ (Craig et al., 2003). Ce modèle est cohérent avec les expériences d'échange d'hydrogène/deutérium couplées à la spectrométrie de masse (DXMS) qui ont montré que l'hélice $\alpha 1N$ est masquée à l'intérieur du filament, alors que le domaine globulaire est largement accessible au solvant et donc ne participe pas à la stabilité du pilus (Li et al., 2008). De plus, ceci pourrait avoir des conséquences importantes sur la stabilité du filament. En effet, le pilus formé par *V. cholerae* est plus sensible à la dénaturation thermique ou chimique que le pilus formé par *N. gonorrhoeae*. Quand la dénaturation du pilus TCP commence à être observée à 55°C ou en présence de 2M d'urée, le pilus GC lui est toujours assemblé à des températures supérieures à 60°C et en présence de 8M d'urée (Li et al., 2012).

iv) *Flexibilité du filament*

Cependant, les pili sont des fibres très dynamiques et ne sont certainement pas figés dans une seule structure. En effet, il a été observé chez les *Neisseria* que la rétraction des pili induit un changement de leur structure quaternaire qui favorise ainsi l'exposition des régions normalement inaccessibles enfouies à l'intérieur du filament (Biais et al., 2010, Brissac et al., 2012). De plus, les expériences d'échange d'hydrogène/deutérium ont montré que certaines régions de l'hélice α sont partiellement accessibles (Li et al., 2012). Ainsi, il est très probable que les PT4 présentent différentes structures selon les contraintes de leur environnement

Les structures des PT4 sont constamment affinées et des modèles de plus en plus précis sont régulièrement proposés. Ces données structurales permettent d'appréhender les mécanismes d'assemblage de ces pili. De plus, ces informations sont d'une importance capitale pour comprendre les fonctions biologiques associées aux PT4.

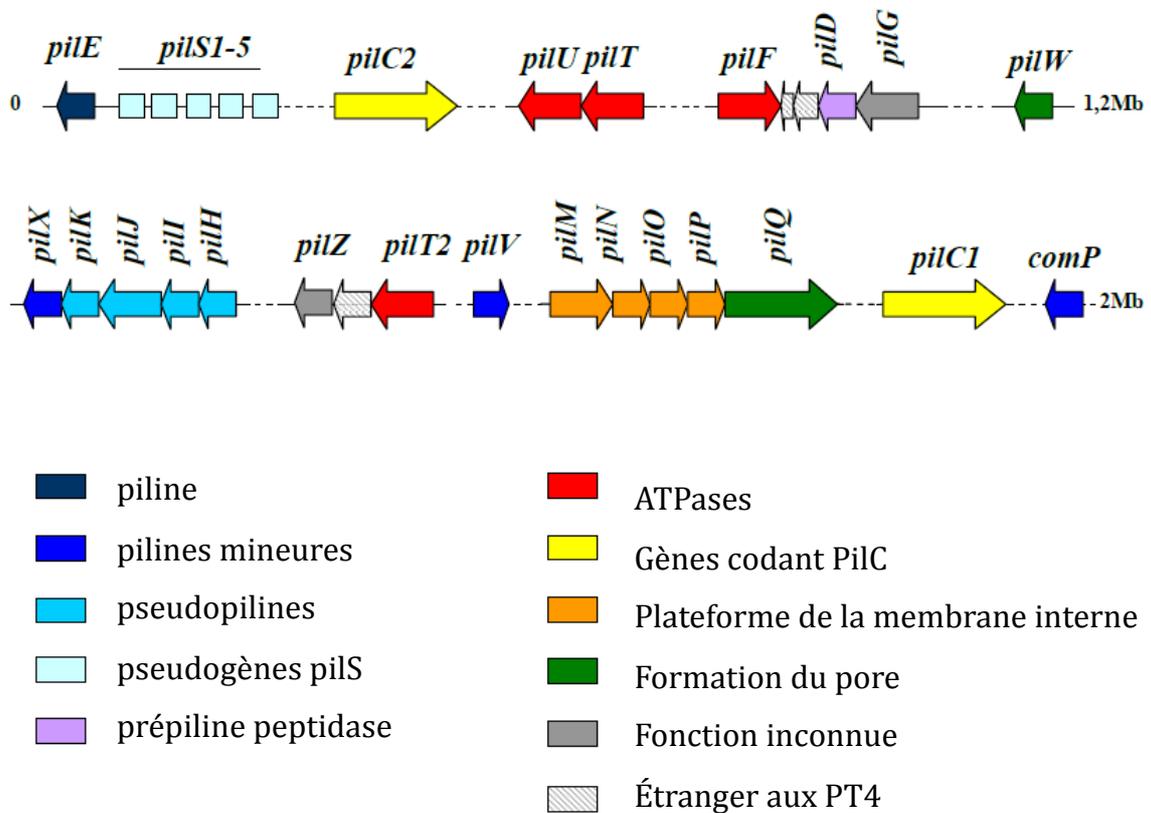


Figure 13 : Organisation génétique des gènes codant les protéines impliquées dans la biogenèse des PT4 ou leurs fonctions

En aval du gène *pilE*, 5 cassettes silencieuses *pilS* codant pour des variants alléliques de PilE sont présentes. Les gènes codant la plateforme de la membrane interne (PilM, PilN, PilO, PilP) sont localisés dans le même opéron que la sécrétine. Les gènes codant pour les protéines PilD et PilG sont dans un même opéron. Le gène codant la piline mineure PilX est situé dans l'opéron des pseudopilines alors que les gènes des autres pilines mineures ComP et pilV sont isolés dans le génome. Schéma adapté de (Pelicic, 2008).

IV. Biosynthèse de pili de type IV

La biosynthèse des PT4 nécessite une machinerie complexe qui fait intervenir de nombreuses protéines localisées dans la membrane interne, le périplasm et la membrane externe. Cette machinerie a essentiellement été étudiée chez *P. aeruginosa*, *V. cholerae* et les *Neisseria*. Les composants de ce processus étant globalement conservés entre les espèces bactériennes, les fonctions et les mécanismes de ces protéines sont souvent transposables d'une espèce à l'autre. Cependant, chaque système de piliation ayant sa propre nomenclature, plusieurs noms existent souvent pour désigner des gènes orthologues. Les protéines homologues entre les PT4 de *N. meningitidis* et de *P. aeruginosa* sont répertoriées dans le tableau 1.

1. Assemblage des pili de type IV

Chez les *Neisseria*, l'essentiel des avancées substantielles sur la biogénèse des PT4 ont été élaborées par les groupes de V. Pelicic pour *N. meningitidis* et de M. Koomey pour *N. gonorrhoeae*. Chez les *Neisseria* l'information génétique codant pour le PT4 est regroupée en différents loci répartis sur l'ensemble du génome (Figure 13). Lorsque le support génétique n'est pas porté par un plasmide ou localisé au sein d'un îlot de pathogénicité, il est difficile d'estimer le nombre de gènes nécessaires à la biosynthèse des PT4. Cependant, le groupe de V. Pelicic a déterminé que vingt-trois gènes sont impliqués dans la biosynthèse et la fonctionnalité des PT4 chez le méningocoque (Pelicic, 2008).

Brièvement, les PT4 sont des longs polymères formés par l'assemblage de multiples sous-unités de la piline majoritaire. La piline PilE est synthétisée sous la forme d'un précurseur, la prépiline, qui est ancrée dans la membrane interne puis clivée par la prépiline peptidase PilD au niveau d'un court peptide signal dans la région N-Terminale. PilE, ainsi libérée dans le périplasm, est assemblée par l'ATPase cytosolique PilF en une fibre qui émerge ensuite à la surface par un pore de la membrane externe, constitué d'un complexe homo-dodécamérique de la protéine PilQ. Ces pili une fois allongés par l'ajout successif de sous-unités de PilE peuvent également être rétractés par le retrait de pilines. Ce mécanisme nécessite une deuxième ATPase, PilT. Une plateforme à la membrane interne composée de plusieurs protéines permet de faire le

N.m	P.a	Fonctions	localisation	pil		pil/pilT		Etapas
				P	A	P	A	
PiLE	PiIA	Piline majeure	MI, Fibre	-	-	-	-	Assemblage
PiIH	FimU	Pseudopilines	MI, Fibre?	-	-	+	-/+	Stabilité
PiII	PiIV	Pseudopilines	MI, Fibre	-	-	+	-	Stabilité / maturation
PiIJ	PiIW	Pseudopilines	MI, Fibre	-	-	+	-	Stabilité / maturation
PiIK	PiIX	Pseudopilines	MI, Fibre	-	-	+	-	Stabilité / maturation
PiID	PiID	Prétiline peptidase	MI	-	-	-	-	Assemblage
PiIF	PiIB	ATPase	Cytoplasme	-	-	-	-	Assemblage
PiIT	PiIT	ATPase	Cytoplasme	++	-/+	ND	ND	Rétraction
PiIU	PiIU	ATPase	Cytoplasme	+	+	+	+	Rétraction?
PiIT2		ATPase	Cytoplasme	+	+	+	+	Rétraction?
PiIG	PiIC	Plateforme de la MI	MI	-	-	+	-/+	Stabilité
PiIM	PiIM	Plateforme de la MI	Cytoplasme, MI	-	-	-	-	Assemblage
PiIN	PiIN	Plateforme de la MI	MI, périplasma	-	-	-	-	Assemblage
PiIO	PiIO	Plateforme de la MI	MI, périplasma	-	-	-	-	Assemblage
PiIP	PiIP	Plateforme de la MI	MI, périplasma	-	-	-	-	Assemblage
PiIQ	PiIQ	Pore	ME	-	-	-	-	Emergence
PiIW	PiIF	Stabilité du pore	ME	-	-	+	-	Stabilité/maturation
PiIZ	PiIZ	Fonction inconnue	Cytoplasme	-/+	-	+	-/+	Stabilité
PiIC1	PiIY1	Adhésine?	ME	-	-	+	-	Stabilité/maturation
PiIX		Pilines mineures	MI, Fibre?	+	-	+	+	Fonctions
PiIV		Pilines mineures	MI, Fibre?	+	-	+	+	Fonctions
ComP		Pilines mineures	MI, Fibre?	+	-	+	-	Fonctions

Tableau 1: Classification des différents gènes impliqués dans la machinerie des pili de type IV

Cette classification a été effectuée en analysant les phénotypes des simples mutants *pil* et des doubles mutants *pil/pilT*, tant au niveau de la piliation (P) que de la fonctionnalité des PT4 pour l'adhésion (A). Cette analyse a permis de classer les gènes en quatre catégories: protéines indispensables à l'assemblage et l'émergence des pili, la stabilité des pili, la stabilité/maturation des pili et la fonction/dynamique des pili (D'après Carbonnelle et al., 2006). Le rôle et la localisation de ces protéines sont indiqués dans ce tableau, ainsi que les gènes homologues impliqués dans la biosynthèse des PT4 de *P. aeruginosa*. MI=Membrane interne, ME=Membrane externe.

lien entre les moteurs moléculaires cytoplasmiques et la sécrétine PilQ présente à la membrane externe (Figure 14).

Les protéines impliquées dans la biogenèse des pili ont été classées en quatre catégories grâce aux phénotypes associés aux simples mutants *pil* et aux doubles mutants dans lesquels la rétraction est abolie par une mutation dans le gène *pilT* (Carbonnelle et al., 2006) (Tableau 1). Les protéines dont l'absence entraîne une perte de piliation non compensable par l'ajout de la mutation *pilT* sont alors considérées comme indispensables à l'assemblage des pili. D'autres protéines ne sont pas nécessaires à la biogenèse des pili, mais influencent la dynamique et la fonctionnalité de ces fibres. Les autres protéines sont nécessaires à la stabilité et/ou à la maturation des PT4 ; leur absence se traduit par une diminution importante de la piliation. En absence de rétraction, les souches déficientes pour les protéines nécessaires uniquement à la stabilité des PT4 synthétisent des pili fonctionnels, alors que les souches déficientes pour les protéines nécessaires également à la maturation des pili forment des pili non fonctionnels.

2. Rôle des composants de la machinerie des pili de type IV

a) La piline PilE

Les PT4 sont constitués d'une sous-unité protéique majoritaire, la piline PilE, codée par un seul gène chez la plupart des espèces. La quantité des PT4 retrouvée à la surface des bactéries est directement liée au niveau de transcription élevé de la piline, comme cela a été démontré chez les *Neisseria* en plaçant une copie du gène *pilE* sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'IPTG (Long et al., 2001).

i) Variation antigénique

Le gène *pilE* est soumis à variation antigénique permettant de faire varier la séquence de la piline. L'expression de nouveaux variants modulent les fonctions associées aux PT4 comme l'adhésion et l'agrégation (Nassif et al., 1993, Marceau et al., 1995, Virji *et al.*, 1992)(Nassif et al., 1993 ; Virji et al., 1992, Marceau et al., 1995). Elle pourrait également jouer un rôle dans l'échappement au système immunitaire de l'hôte.

Dans le génome de *N. meningitidis* et en aval du gène *pilE*, il existe plusieurs cassettes silencieuses ou pseudogènes nommés *pilS*. Ces cassettes ne contiennent pas de promoteur et ne

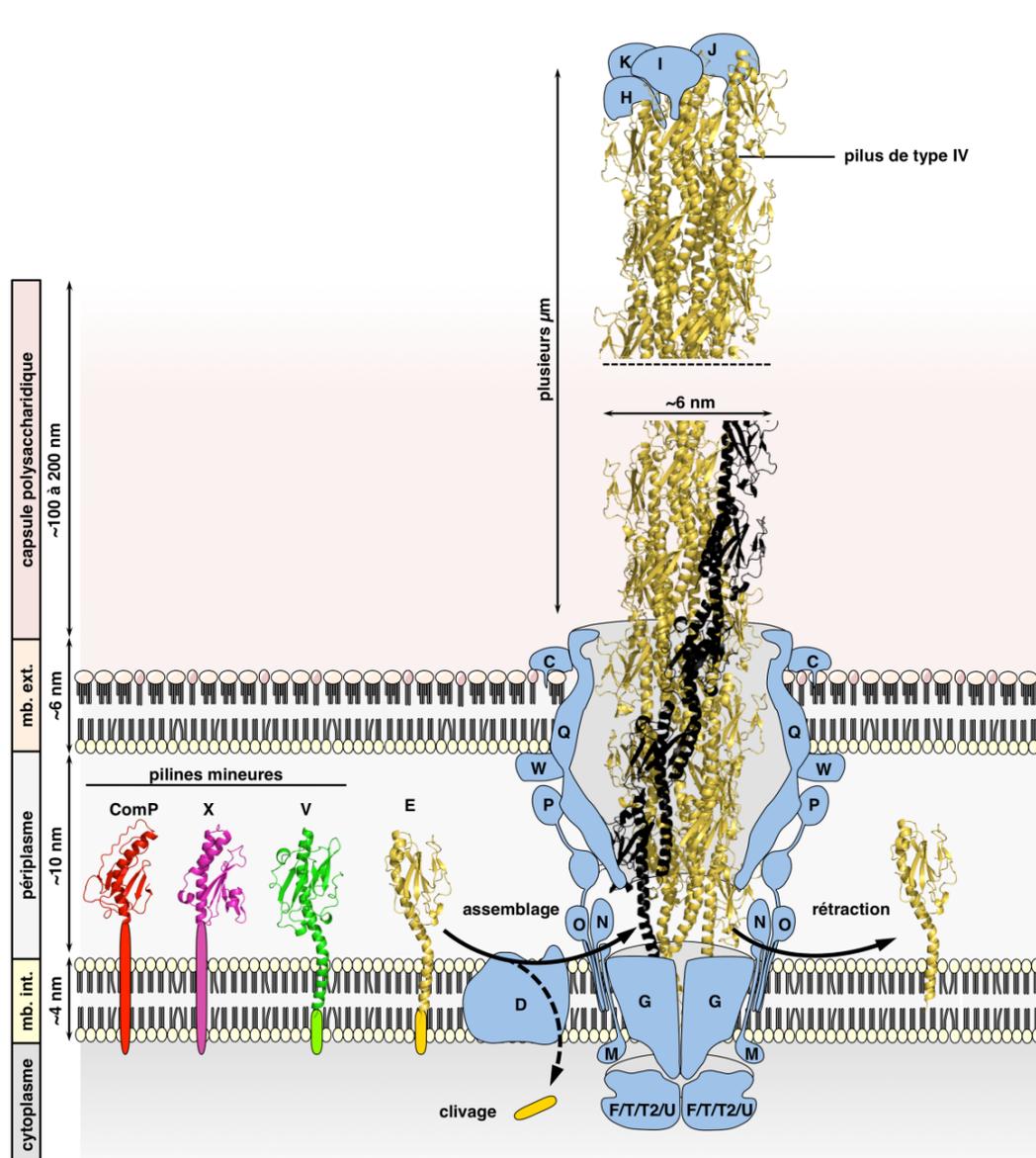


Figure 14 : Modèle de biogenèse des pili de type IV de *N. meningitidis*

Avant d'être assemblée en fibre, la piline PilE est clivée par la prépiline peptidase PilD. Les protéines PilM, PilN, PilO et PilP forment un complexe permettant de stabiliser et d'aligner les autres composants de la machinerie face à la sécrétine formée par l'oligomérisation PilQ. La protéine de la membrane interne PilG, quant à elle, permet de recruter les moteurs moléculaires PilF et PilT respectivement pour l'élongation et la rétraction des pili. PilT2 et PilU sont homologues à PilT et pourraient être également des moteurs moléculaires. Les pseudopilines PilH, PilI, PilJ et PilK et les pilines mineures PilV, PilX et ComP sont toutes clivées par PilD. Les pseudopilines permettent l'initiation de la biogenèse des pili et pourraient être localisées à l'apex du pilus. La protéine PilC, localisée à la membrane externe, est nécessaire pour l'adhésion des pili. La structure du pilus de *N. meningitidis* a été modélisée à partir du modèle du pilus GC (Chamot-Rooke et al., 2011).

sont donc pas exprimées. Elles servent de réservoir pour la conversion antigénique de la piline (Haas & Meyer, 1986, Swanson *et al.*, 1986). Chez le gonocoque, jusqu'à six copies silencieuses *pilS* ont été identifiées (Kallstrom *et al.*, 1997). La recombinaison entre le gène *pilE* et l'une des cassettes *pilS* permet de changer le variant de piline exprimé par une souche. Cette recombinaison est dépendante de l'activité de RecA (Kooimey *et al.*, 1987), cependant son mécanisme exact n'est pas connu chez *N. meningitidis*. Ce mécanisme de variation antigénique permet de modifier les régions de la piline les plus exposées de la fibre, puisque les copies *pilS* correspondent uniquement aux régions semi-conservées et hypervariables en C-Terminal (Figure 15A).

ii) Modifications post-traductionnelles

La piline PilE possède une caractéristique originale puisqu'elle est soumise à des modifications post-traductionnelles. Ces modifications sont transférées sur des résidus exposés en surface de la fibre, ce qui modifie les épitopes ainsi que les charges présentes en surface du pilus. L'addition de ces modifications a deux conséquences principales. Premièrement, elles peuvent moduler les fonctions associés aux PT4 comme l'adhésion ou l'agrégation (Marceau & Nassif, 1999, Forest *et al.*, 1999). Deuxièmement, il est probable que ces modifications participent à l'échappement au système immunitaire en modifiant les antigènes de surface (Parge *et al.*, 1995, Craig *et al.*, 2006).

Chez *N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis*, la sérine en position 63 porte selon les souches soit un DATDH (2,4-diacétamido-2,4,6-tridésoxyhexose), soit un GATDH (glycéramido-acétamido- tridésoxyhexose) (Virji, 1997, Chamot-Rooke *et al.*, 2007). Ces glycosylations sont transférées sur la piline grâce à l'action des enzymes codées par les gènes *gale* et *pgl* (*Piline glycosylation*) (Power *et al.*, 2003, Stimson *et al.*, 1995). D'autres types de MPT sont observées comme un groupement phosphate, une phosphorylcholine ou une phosphoethanolamine qui peuvent être portées par la sérine en position 68 chez *N. gonorrhoeae* (et S69 chez *N. meningitidis*). Tous ces groupements sont ajoutés par l'enzyme codée par *pptA* dans cette espèce (Aas *et al.*, 2006, Forest *et al.*, 1999, Hegge *et al.*, 2004, Warren & Jennings, 2003). L'ajout de certaines modifications n'a pas lieu en même temps pour toutes les bactéries, puisque certains gènes codant pour des enzymes impliquées dans ces modifications sont soumis à variation de phase, notamment *pptA* et *pglA* (Saunders *et al.*, 2000, Warren & Jennings, 2003). La variation de phase repose sur la présence de répétitions de simples nucléotides ou de tetra ou penta-nucléotides en tandem dans les séquences régulatrices ou la séquence codante du gène. Un allongement ou un rétrécissement de ces séquences par glissement de la polymérase lors de la

réplication ou de la transcription agit comme un interrupteur moléculaire permettant la commutation entre un état actif (phase ON) ou inactif (phase OFF) du gène (Davidsen & Tonjum, 2006) (Figure 15B).

b) La prépiline peptidase

La prépiline peptidase PilD, qui a été initialement caractérisée chez *P. aeruginosa*, est une des rares protéines de la piliation dont la fonction est parfaitement établie (Strom *et al.*, 1991, Strom *et al.*, 1993b, Nunn & Lory, 1991, Nunn & Lory, 1992). Cette enzyme bi-fonctionnelle, localisée au niveau de la membrane interne (Lory & Strom, 1997), clive la prépiline entre la glycine -1 présente dans le peptide signal et la phénylalanine +1, puis méthyle le premier résidu de phénylalanine de la forme mature ainsi obtenue. Cette maturation est indispensable à la piliation, puisque les souches mutées dans le gène *pilD* ne produisent aucun pili à leur surface (Carbonnelle *et al.*, 2006).

Le clivage du peptide signal et la *N*-méthylation sont deux réactions distinctes catalysées par deux domaines indépendants de la prépiline peptidase. Il est alors possible de bloquer la méthylation de la piline sans affecter son clivage par PilD par l'ajout d'inhibiteurs spécifiques (Strom *et al.*, 1993a). Cette méthylation est également abolie dans certains mutants de la piline dont les résidus phénylalanine +1 ou glutamate +5 ont été modifiés, malgré leur clivage efficace. L'activité de clivage, elle, peut être inhibée par la mutation de la glycine -1 dans la prépiline (Strom & Lory, 1991, Koomey, 2001). Alors que le clivage est indispensable à la piliation, la méthylation, quant à elle, n'est pas nécessaire pour l'assemblage des pili et pourrait protéger la piline contre d'éventuelles protéases (Strom & Lory, 1991, Pepe & Lory, 1998).

Chez *P. aeruginosa* et les *Neisseria*, il a été démontré que PilD est capable de cliver d'autres composants de la machinerie des PT4 malgré la présence de séquences signal assez dégénérées. C'est le cas pour les pseudopilines et les pilines mineures (Helaine *et al.*, 2005, Wolfgang *et al.*, 1999, Winther-Larsen *et al.*, 2001). Il a été démontré que la prépiline peptidase PilD de *P. aeruginosa* est active avec la même efficacité sur la piline du gonocoque lorsque celle-ci est transférée chez *P. aeruginosa*. Ceci souligne qu'il existe une grande conservation des machineries des PT4 tant sur un plan génétique que sur un plan fonctionnel. Toutefois, il semble qu'il existe une spécificité des prépiline-peptidases au niveau des PT4 de type IVa et de type IVb (de Bentzmann *et al.*, 2006).

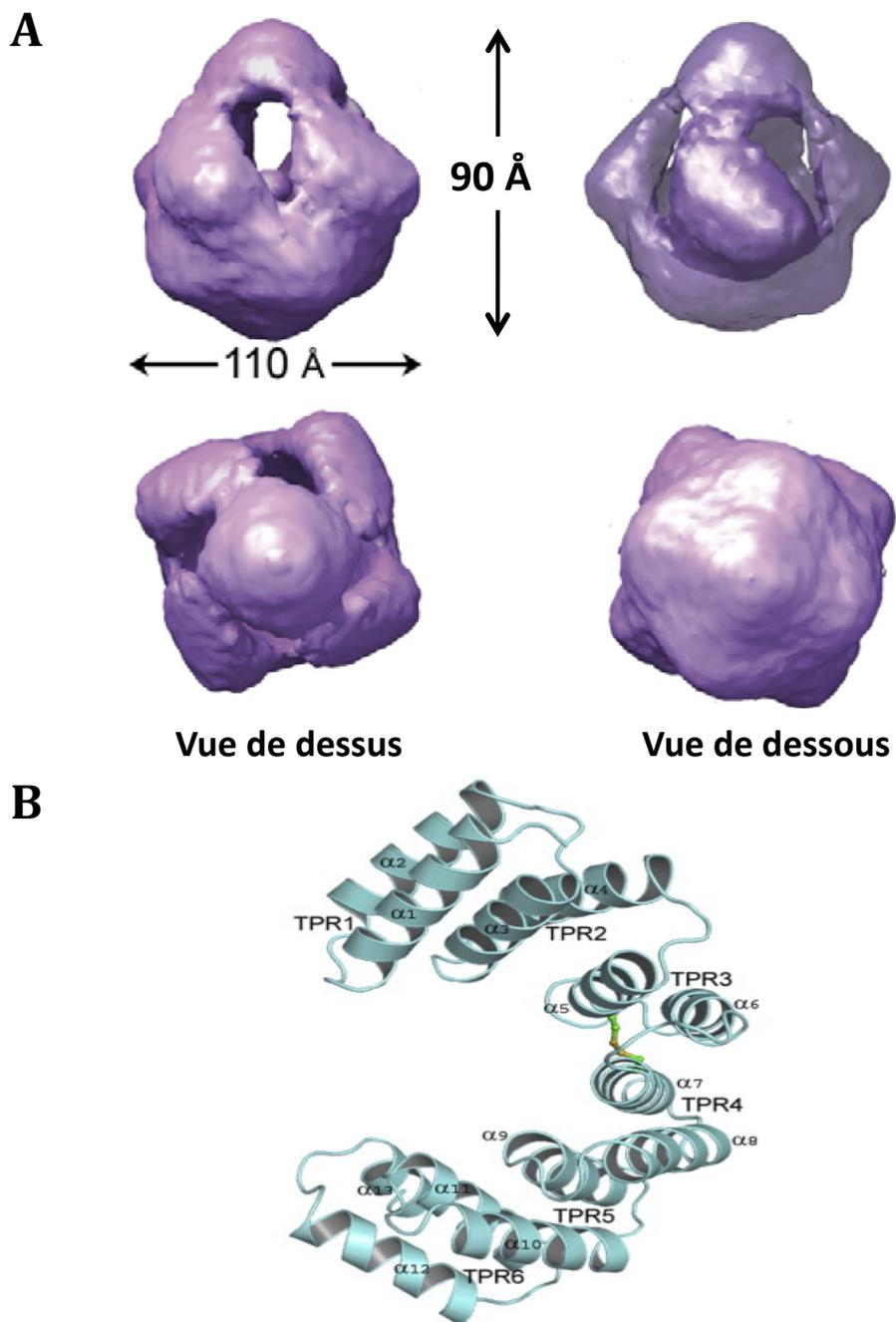


Figure 16 : Structure de la sécrétine PilQ et de son partenaire PilW

A. Reconstitution du volume de PilQ de *Neisseria* par Cryo-EM avec une résolution de 12 Å montrant une symétrie C4 du complexe. En haut à gauche et à droite, vue de profil. En bas à gauche, vue du dessus et en bas à droite, vue de dessous (Li and Craig, 2008).

B. Structure de la lipoprotéine PilW en représentation en ruban. La lipoprotéine PilW est constituée de 13 hélices α qui définissent 6 domaines TPR : TPR1 (α_1 , α_2), TPR2 (α_3 , α_4), TPR3 (α_5 , α_6), TPR4 (α_7 , α_8), TPR5 (α_9 , α_{10}), et TPR6 (α_{11} , α_{12}). Les domaines TPR3 et TPR4 sont stabilisés par un pont disulfure en vert (Trindade et al., 2008).

c) La sécrétine PilQ et son partenaire PilW

i) *Rôle de la sécrétine PilQ*

Le passage des PT4 au travers de la membrane externe des bactéries à Gram négatif s'effectue grâce à un pore constitué par un complexe multimérique très stable, résistant à la dissociation par la chaleur ou par le détergent SDS (Collins et al., 2003). Ce complexe est composé d'une protéine unique PilQ appartenant à la famille des sécrétines. Outre l'émergence des PT4, le pore formé par PilQ permet le transfert d'autres molécules à travers la membrane externe du méningocoque, notamment certains antibiotiques ou le bactériophage MDA (Bille et al., 2005, Zhao et al., 2005). La protéine PilQ est la protéine la plus abondante de la membrane externe chez les espèces *Neisseria*. Il a été estimé que cette protéine correspond à 13% des protéines totales purifiées à partir de la membrane externe chez le gonocoque (Newhall et al., 1980). Son absence se traduit invariablement par un défaut de piliation à la surface de la bactérie (Drake & Koomey, 1995). La présence du pore formé de dodécamères de PilQ n'est pas nécessaire à la synthèse de la fibre, mais indispensable à son extrusion (Drake & Koomey, 1995, Carbonnelle et al., 2006, Wolfgang et al., 2000). En absence de PilQ et de la rétraction des pili par une mutation dans le gène *pilT*, la fibre se formant dans la périplasme aboutit à la formation de protrusions membranaires chez *N. gonorrhoeae* (Wolfgang et al., 2000).

ii) *Structure de la sécrétine PilQ*

La taille du mutimère formé par PilQ a été estimée à 900kDa, ce qui est cohérent avec un complexe de 12 sous-unités de PilQ de 82kDa (Collins et al., 2001). La région C-Terminale de PilQ est très conservée parmi les protéines appartenant à la famille des sécrétines et permet la multimérisation de PilQ. En effet, des mutations ponctuelles dans cette région abolissent la multimérisation de PilQ (Helm et al., 2007). Cette région est exposée à la surface des bactéries et pourraient être une cible thérapeutique intéressante du fait de sa conservation entre les différents sérogroupes de *N. meningitidis* et de l'abondance de PilQ à la surface des bactéries (Haghi et al., 2012). La partie N-Terminale de PilQ, quant à elle, est moins conservée et pourrait participer à la coordination de la sécrétine avec le reste de la machinerie au niveau du périplasme (Bitter, 2003).

A ce jour, la structure de sécrétine la plus complète est celle du pore GspD du système de secretion de type II (SST2) de *V. cholera* dont la structure de la partie N-Terminale

périplasmique a été déterminée par cristallographie alors que la partie C-Terminale constituant le pore a été prédite par reconstructions basées l'observation d'images acquises en microscopie électronique du pore (Nouwen *et al.*, 1999, Korotkov *et al.*, 2009b, Reichow *et al.*, 2010). A l'heure actuelle, seules des reconstructions basées sur des images de microscopie électronique ont permis de définir le volume de la sécrétine PilQ des *Neisseria* (Figure 16A). Outre le fait que la sécrétine de *Neisseria* est formée par un tétramère de trimères identiques, ces analyses ont montré qu'elle présente une forme de « donut » d'une hauteur de 90 Å (Collins *et al.*, 2005). De plus, la largeur varie entre 30 et 100 Å le long de la cavité centrale (Collins *et al.*, 2001, Collins *et al.*, 2003). Le pore n'est donc pas assez large sur toute sa hauteur pour permettre le passage du pilus de 60 Å de diamètre, ce qui suggère que le complexe formé par PilQ n'est pas simplement un pore passif mais qu'il joue un rôle actif dans l'émergence des pili. En effet, il a été montré que les fibres de PT4 sont capables d'induire des modifications conformationnelles au niveau de PilQ. En étudiant la structure de la sécrétine, il a été observé que la cavité centrale s'élargit lorsqu'elle est occupée par un pilus (Collins *et al.*, 2005). D'autre part, la reconstruction du volume du complexe de PilQ basé sur l'analyse d'images de microscopie électronique par la méthode SPA (single-particule averaging) a montré que la morphologie de la sécrétine est altérée en absence de PilE, PilP et PilF (Jain *et al.*, 2011).

iii) La stabilité du pore nécessite la protéine PilW

La protéine PilW, lipoprotéine de 28 kDa attachée à la membrane externe, participe quant à elle à l'assemblage ou à la stabilisation de la sécrétine. En effet, en absence de PilW, la piliation est fortement réduite et il est difficile de visualiser les multimères de PilQ (Carbonnelle *et al.*, 2005). Ce défaut de piliation est partiellement restauré par l'addition d'une mutation dans le gène *pilT*, même si les multimères de PilQ ne sont toujours pas visibles. Ceci indique que PilW est important pour la stabilisation du multimère de PilQ mais pas indispensable. Cependant, les pili formés par le mutant *pilW/pilT* ne sont pas fonctionnels (Carbonnelle *et al.*, 2005). Outre la stabilité du pore, la protéine PilW semble être impliquée dans l'adhésion des bactéries, puisque des mutations ponctuelles abolissent l'adhésion, malgré la stabilité des multimères de PilQ (Szeto *et al.*, 2011). La structure de PilW et de son orthologue PilF chez *P. aeruginosa* ont été déterminées : cette protéine de classe *tout α* possède treize hélices α formant six motifs TPR (Tetratricopeptide repeat) connus pour être impliqués dans les interactions protéiques (Kim *et al.*, 2006, Trindade *et al.*, 2008) (Figure 16B). Contrairement au système de sécrétion de type II (SST2) de *E. coli*, pour lequel une pilotine PulS est requise pour l'insertion de la sécrétine PulD dans la membrane externe, aucune pilotine ne semble nécessaire chez le méningocoque (Carbonnelle *et al.*, 2005, Collins *et al.*, 2007).

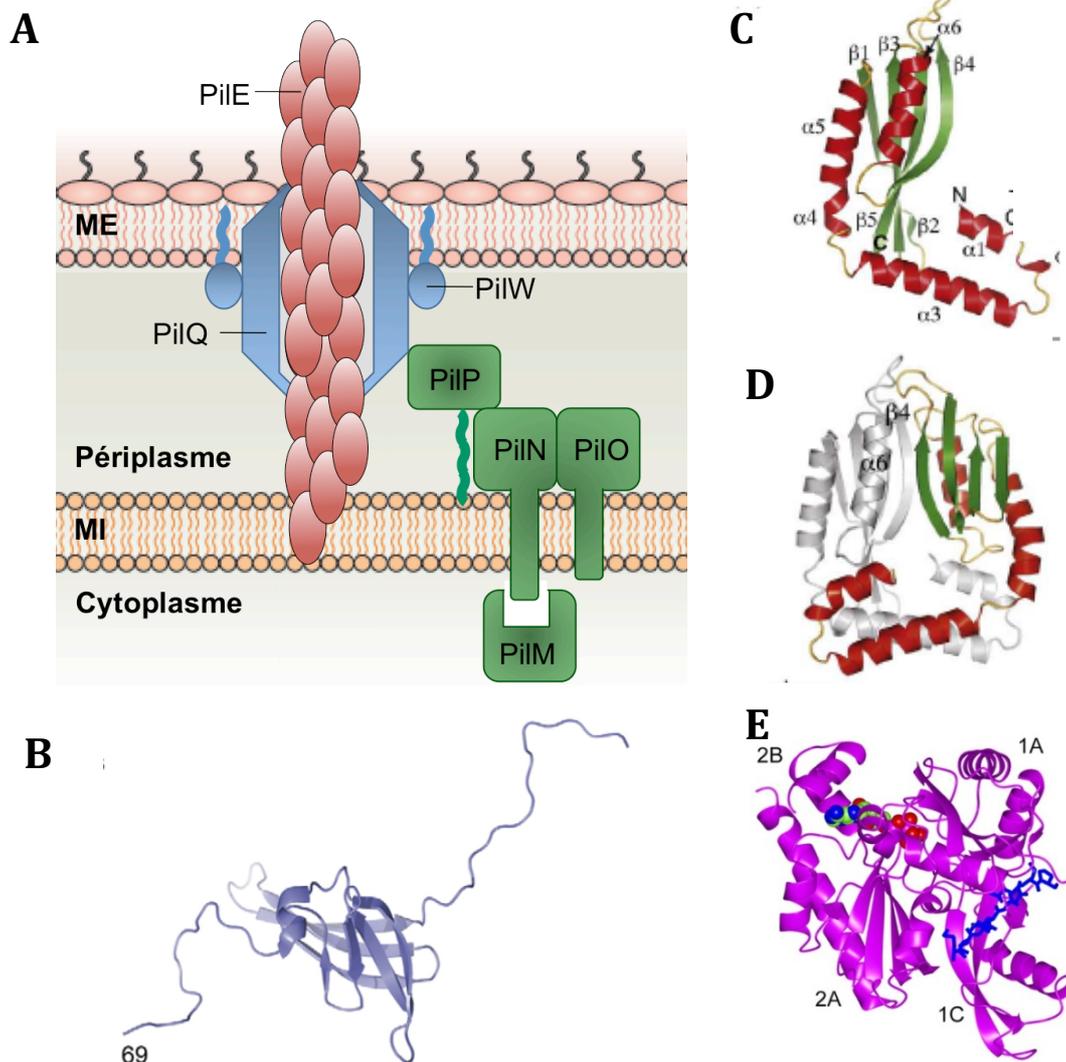


Figure 17 : Complexe de la plateforme de la membrane interne

A. Modèle du complexe de la plateforme de la membrane interne formé par PilM, PilN, PilO, PilP en interaction avec la sécrétine PilQ. Les protéines PilN et PilO forment un hétérodimère. La protéine PilP permet l'alignement entre ce complexe et la sécrétine PilQ, alors que la protéine cytosolique PilM interagit avec le complexe par l'intermédiaire de PilN. Schéma adapté de (Ayers et al., 2009). **B.** Structure de la lipoprotéine PilP Δ 68 (Golonavov et al., 2006). **C.** Structure de la protéine PilO Δ 68 déletée du domaine transmembranaire (Sampaleanu et al., 2009). **D.** Modélisation de l'hétérodimère PilO/PilN avec PilO Δ 68 en vert et rouge et PilN Δ 56 en gris. Les structures de PilO et PilN ont été déterminées chez *P. aeruginosa* (Sampaleanu et al., 2009). **E.** Structure de la protéine cytosolique PilM de *Thermus thermophilus* en magenta. Fixation de l'ATP en représentation sphérique et fixation du peptide N-Terminal de PilN en bleu (Karupiah et al., 2011).

d) La plateforme d'assemblage dans la membrane interne

Parmi les sept protéines indispensables à la biosynthèse des pili du méningocoque, les 4 protéines PilM, PilN, PilO et PilP sont nécessaires à l'assemblage des PT4 (Carbonnelle et al., 2006). Chez *P. aeruginosa*, il a été démontré que ces quatre protéines forment un complexe (Ayers et al., 2009). Ce complexe, très conservé au sein des espèces, formerait la plateforme d'assemblage du pilus au niveau de la membrane interne connectant le pore avec le reste de la machinerie (Nudleman & Kaiser, 2004, Pelicic, 2008) (Figure 17).

La protéine PilM est une protéine cytosolique de 42 kDa, alors que les protéines PilN et PilO sont des protéines ancrées à la membrane interne par leur segment transmembranaire et que PilP est une lipoprotéine de la membrane interne. La formation d'un complexe stable entre ces quatre protéines nécessite le respect de la stœchiométrie entre ces composants. En effet, l'absence d'une protéine PilN, PilO ou PilP déstabilise les autres partenaires du complexe (Georgiadou *et al.*, 2012, Ayers et al., 2009). A l'intérieur de ce complexe, PilM interagit avec le domaine cytosolique N-Terminal de PilN (Karuppiah & Derrick, 2011). Les protéines PilO et PilN, quant à elles, forment un hétérodimère par l'interaction de leurs segments transmembranaires et leurs régions périplasmiques (Sampaleanu et al., 2009) (Figure 17).

Chez *N. gonorrhoeae*, il a été montré que PilP permettrait la bonne localisation et la stabilisation de la sécrétine PilQ dans la membrane externe, jouant ainsi un rôle de pilote (Drake et al., 1997). Cependant, cette fonction a été exclue chez *N. meningitidis* où aucun défaut de multimérisation de PilQ n'a pu être observé chez la souche mutée dans le gène *pilP* (Balasingham *et al.*, 2007, Carbonnelle et al., 2005). La protéine PilP permettrait néanmoins de faire le lien entre les complexes de la membrane interne et la sécrétine de la membrane externe, permettant ainsi leur alignement (Tammam et al., 2011). En effet, chez *N. meningitidis*, les régions N et C-Terminals de PilP sont impliquées dans l'interaction entre PilP et PilQ (Balasingham et al., 2007). Il a été proposé que PilP puisse interagir avec les monomères de PilQ dans la membrane interne au niveau de la région N-Terminale, alors que le complexe PilN/PilO/PilP interagit avec les multimères de PilQ via la région C-Terminale de PilP (Tammam et al., 2011).

e) Les protéines PilC

La biogenèse des PT4 chez les *Neisseria* nécessite une protéine atypique, PilC. En effet, PilC ne présente qu'une identité de séquence très limitée avec la protéine PilY1 impliquée dans

la formation des PT4 chez *P. aeruginosa* (Alm et al., 1996b). Cette protéine a été largement étudiée, pourtant son rôle exact et son mode d'action ne sont pas encore clairement établis.

Cette protéine de 110 kDa, codée par deux allèles *pilC1* et *pilC2*, est nécessaire à l'expression des PT4 de *Neisseria*, puisque le mutant *pilC1/pilC2* n'est pas pilié (Jonsson et al., 1991). Cependant, cette absence de piliation dans un mutant *pilC1/pilC2* peut être compensée par l'introduction d'une mutation au locus *pilT*, indiquant un rôle de ces protéines dans la stabilité des fibres de PT4 (Carbonnelle et al., 2006). Chez *N. gonorrhoeae*, PilC1 et PilC2 semblent jouer la même fonction, puisqu'un simple mutant présente des caractéristiques phénotypiques sauvages (Jonsson et al., 1995). En revanche chez *N. meningitidis*, la situation est différente. En effet, un mutant *pilC2* présente un phénotype sauvage, alors qu'un mutant *pilC1* bien que pilié n'adhère pas aux cellules de l'hôte. La protéine PilC1 est donc également essentielle à l'adhésion (Nassif et al., 1994). Néanmoins, il semblerait que PilC2 soit également capable de participer à l'adhésion puisque la surexpression de PilC2 dans un mutant *pilC1* permet l'adhésion des bactéries sur des cellules épithéliales ME180 et uniquement sur ce type cellulaire. La protéine PilC1 permettrait donc l'adhésion de bactéries sur de nombreux types cellulaires, alors que PilC2 serait spécifique de l'adhésion des bactéries sur un nombre restreint de types cellulaires (Morand et al., 2001, Morand et al., 2009).

Les protéines PilC ont initialement été considérées comme les adhésines des *Neisseria*, du fait de leur rôle dans l'adhésion et de leur localisation. En effet, ces protéines ont été retrouvées dans les fractions enrichies en PT4 et ont même été localisées à l'apex de la fibre (Rudel et al., 1995). Cependant, la protéine PilC a été ensuite détectée dans la membrane externe et pourrait interagir plutôt avec la protéine PilQ (Rahman et al., 1997, Carbonnelle et al., 2005).

f) Les protéines liant l'ATP

Les pili sont des structures dynamiques, qui subissent des cycles alternatifs d'élongation par l'ajout d'une piline supplémentaire à la base du pilus et de rétraction, par le retrait de celle-ci. Ce processus est dépendant de l'ATP. Plusieurs protéines cytosoliques portent des motifs de fixation de l'ATP et permettent de fournir l'énergie nécessaire à cette dynamique et de la réguler. La régulation fine de cette dynamique joue un rôle important dans les fonctions des PT4.

Ces protéines appartiennent à la famille des AAA ATPases (ATPases Associated with various cellular Activities) qui sont retrouvées dans de nombreux organismes, autant chez les

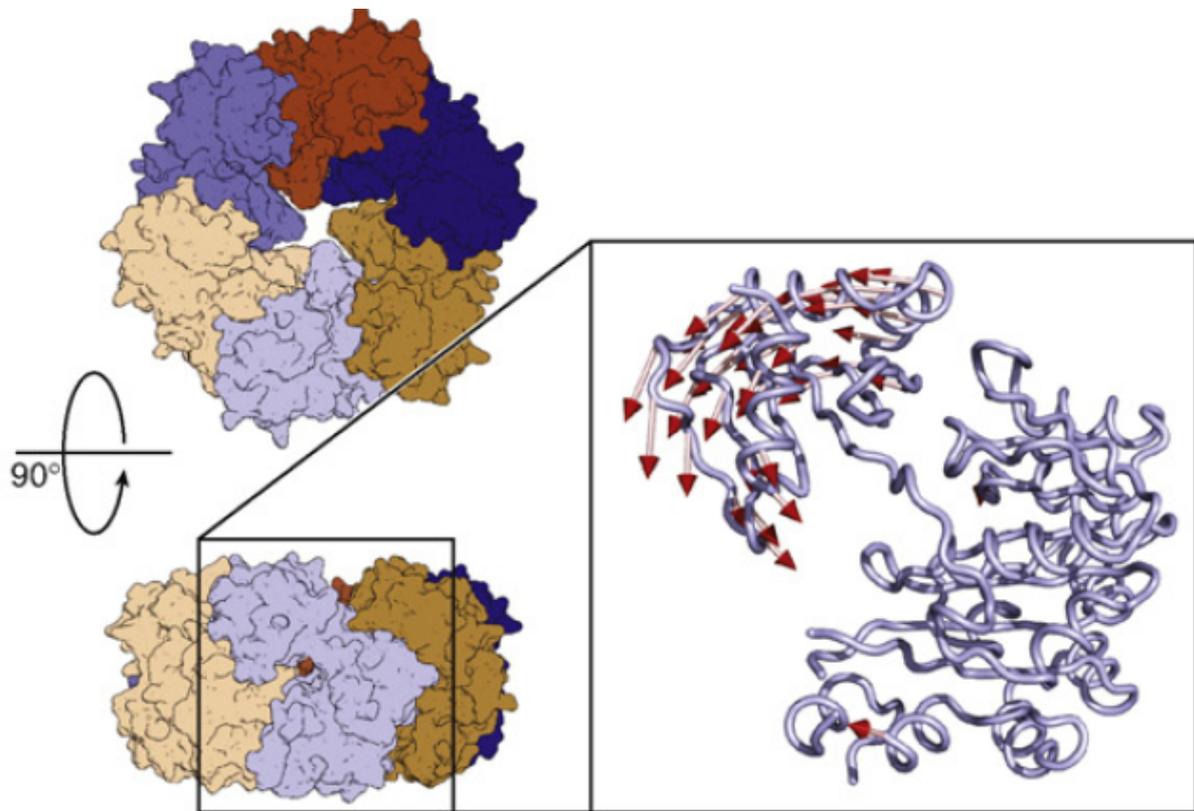


Figure 18 : Modèle pour la rétraction

Hexamère de PilT de *P. aeruginosa*. En haut, vue du haut et en bas, vue de côté. A droite, l'hydrolyse d'ATP induit un changement de conformation d'une sous-unité de PilT. Ce changement de conformation du moteur moléculaire PilT va agir sur le désassemblage des pilines soit directement à la base de la fibre des pili, soit par l'intermédiaire de la protéine de la membrane interne, PilG (Misic et al., 2010).

eucaryotes, que chez les procaryotes ou mêmes chez les archaebactéries (Vale, 2000). Ces moteurs moléculaires sont localisés dans le cytoplasme au contact de la membrane interne sous forme d'un complexe hexamérique en « anneau » (Brossay et al., 1994). Ces protéines sont caractérisées par des séquences consensus Walker de type A et B, une boîte Aspartate et une boîte Histidine localisées dans leur domaine C-Terminal (Walker *et al.*, 1982, Planet *et al.*, 2001). Des mutations dans ces motifs diminuent significativement l'activité ATPase de ces moteurs moléculaires (Jakovljevic *et al.*, 2008, Chiang *et al.*, 2008). Le motif Walker A et Walker B sont respectivement nécessaires à la liaison de l'ATP et à l'hydrolyse de l'ATP, alors que les boîtes Aspartate et Histidine sont situées autour du site catalytique où se fixe le ligand (Chiang et al., 2008). Il existe à l'heure actuelle la structure de six moteurs moléculaires dont PilT d'*Aquifex aeolicus* et de *P. aeruginosa* et le moteur du SST2 GspE (Satyshur *et al.*, 2007, Robien *et al.*, 2003, Misic *et al.*, 2010). Elles partagent toutes la même architecture en deux lobes distincts. Le domaine C-Terminal présente une structure similaire à RecA et le site de liaison à l'ATP se situe dans l'embranchement des deux domaines. On pense que le rôle de ces protéines dans la biosynthèse des PT4 est de fournir l'énergie nécessaire à l'élongation ou à la rétraction des pili. Il est proposé que la liaison et l'hydrolyse de l'ATP permettent un changement de conformation de ces enzymes fournissant l'énergie nécessaire à l'ajout ou au retrait d'une sous-unité de piline dans le pilus (Crowther et al., 2005). En effet, l'hydrolyse d'ATP induit un mouvement de rotation de 45° du domaine N-Terminal par rapport au domaine C-Terminal (Satyshur et al., 2007, Misic et al., 2010) (Figure 18).

i) La protéine PilF

Chez *P. aeruginosa*, l'inactivation de PilB, l'orthologue de PilF, ou l'altération de sa "Walker box", abolit la synthèse des PT4 (Turner et al., 1993). De même la protéine PilF, chez les *Neisseria*, est requise pour la biosynthèse des PT4 (Carbonnelle et al., 2006). Ainsi PilF pourrait fournir l'énergie nécessaire à l'élongation des PT4.

ii) La protéine PilT

PilT est directement responsable de la rétraction du pilus, que ce soit chez *Neisseria* ou *P. aeruginosa* (Wolfgang et al., 1998, Whitchurch *et al.*, 1991). Un mutant *pilT* présente un phénotype hyperpilié, suggérant qu'il ne rétracte plus ses pili (Whitchurch et al., 1991, Merz et al., 2000, Mattick, 2002). Outre les motifs détaillés précédemment, PilT possède en région C-terminale un motif conservé AIRNLIRE nécessaire à son fonctionnement (Aukema et al., 2005).

De nombreuses études se sont intéressées au mécanisme de rétraction des PT4 afin de déterminer la vitesse de rétraction et de mesurer les forces générées par de tels mouvements. Ainsi, PilT serait capable de désassembler environ 1500 unités de pilines par seconde générant alors une force d'environ 100pN par pilus (Burrows, 2005, Maier et al., 2002). Comme les autres membres appartenant à la famille des AAA ATPases, PilT forme des homo-hexamères ayant la forme d'un anneau (Satyshur et al., 2007, Forest *et al.*, 2004, Herdendorf *et al.*, 2002).

iii) Les protéines PilU et PilT2

Le gène *pilT* a deux paralogues dans le génome de *N. meningitidis* : *pilU* et *pilT2*. Bien que ces deux protéines possèdent des motifs Walker, leurs rôles ne sont toujours pas compris. Chez *P. aeruginosa*, les mutants *pilT* et *pilU* sont hyper-piliés et non motiles (Comolli et al., 1999, Whitchurch & Mattick, 1994). Cependant, ces protéines semblent assurer des fonctions différentes puisqu'un mutant *pilT* perd sa sensibilité au phage PO4 tandis qu'un mutant *pilU* y reste sensible (Whitchurch & Mattick, 1994). De plus, ces protéines présentent une localisation distincte chez *P. aeruginosa* où seul un pôle est pilié. Alors que PilT est retrouvée aux deux pôles de la bactérie, PilU est présent uniquement au pôle pilié (Chiang et al., 2005). Chez *Neisseria*, la situation est différente, puisqu'un mutant *pilU* ne présente que des défauts subtils. Il est ainsi difficile d'évaluer le rôle de PilU sur la rétraction des PT4. Ainsi chez *N. gonorrhoeae*, un mutant *pilU* ne présente pas de défaut de "twitching motility", ni de compétence, suggérant qu'il est parfaitement capable de rétracter ses pili (Park et al., 2002). Chez *N. meningitidis*, il a été montré qu'un mutant *pilU* adhère trois fois plus que la souche parentale, indiquant un impact négatif de PilU sur l'adhésion (Brown et al., 2010). De plus, une étude récente a mis en évidence un rôle régulateur de PilU sur la taille des microcolonies, ce qui suggère ainsi un rôle subtil de PilU dans la dynamique des PT4 (Eriksson et al., 2012). Cependant, il n'existe aucune preuve expérimentale qui valide cette hypothèse, puisque la motilité d'une souche *pilU* n'est que légèrement diminuée (Kurre et al., 2012).

En ce qui concerne la protéine PilT2, il a été montré que l'absence de cette protéine entraîne une augmentation de la piliation d'un facteur 2 par rapport à la souche parentale alors qu'un mutant *pilT* est lui sept fois plus pilié. De plus, la cinétique d'agrégation d'un mutant *pilT2* est accélérée et la motilité d'une souche *pilT2* est, elle, diminuée puisque la vitesse de motilité passe de 1,5µm/s pour une souche parentale à 1µm/s pour le mutant (Kurre et al., 2012, Brown et al., 2010). Une hypothèse a été proposée sur la fonction de PilT2 : cette protéine participerait à la rétraction des pili de manière synergique avec la protéine PilT. En absence de PilT2, les pili

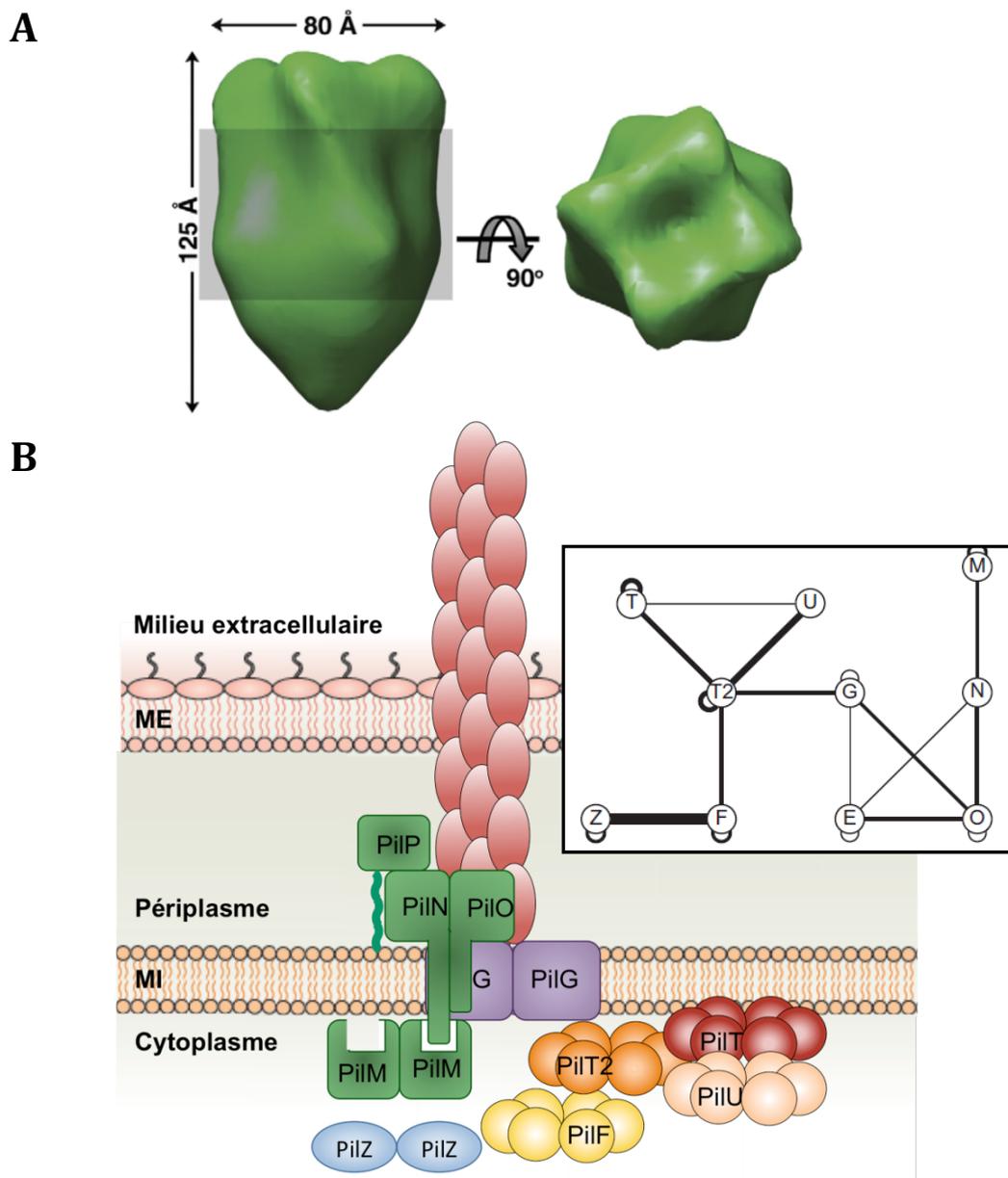


Figure 19 : Rôle de la protéine PilG dans la coordination entre la plateforme de la membrane interne et les moteurs moléculaires

A. Reconstruction du tétramère de PilG par cryo-EM. A gauche, vue de côté et à droite vue du haut. La zone grisée correspond à la membrane interne (Craig and Li, 2008). **B.** Modèle de la machinerie des PT4 basé sur l'analyse des doubles hybrides entre les composants de la machinerie. Ce modèle propose que la protéine PilG fait le lien entre la plateforme de la membrane interne formée par le complexe PilM/PilN/PilO/PilQ et les moteurs moléculaires. Dans ce modèle, seul PilT2 interagit avec la protéine PilG et pourrait réguler les moteurs moléculaires PilF et PilT. Schéma adapté de (Georgiagou et al., 2012).

seraient alors rétractés plus lentement, ce qui expliquerait l'hyper-piliation et l'hyper-agrégation d'un mutant *pilT2* (Brown et al., 2010).

L'existence de plusieurs ATPases intervenant dans la dynamique des PT4 requiert une régulation fine de chaque intervenant pour maintenir la présence et les fonctionnalités des PT4. Une récente analyse systématique par double hybride sur les protéines Pil a par ailleurs montré que les protéines PilT2 et PilU peuvent interagir avec l'ATPase PilT mais que seule la protéine PilT2 est capable d'interagir avec l'ensemble des ATPase PilF, PilT et PilU. La protéine PilT2 semble donc correspondre à une plaque tournante des ATPases et pourrait orchestrer le mode d'action de ces moteurs moléculaires (Georgiadou et al., 2012).

g) PilG et PilZ, rôle dans la transition assemblage/rétraction

La protéine PilG est une protéine de la membrane interne très conservée dans la machinerie des PT4 de différentes espèces (Pelicic, 2008). Cette protéine n'est pas essentielle à la biosynthèse des PT4 mais permettrait plutôt leur maturation et leur stabilité. En effet, l'absence de cette protéine aboutit à une diminution de la quantité de pili, compensable par l'insertion de la mutation *pilT*. Les pili formés dans ce contexte sont fonctionnels (Carbannelle et al., 2006). Cependant, le double mutant *pilG/pilT* ne présente pas le phénotype d'hyper-agrégation du mutant *pilT*, ce qui suggère un rôle de la protéine PilG dans la maturation des pili. Cependant chez *P. aeruginosa*, la protéine PilC, homologue de PilG, semble elle requise pour l'assemblage des pili, puisque le défaut de piliation du mutant *pilC* n'est pas restauré en absence de rétraction (Takhar et al., 2013). La protéine PilG de *N. meningitidis* a été exprimée et purifiée chez *E. coli*, ce qui a permis de définir un modèle structural basé sur des images de microscopie électronique. Ce modèle propose que PilG s'assemble en tétramère (Collins et al., 2007) (Figure 19A). Récemment, il a été montré par des expériences de double hybride que le domaine périplasmique de PilG interagit avec la piline PilE et avec PilO, un composant de la plateforme d'assemblage de la membrane interne, alors que le domaine cytoplasmique interagit avec PilT2 (Georgiadou et al., 2012). De plus chez *P. aeruginosa*, où la piliation s'effectue aux pôles de la bactérie, il a été observé que la localisation polaire de PilF n'était plus conservée dans un mutant *pilG*, suggérant un rôle de PilG dans le recrutement de l'ATPase PilF (Chiang et al., 2005). Ainsi, PilG permettrait de faire le lien entre les moteurs moléculaires cytoplasmiques et la plateforme d'assemblage de la membrane interne.

A

PilE	MNTLQKG	F T L I E L M I V I A I V G I L A A V A L P A Y Q D Y T A R A Q V S E A I L L A E G	Pilines mineures
PilX	MMSNKMEQKG	F T L I E M M I V V A I L G I I S V I A I P S Y Q S Y I E K G Y Q S L Y T E M V G	
PilV	MKNVQKG	F T L L E L M I A V A I L G I L T L I T I T Y P S Y K T Y I R R V R L S E V R T L L H	
ComP	MTDNRG	F T L V E L I S V L L I S V L A L I V P S Y R N Y V E K A K I N A V R A A L L E	Pseudo-pilines
PilH	MCTRKQQG	F T L T E L L I V M V I A A I M A M I A L P N S Q W I A S R R I A S H A E R I A N	
PilI	MKNND C F R L K N P Q S G	M A L I E V L V A M L V L T I G I L A L L S V Q L R T V A S V R E A E T Q T I V S Q	
PilJ	M R R K M L N V P K G S Y D G M K G	F T I I E F L V A G M L S M I V L M A V G S S Y F T S R K L N D A A N E R L A I Q Q	
PilK	M R K Q N T L T G I P T S D G Q R G	F A L F I V L M V M I V A F L V V T A A Q S Y N T E Q R I S A N E S D R K L A L S	

B

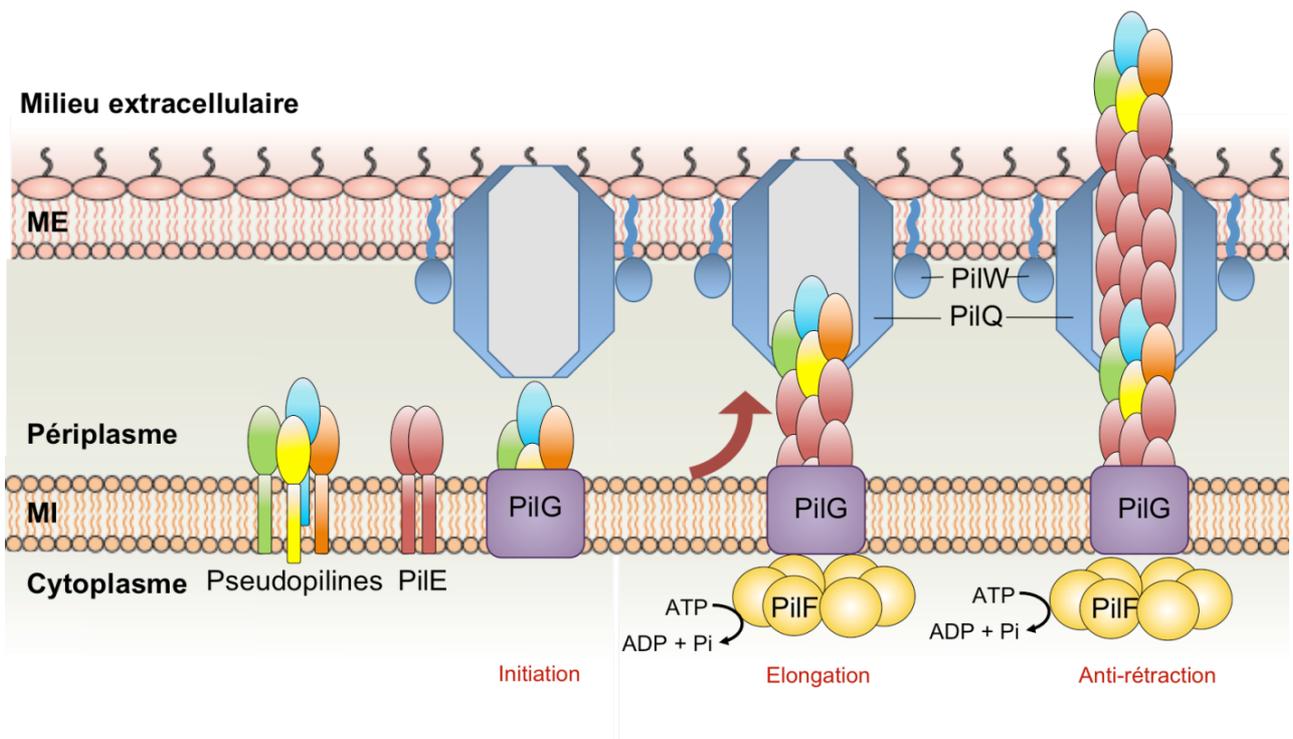


Figure 20 : Pseudopilines et pilines mineures

A. Alignement des pseudopilines et des pilines mineures de *N. meningitidis*. Les pilines mineures et les pseudopilines sont clivées par PilD entre la Gly-1 et la Phe+1 malgré la dégénérescence des séquences signal. Les résidus Gly-1, Phe+1 et Glu+5 sont conservés entre la piline PilE, les pseudopilines et les pilines mineures. **B. Modèle d'action des pseudopilines dans l'initiation et la stabilité des pili de type 4.** Les pseudopilines initialement ancrées à la membrane interne pourraient favoriser l'initiation de l'assemblage des PT4 et pourraient permettre la stabilité de ces fibres en s'incorporant dans la fibre naissante. Schéma adapté de (Giltner et al., 2010).

Une dernière protéine, PilZ, est nécessaire à la biogenèse des PT4 chez *N. meningitidis*. Cette protéine prédite comme étant cytoplasmique en contact avec la membrane interne est également très conservée. L'absence de cette protéine conduit à une réduction de la quantité de pili d'un facteur 2, à un défaut d'adhésion d'un facteur 100 et à l'absence d'agrégation. Cependant ces défauts sont compensés par l'absence de rétraction (Brown et al., 2010). Chez *P. aeruginosa*, l'orthologue PilZ est nécessaire pour la motilité par « twitching » et pour la biogenèse des pili (Alm et al., 1996a). De plus chez le phytopathogène *Xanthomonas axonopodis*, il a été montré, par une expérience de double hybride, que la région conservée de PilZ interagit avec XAC3239, l'orthologue de PilF (Guzzo et al., 2009). Cette interaction a également été mise en évidence chez *N. meningitidis* par double hybride (Georgiadou et al., 2012). Dans cette étude, aucune autre interaction avec la protéine PilZ n'a pu être mise en évidence. Cette interaction spécifique avec PilF pourrait permettre une régulation de cette ATPase et donc de la longueur du pilus en contrôlant la transition entre l'assemblage et la rétraction (Figure 19B).

h) Les autres pilines

La biogenèse des PT4 requiert d'autres protéines qui présentent les caractéristiques des pilines de type IV. Tout comme la piline, elles constituent des substrats pour la pré-piline peptidase et sont clivées entre un résidu glycine et un résidu phénylalanine qui est ensuite méthylé par cette même enzyme. Elles présentent également des homologies de séquence avec la région N-Terminale de la piline PilE, dont la présence d'un résidu d'acide glutamique en position +5 (Figure 20A). Du fait de ces similarités, elles pourraient donc être des composants mineurs des PT4, assemblés dans les filaments de la même manière que la piline PilE. Chez *P. aeruginosa*, il existe six pilines mineures, PilE, PilV, FimT, FimU, PilW et PilX (Russell & Darzins, 1994, Alm & Mattick, 1995, Davies et al., 1996, Alm et al., 1996b, Alm & Mattick, 1996), dont cinq sont requises pour la biosynthèse des PT4. Chez *N. meningitidis*, il existe sept pilines classées en deux catégories : Les protéines PilH, Pill, PilJ, PilK qui sont nécessaires à la biosynthèse des pili et les protéines PilX, PilV et ComP qui, elles, sont dispensables à la piliation. Le niveau d'expression de ces protéines étant plus faible que la piline majoritaire, le terme de pilines mineures est très souvent employé. Ici, nous utiliserons le terme de pseudopilines pour parler des protéines PilH, Pill, PilJ et PilK pour conserver le terme de pilines mineures pour PilV, PilX et ComP qui font l'objet de cette étude et qui seront décrites en détail dans une prochaine section.

Les quatre pseudopilines PilH, Pill, PilJ et PilK sont importantes pour la biosynthèse des PT4 car l'absence de l'une d'entre elles se traduit par une très nette diminution de la piliation, de 10 fois à 20 fois par rapport à la souche sauvage (Winther-Larsen *et al.*, 2005, Carbonnelle et al.,

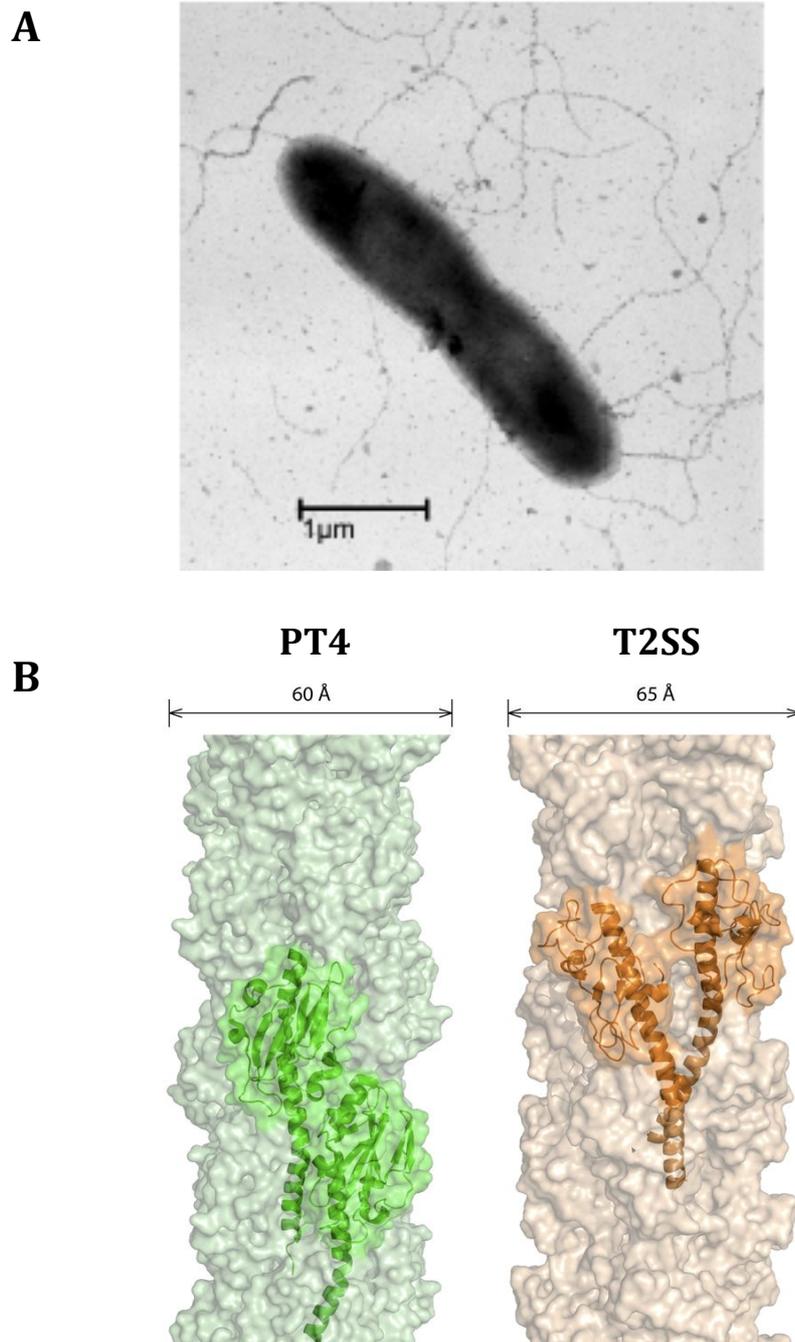


Figure 21 : Expression du pseudopilus du SST2 de structure similaire aux PT4

A. Microscopie électronique des pseudopili formés après surexpression de la pseudopiline majeure PulG. Comme les PT4, les pseudopili sont flexibles, longs de plusieurs microns et d'une épaisseur de 6,5nm (Vignon et al., 2003). **B.** Comparaison des modèles moléculaires du PT4 de classe a et du SST2 montrant un arrangement similaire des sous-unités (Giltner et al., 2012).

2006). Cependant, cet effet sur la piliation peut être compensé par une mutation supplémentaire dans le gène *pilT*, indiquant que ces protéines pourraient contrebalancer la rétraction et favoriser l'assemblage du pilus (Carbonnelle et al., 2006).

Chez le gonocoque, il a été montré que les pseudopilines sont effectivement clivées par la prépiline peptidase PilD et sont purifiées avec les pili (Winther-Larsen et al., 2005). Chez *P. aeruginosa*, il a été montré que la conservation de la stœchiométrie de ces protéines était nécessaire à la biogenèse des pili, suggérant ainsi la formation d'un complexe entre ces pseudopilines. Les pseudopilines ont été visualisées sur l'ensemble de la fibre des PT4, suggérant que ce complexe peut s'insérer dans la fibre déjà formée. De plus, par homologie avec les pseudopilines mineures du SST2, ce complexe pourrait également être retrouvé à l'apex du pili afin d'initier l'assemblage des pili (Giltner et al., 2010)(voir section suivante sur le SST2) (Figure 20B).

3. L'apport d'un système homologue, le système de sécrétion de type II

Les PT4 et le système de sécrétion de type II sont deux machineries homologues et partagent une même origine évolutive (Peabody *et al.*, 2003, Hansen & Forest, 2006). Présent dans de nombreuses bactéries Gram-négatives, le SST2 permet la translocation de protéines repliées depuis le périplasme vers le milieu extracellulaire à travers la membrane externe (Pugsley, 1992). Cette sécrétion fait intervenir la formation d'un pseudopilus périplasmique qui, en s'allongeant, pousserait l'exoprotéine vers le milieu extracellulaire. Parmi ces bactéries, on retrouve des pathogènes comme *V. cholerae*, les *EPEC*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella spp*, *Legionella pneumophila* et *Yersinia enterocolitica*.

Pour des raisons de clarté, les sous-unités majoritaires et minoritaires du SST2 sont toutes appelées pseudopilines, car elles ne sont pas naturellement assemblées en pili à la surface des bactéries comme c'est le cas pour les PT4. De plus, nous utiliserons la nomenclature Gsp (« General Secretory Pathway ») pour décrire les différents composants de ce système.

a) Pseudopilus et sécrétion

La similitude entre les machineries du SST2 et des PT4 a été remarquée très tôt et a conduit à l'idée d'un mécanisme commun. Ainsi de nombreux composants nécessaires au fonctionnement du SST2 sont retrouvés dans la machinerie des PT4. De plus, la machinerie du SST2 nécessite la présence de cinq pseudopilines qui possèdent les mêmes caractéristiques que les pilines de type IV notamment une séquence signal en N-Terminal clivée par la prépiline

Fonction	T4P (Nm)	SST2
(Pseudo)Pilule majeure	PilE	GspG
Pseudopilule (mineure)	PilH, PilI, PilJ, PilK	GspH, GspI, GspJ, GspK
Prépilule peptidase	PilD	GspO
sécrétine	PilQ	GspD
Plateforme de la MI	PilM/PilN, PilO, PilP, PilG	GspL, GspM, GspC, GspF
ATPase	PilF PilT, PilT2, PilU	GspE -
Stabilité du pore	PilW	GspS (+pilotine)

Système de sécrétion de type II

Pili de type IV

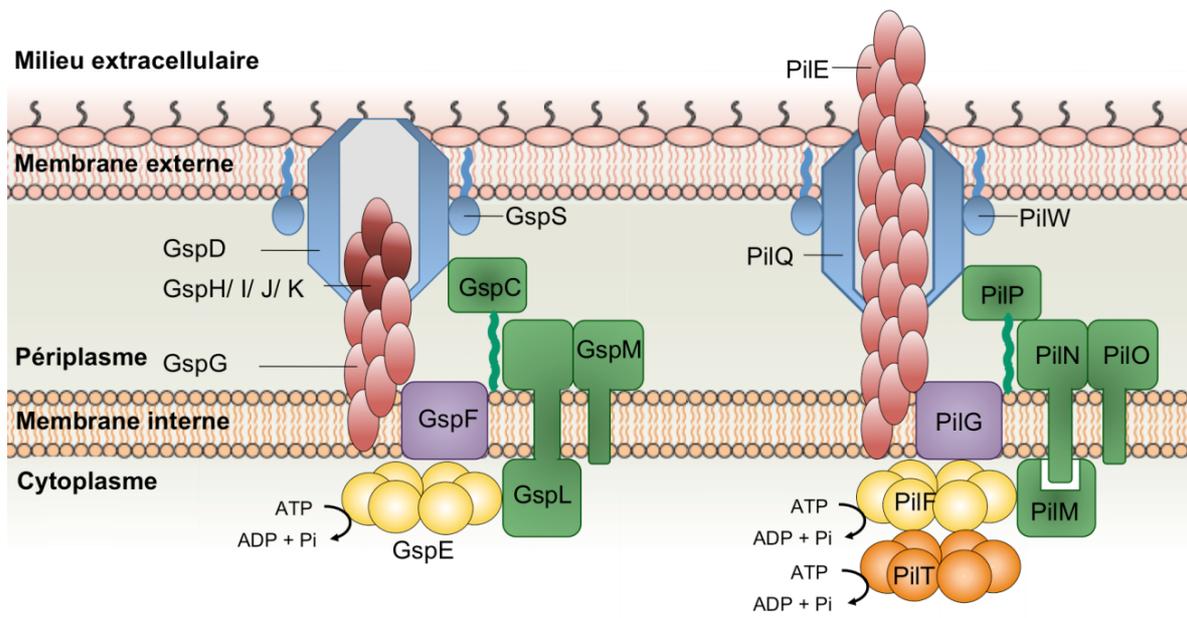


Figure 22 : Similarités entre les systèmes de piliation et de sécrétion de type II

La similarité entre les machineries des PT4 et du SST2 a été remarquée très tôt. En effet, ces machineries s'étendent sur les deux membranes et sont composées d'une sécrétine, d'un (pseudo)pilus qui s'assemble dans le périplasma, d'une plateforme de la membrane interne et des moteurs moléculaires cytoplasmiques. La plupart des composants du SST2 et du PT4 sont homologues. Certaines différences persistent. En effet, la protéine GspL du SST2 qui possède un domaine cytosolique, transmembranaire et périplasmique correspond au complexe du PT4 formé entre la protéine cytosolique PilM et la protéine de la membrane interne PilN. De plus, aucune ATPase de rétraction n'est connue pour le SST2. Enfin, la protéine GspS nécessaire à la stabilité du pore possède également un rôle de pilotine pour l'insertion de la sécrétine dans la membrane externe, rôle que ne possède pas PilW. MI=Membrane interne. Schéma adapté de (Korotkov et al., 2012).

peptidase GspO (Nunn & Lory, 1992, Bally *et al.*, 1992, Pugsley & Dupuy, 1992). Du fait de leur similarité avec les pilines de type IV, l'hypothèse selon laquelle les pseudopilines seraient assemblées en filaments périplasmiques, des pseudopili, fut émise (Hobbs & Mattick, 1993). Cette hypothèse a ensuite été validée par la formation de structure filamenteuse à la surface des bactéries suite à la sur-expression de la pseudopiline majeure, GspG (Pugsley, 1996, Sauvonnnet *et al.*, 2000). Ces filaments sont particulièrement similaires aux PT4, ils sont longs, flexibles et fins (environ 6,5nm d'épaisseur) et forment souvent des faisceaux. (Sauvonnnet *et al.*, 2000) (Figure 21). Dans les mêmes conditions de croissance et de surexpression, des pili sont assemblés par tous les SST2 testés (Vignon *et al.*, 2003).

A partir de cette découverte de la formation d'un pseudopilus, il a été proposé différents modèles d'action du SST2 pour la sécrétion. Le premier, celui du piston, repose sur des cycles d'assemblage et de désassemblage du pseudopilus permettant de pousser le substrat et de le transporter au travers de la sécrétine (Hobbs & Mattick, 1993, Shevchik *et al.*, 1997). Le pseudopilus s'assemblerait sous le substrat puis interagirait avec lui par son extrémité et permettrait la sécrétion par son élongation. Le deuxième modèle repose sur l'existence d'un pseudopilus de longueur stable qui tournerait sur lui-même pour faire remonter le substrat dans le sécréton (Hobbs & Mattick, 1993). Ce modèle a l'avantage de ne pas nécessiter de rétraction car aucune ATPase de rétraction, comme PilT pour les PT4, n'a été identifiée dans le SST2.

b) Relation fonctionnelle entre PT4 et SST2

La biogénèse du SST2 requiert des composants similaires à ceux des PT4. Le SST2 comprend une pseudopiline majeure, GspG, qui forme la fibre du pseudopilus, les pseudopilines GspH, GspI, GspJ, GspK qui sont nécessaires pour la formation du pseudopilus ou pour la sécrétion, une plateforme d'assemblage dans la membrane interne composée de GspC, GspF, GspL et GspM, le moteur moléculaire de l'assemblage qui fait partie de la famille des AAA ATPase, GspE et une sécrétine formée par la multimérisation de GspD au niveau de la membrane externe. La plupart des composants des SST2 présentent des homologies de séquence et des similarités de structure importantes avec les protéines composant le système de piliation de type IV (Figure 22A). Cette homologie de structure entre les deux machineries a également des conséquences fonctionnelles, puisque ces protéines sont capables de remplacer la fonction de leur protéine orthologue. De plus, il existe quelques systèmes hybrides entre le SST2 et les PT4. On retrouve ces systèmes hybrides pour les espèces *F. tularensis*, *Dichelobacter nodosus*, ou pour *V. cholerae* dont le PT4 permet la sécrétion d'un facteur de colonisation (Forsberg & Guina, 2007, Kirn *et al.*, 2003, Kennan *et al.*, 2001). Inversement, le pseudopilus peut également présenter des

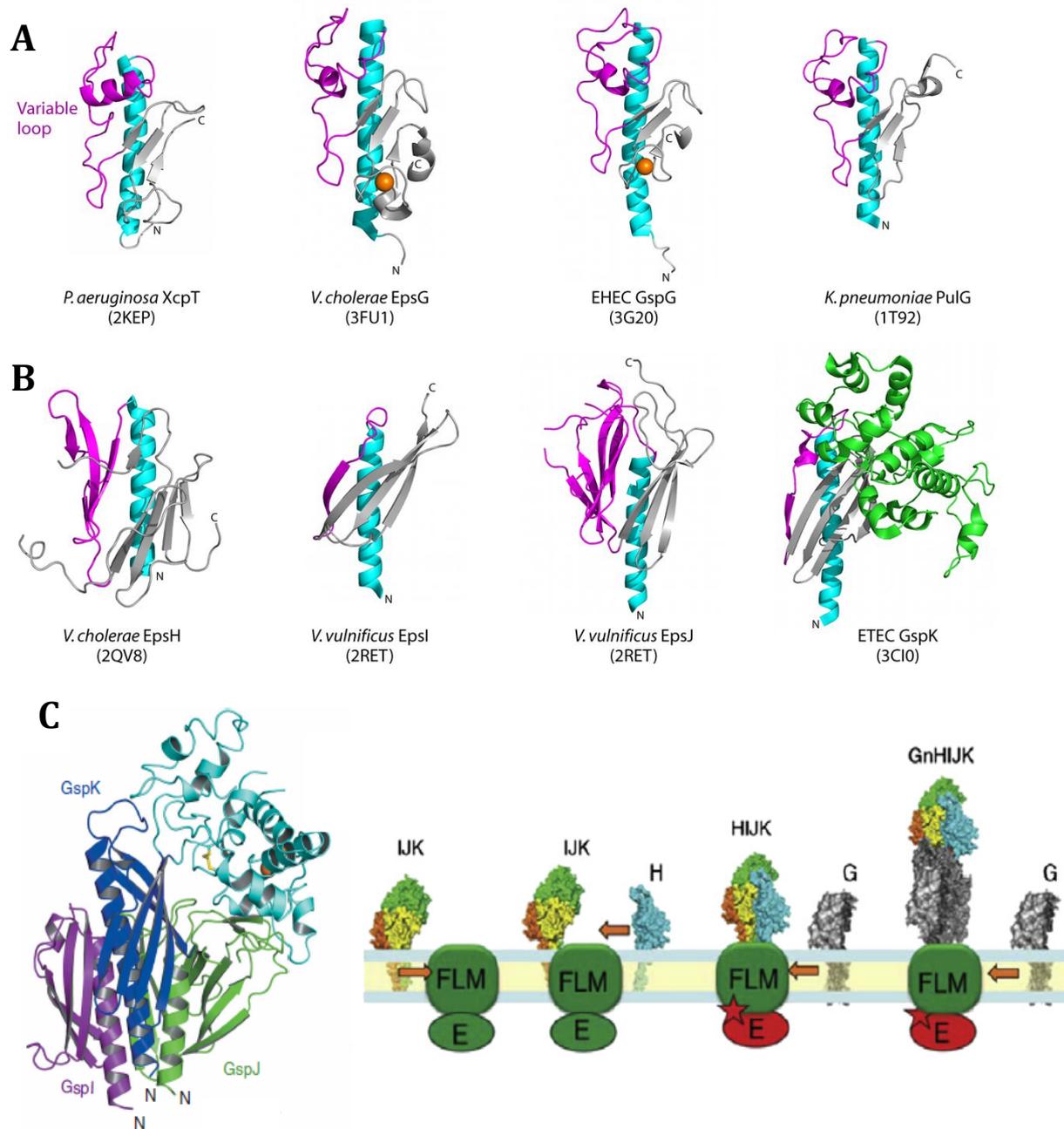


Figure 23 : Structures des pseudopilines du T2SS et rôle des pseudopilines mineures

A. Structure des pseudopilines majeures (Giltner et al., 2012). **B.** Structure des pseudopilines mineures (Giltner et al., 2012). **C.** A gauche, structure du complexe GspI/GspJ/GspK. La référence de la banque PDB est 3CIO (Korotkov et al., 2008). A droite, modèle d'action des pseudopilines mineures dans l'initiation du pseudopilus. Spontanément, les pseudopilines GspI, GspJ, GspK s'assemblent en complexe. La pseudopiline GspH interagit avec ce complexe et permet de connecter la pseudopiline majeure au complexe d'initiation (Campos et al., 2013).

fonctions dépendantes des PT4, comme l'attachement des bactéries sur une surface abiotique (Durand et al., 2003). Du fait de cette homologie structurale et phénotypique, il est envisageable d'extrapoler les connaissances entre les deux machineries.

i) La plateforme de la membrane interne

Le complexe PilM/PilN/PilO/PilP de la membrane interne est fortement homologue au complexe GspL/GspM/GspC retrouvé dans le SST2 (Robert *et al.*, 2005, Lybarger *et al.*, 2009). La protéine GspL est constituée d'un domaine cytoplasmique, d'un segment transmembranaire et d'un domaine périplasmique. La protéine PilM des PT4 est l'orthologue du domaine cytoplasmique de GspL, alors que la protéine PilN est l'orthologue du domaine périplasmique. Cette fusion de gènes est très caractéristique de gènes codant des protéines en interaction et indique que le mécanisme d'action des deux protéines PilM et PilN du PT4 nécessite leur interaction, ce qui a été confirmé expérimentalement (Karupppiah & Derrick, 2011, Sampaleanu et al., 2009) (Figure 22).

ii) Les pseudopilines

Le SST2 possède cinq pseudopilines dont la pseudopiline majeure GspG et les pseudopilines mineurs GspH, GspI, GspJ, GspK. Les structures tridimensionnelles des cinq pseudopilines révèlent une architecture similaire à celle des pilines de type IV (Craig et al., 2003, Keizer *et al.*, 2001) (Figure 23). Une hélice α N-Terminale d'une cinquantaine de résidus est partagée entre le segment transmembranaire N-Terminal (α 1N) et l'hélice amphiphile α 1C sur laquelle se replie un feuillet β à quatre ou cinq brins. Dans le cas du SST2, les pseudopilines ne portent pas de cystéines formant un pont disulfure dans leur région C-Terminale, mais présentent un site de fixation au calcium nécessaire à la stabilité de cette région (Korotkov *et al.*, 2009a).

Les pseudopilines mineures GspH, GspI, GspJ et GspK ont largement été étudiées dans le SST2, ce qui n'est pas le cas pour les PT4. Malgré une architecture similaire aux pilines mineures, une différence importante réside dans la région α/β . En effet, les pseudopilines H et J possèdent des feuillets β à quatre et cinq brins alors que la pseudopiline I n'a pas de domaine structuré dans cette région (Yanez *et al.*, 2008b, Yanez *et al.*, 2008a). Quant à la pseudopiline K, on retrouve un domaine *tout α* inséré entre les deux brins β 1 et β 2 (Korotkov & Hol, 2008). La structure de la pseudopiline K a été déterminée à partir d'un cristal du complexe

GspJ/GspI/GspK (Korotkov & Hol, 2008). Par la suite, il a été proposé que ce complexe trimérique se retrouve à l'apex du pseudopilus (Forest, 2008). Ces données structurales sont en accord avec les données expérimentales obtenues auparavant par co-immunoprécipitation et des expériences de Biacore. Ces expériences ont également montré que la pseudopiline GspH permettrait de faire le lien entre le pseudopilus formé de GspG et ce complexe trimérique (Kuo *et al.*, 2005, Douzi *et al.*, 2009). Récemment, une étude basée sur des analyses de doubles hybrides et de pontage disulfure entre les pseudopilines entières a permis de confirmer une fois de plus la formation d'un complexe GspI/GspJ/GspK. Cependant, l'absence de la pseudopiline GspH n'ayant pas d'effet drastique sur la piliation dans le SST2, il a été proposé que seul le complexe trimérique ait un rôle dans l'initiation et que la pseudopiline GspH, quant à elle, joue un rôle dans l'élongation du pseudopilus (Cisneros *et al.*, 2012a).

Qu'en est il pour les PT4 ? A l'instar du SST2, l'expression de PT4 à la surface des bactéries requiert les quatre pseudopilines PilH, PilI, PilJ et PilK ainsi que le respect de leur stœchiométrie, suggérant la formation d'un complexe (Winther-Larsen *et al.*, 2005, Carbonnelle *et al.*, 2005, Giltner *et al.*, 2010). De plus, il a été récemment démontré que les pseudopilines des PT4 pouvaient remplacer la fonction des pseudopilines mineures du SST2 dans l'initiation de l'assemblage du pseudopilus, indiquant un mode d'action similaire entre ces protéines (Cisneros *et al.*, 2012b). Cependant, chez *P. aeruginosa*, les pseudopilines ont été visualisées tout le long de la fibre des PT4 et il est proposé que ce complexe ne soit pas uniquement nécessaire à l'initiation des PT4, mais également pour empêcher la rétraction (Giltner *et al.*, 2010).

Du fait de son homologie avec les PT4, le SST2 représente une source d'informations importante pour mieux comprendre les mécanismes d'assemblage des PT4. Cependant, il demeure deux différences principales entre ces deux systèmes. Tout d'abord le SST2 ne possède aucune ATPase associée à la rétraction du pseudopilus. De plus, contrairement au SST2, l'expression de pili fonctionnels chez les *Neisseria* nécessite l'intervention des trois pilines supplémentaires ComP, PilX et PilV.

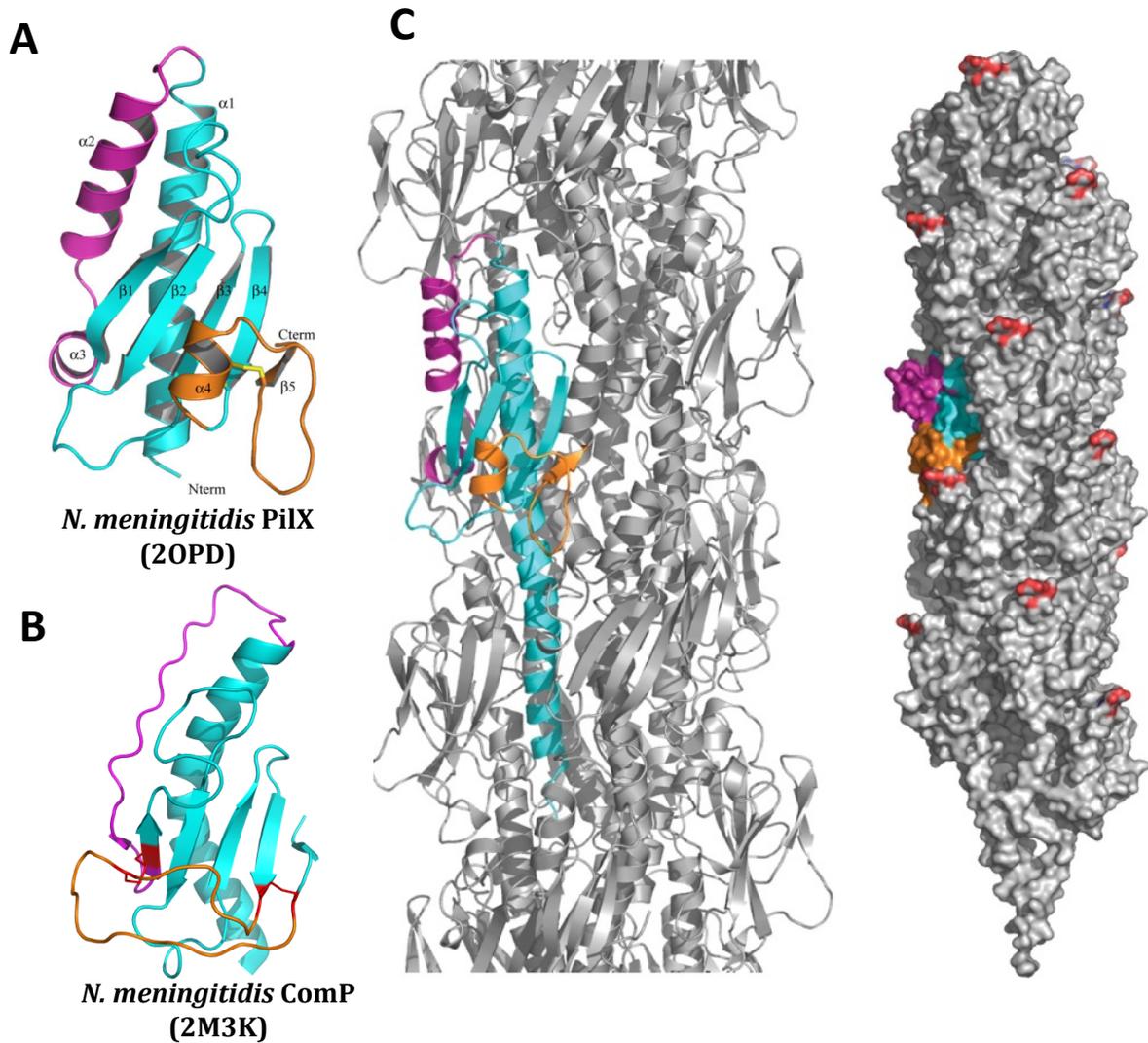


Figure 24 : Structures des pilines mineures PilX et ComP

A. Structure cristallographique de la piline mineure PilX. Les régions α/β sont en magenta et la région D en orange (Helaine et al., 2007). **B.** Structure cristallographique de la piline mineure ComP (Cehovin et al., 2013). Les régions α/β sont en magenta, la région D en orange et les quatre cystéines sont en rouge. **C.** Modélisation de l'incorporation de PilX (cyan, magenta et orange) dans les pili en gris. Représentation en ruban à gauche et en surface à droite (Helaine et al., 2007).

V. Rôles et modes d'action des pilines mineures

1. Caractéristiques et rôle des pilines mineures

Il existe trois pilines mineures chez *N. meningitidis*, PilX, PilV et ComP. Les gènes codant pour ces protéines sont dispersés dans le génome (Figure 13). Contrairement aux pseudopilines PilH/PilI/PilJ/PilK, l'absence des pilines mineures n'entraîne pas la perte de piliation mais semble jouer un rôle spécifique dans la modulation des propriétés des PT4. Chaque piline mineure semble promouvoir une fonction particulière des PT4. Ainsi, la piline mineure ComP est nécessaire pour la compétence, la protéine PilV pour la réponse cellulaire et la piline PilX joue un rôle crucial dans l'adhésion, l'agrégation et la réponse cellulaire.

a) Caractéristiques et structure des pilines mineures

Comme les pseudopilines, les pilines mineures présentent de nombreuses similitudes avec la piline majoritaire PilE. Elles possèdent toutes les trois en N-Terminal le peptide signal reconnu par la prépiline peptidase PilD et sont ainsi clivées par celle-ci. De plus, elles présentent une homologie avec PilE au niveau des trente premiers résidus, ainsi que deux cystéines en C-Terminal qui pourraient former un pont disulfure et délimiter une région D. Ces protéines ont été nommées pilines mineures en raison de leur faible taux d'expression par rapport à la piline PilE.

Parmi ces protéines, la structure de PilX a été déterminée par cristallographie à diffraction aux rayons X à partir d'une forme tronquée de ses vingt-huit premiers résidus correspondant à l'hélice $\alpha 1N$ (Helaine et al., 2007) (Figure 24). Cette étude confirme une structure similaire à celle des pilines de type IV: on retrouve en partie N-Terminale une hélice α accolée à la région globulaire qui est formée par un feuillet β constitué de quatre brins β , d'une région α/β contenant deux hélices α de courte taille et en partie C-Terminale d'une région D maintenue par un pont disulfure contenant une troisième hélice α . La structure de la piline ComP a récemment été résolue et révèle également une architecture semblable à celle des pilines de type IV. Cependant, ComP présente une particularité puisqu'elle possède quatre cystéines formant deux ponts disulfures entre les résidus Cys76-Cys125 et Cys118-Cys139 (Cehovin et al., 2013) (Figure 24).

b) Rôle de la piline mineure ComP

La première piline mineure étudiée a été nommée ComP (Competence associated prepilin) car elle est essentielle à la compétence pour la transformation d'ADN (Wolfgang et al., 1999). Cette protéine de 16 kDa présente une homologie de séquence avec plusieurs pilines de type IVa comme PilA de *P. aeruginosa* ou FimA de *D. nodosus*. Par contre, l'absence de ComP se traduit par une très nette réduction de la compétence pour la transformation, un mutant dans le gène *comP* étant 10 000 fois moins compétent qu'une souche parentale (Wolfgang et al., 1999). Bien que les raisons moléculaires ne soient pas connues, la capture d'ADN exogène nécessite la présence de la piline mineure ComP, contrairement à la fixation d'ADN (Aas et al., 2002b). Récemment, une interaction directe entre ComP et l'ADN a pu être démontrée et serait responsable de la compétence puisque les pili extraits dans un mutant *comP* lient l'ADN avec une efficacité nettement diminuée (Cehovin et al., 2013).

c) Rôle de la piline mineure PilV

La deuxième piline mineure PilV est impliquée dans la réorganisation de la membrane cellulaire (Mikaty et al., 2009, Winther-Larsen et al., 2001). En effet un mutant *pilV* est capable d'adhérer aux cellules mais perd la capacité à recruter les composants cellulaires au niveau de la plaque corticale et à induire la formation de projections. Seul 10 à 20% des microcolonies induisent le recrutement d'ézrine. De plus, même lorsque les microcolonies formées par le mutant *pilV* déclenchent une réponse cellulaire, la plaque corticale est totalement désorganisée et présente une structure en nid d'abeille imparfaite (Mikaty et al., 2009).

d) Rôle de la piline mineure PilX

Une dernière piline mineure a été identifiée chez *N. meningitidis* et chez *N. gonorrhoeae* nommée respectivement PilX et PilL (Helaine et al., 2005, Winther-Larsen et al., 2005). La protéine PilX est directement impliquée dans plusieurs phénotypes reliés aux PT4 : la formation d'agrégats bactériens, l'adhésion et également le déclenchement de la réponse cellulaire, ce qui rend son étude d'une importance capitale pour comprendre le mécanisme à l'origine de ces fonctions (Helaine et al., 2005, Brissac et al., 2012). En effet, un mutant *pilX* présente un défaut dans l'agrégation et l'adhésion sur cellules endothéliales et épithéliales similaire à celui d'une souche non piliée. Une souche *pilX* étant non adhérente, l'effet sur la signalisation n'a pu être observée que dans une souche SiaD-Opa⁺, non capsulée et exprimant les adhésines Opa à sa surface (Brissac et al., 2012).

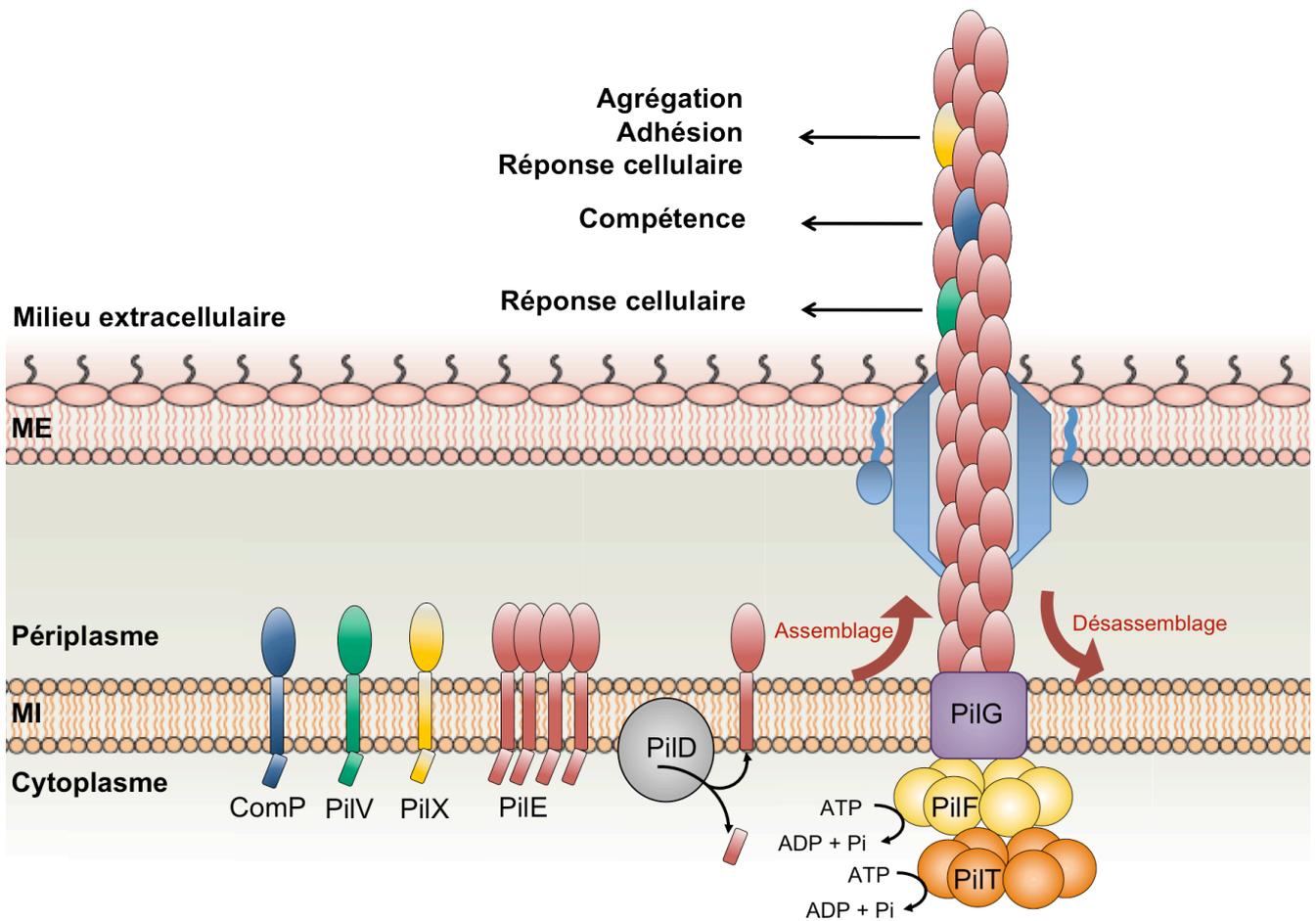


Figure 25 : Modèle dominant du mode d'action des pilines mineures

Les pilines mineures partagent une architecture globale similaire à la piline majeure et sont faiblement exprimées par rapport à la piline PilE. Elles sont clivées par la pré-pilino-peptidase PilD. Le modèle actuel prévoit que les pilines mineures s'insèrent au même titre que la piline majeure PilE mais en quantité plus réduite. Insérées dans les pili, les pilines mineures se retrouvent exposées à la surface des bactéries pour exercer leur fonction. L'agrégation serait permise par l'interaction entre deux pilines PilX présentes sur deux pili. La réponse cellulaire serait permise par une interaction directe de PilV avec le récepteur cellulaire β 2-adrénergique. La piline ComP pourrait, quant à elle, interagir avec l'ADN extracellulaire.

2. Mode d'action des pilines mineures

Bien que les fonctions des pilines mineures soient bien identifiées, leur mode d'action n'est pas encore connu. Il est possible que ces pilines jouent un rôle direct pour induire les fonctions des PT4.

a) Modèle dominant du mode d'action des pilines mineures

En raison de ces caractéristiques structurales et de leur rôle dans les fonctions des PT4, le modèle actuel prédit que les pilines mineures seraient insérées dans la fibre des PT4 au même titre que la piline majeure, mais en proportion plus réduite. Ainsi localisées, les pilines mineures exposées à la surface des bactéries pourraient interagir directement avec leur environnement, avec des molécules d'ADN pour ComP ou un récepteur cellulaire pour PilX et PilV (Figure 25).

Cette localisation a pu être démontrée pour la piline mineure PilX qui a effectivement été détecté tout le long de la fibre des PT4 par microscopie électronique (Helaine et al., 2007). De plus, la modélisation de l'insertion d'une protéine PilX dans la fibre des PT4, à la place d'une piline PilE, n'engendre pas de contraintes structurales (Helaine et al., 2007) (Figure 24). L'hypothèse actuelle présume que des interactions homotypiques PilX-PilX seraient responsables de l'agrégation bactérienne (Helaine et al., 2005). Cette interaction pourrait s'effectuer entre la région D de deux pilines mineures PilX présentes sur deux pili anti-parallèles. En effet, cette région D présente une structure en forme de « crochet » orienté vers le bas et la délétion de cette région D de PilX abolit sa fonction, malgré la présence de la protéine dans les préparations de purification de pili (Helaine et al., 2007). Cette interaction homotypique permettrait de stabiliser les interactions entre les pili et de lutter contre la rétraction des pili puisque des mutants *pilX/pilT* forment des agrégats (Helaine et al., 2005, Helaine et al., 2007).

Une étude récente a montré que la piline mineure ComP est capable d'interagir avec l'ADN et tout particulièrement avec les séquences DUS permettant la transformation d'ADN homotypique. Dans cette étude, il a aussi été montré que des pili purifiés dans une souche *comP* lient moins d'ADN que les pili provenant de la souche parentale, ce qui suggère que la piline mineure ComP s'intègre dans les pili et permet la fixation d'ADN (Cehovin et al., 2013).

Un rôle direct de la piline mineure PilV a également été proposé en utilisant le système de présentation du staphylocoque. Les colonies formées par des staphylocoques présentant des

protéines purifiées MBP-PilV sont capables d'induire le recrutement de protéines de la cellule hôte, ce qui n'est pas observé avec la protéine MBP-ComP (Coureuil et al., 2010).

b) Limites de ce modèle

Peu de preuves directes permettent de valider l'hypothèse selon laquelle les pilines mineures s'insèrent dans la fibre des PT4 et y sont exposées pour assurer leurs fonctions. D'autres informations suggèrent un mode d'action différent par lequel les pilines mineures n'auraient pas besoin d'être localisées à l'extérieur des bactéries pour jouer leurs fonctions.

L'hypothèse de la présence des pilines mineures PilX, PilV et ComP dans la fibre des PT4 repose principalement sur leur présence en très faible quantité dans la fraction des pili purifiés. Cette technique repose sur la dissociation, en milieu basique, des fibres de PT4 du corps bactérien en vortexant les bactéries pendant une minute, voire plus longtemps dans certains protocoles. Cette technique n'est pas spécifique et peut entraîner la précipitation de nombreuses protéines issues de la machinerie des PT4 sans qu'elles ne soient véritablement insérées dans la fibre des PT4 ni même présentes à l'extérieur de la bactérie. De plus, une étude récente n'a pu montrer ni d'effet des anticorps dirigés contre les pilines mineures sur les fonctions des PT4, ni d'effet bactéricide de ces anticorps, ce qui remet en doute la localisation externe des pilines mineures (Cehovin et al., 2011). Finalement, il a récemment été suggéré que la réponse cellulaire est dépendante d'un changement de la structure quaternaire des PT4. Ce changement de conformation a été détecté par la visualisation d'un épitope de la piline, normalement masqué par l'assemblage, qui devient accessible lors de l'infection des cellules, ce qui suggère un étirement des fibres (Biais et al., 2010, Brissac et al., 2012). Cet étirement n'est pas observé lors d'une infection par le mutant *pilX* qui n'induit pas la réponse cellulaire, ce qui pourrait indiquer un rôle intracellulaire de cette piline mineure dans la modulation de la conformation des PT4.

Par ailleurs, ce modèle ne rend pas compte de la relation fonctionnelle qui existe entre les pilines mineures. En effet, si chaque piline mineure semble exercer une fonction bien définie, elles peuvent également moduler quelque peu d'autres propriétés des PT4 qui ne sont pas permises par cette même protéine. Par exemple, la compétence est modifiée par l'absence des pilines mineures PilV et PilX. En effet, chez un mutant *pilV*, la fréquence de transformation est augmentée d'un facteur 40 dans le cas du gonocoque et d'un facteur 2 dans le cas du méningocoque en comparaison avec la souche parentale (Aas *et al.*, 2002a, Brown et al., 2010). Contrairement à PilV, la piline mineure PilX semble être nécessaire pour une compétence optimale puisque le mutant *pilX* présente une efficacité de transformation réduite d'un facteur

13 (Brown et al., 2010). De plus, l'adhésivité des bactéries est également modulée par la présence de la piline PilV qui semble nécessaire pour une adhésion optimale aux cellules. En effet, chez *N. gonorrhoeae*, un mutant *pilV* présente une diminution d'adhésion sur les cellules épithéliales d'un facteur 100 tandis que chez *N. meningitidis*, le mutant *pilV* présente un défaut d'adhésion sur les cellules endothéliales d'un facteur 10 (Brown et al., 2010, Winther-Larsen et al., 2001).

Bien que les composants moléculaires impliqués dans les différentes fonctions des PT4 soient identifiés, leur mode d'action et tout particulièrement celui des pilines mineures reste à élucider. Les pilines mineures jouent un rôle crucial sur l'ensemble des fonctions des PT4. Décrypter le mode d'action des pilines mineures semble donc indispensable pour comprendre comment une simple fibre exposée à la surface des bactéries est capable d'assurer autant de fonctions différentes et devient ainsi un puissant facteur de virulence. L'amélioration de notre compréhension d'une telle machinerie sera d'une importance capitale pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la lutte contre les nombreux pathogènes exprimant des PT4.

OBJECTIFS

Les PT4, certainement les organelles les plus répandues des bactéries à Gram-négatif, sont des machineries à multiples fonctions qui jouent un rôle crucial dans la pathogenèse de nombreux pathogènes humains. Chez *Neisseria meningitidis*, agent étiologique de septicémies et de méningites, ces organelles permettent un éventail de propriétés comme la motilité, l'agrégation, l'adhésion sur les cellules de l'hôte et le déclenchement des voies de signalisation, toutes indispensables à la colonisation efficace de l'hôte, ce qui rend l'étude du fonctionnement de ces fibres indispensable pour lutter contre les infections à *Neisseria* ou d'autres pathogènes.

L'expression de PT4 fonctionnels nécessite une machinerie complexe constituée de plus d'une vingtaine de protéines. Parmi ces protéines, les pilines mineures PilV, PilX et ComP jouent un rôle primordial dans la modulation des propriétés des PT4. Leur absence entraîne la perte de fonction de ces fibres alors qu'elle n'influence que très peu le niveau de piliation. Bien qu'on ait pu identifier génétiquement le rôle de chacune de ces protéines, leur mode d'action reste encore incompris. Décrypter leur mécanisme d'action est un enjeu fondamental pour améliorer nos connaissances sur le fonctionnement spécifique des PT4, rendant le développement de thérapies nouvelles et innovantes plus aisé.

Mes travaux de thèse ont eu pour objectif principal de comprendre comment une seule fibre est capable d'exercer autant de fonctions différentes en particulier en déterminant le mode d'action de ces pilines mineures. Je me suis tout particulièrement intéressée à PilV et PilX qui sont nécessaires à l'adhésion et à la formation de la plaque corticale et des projections membranaires, étapes clés de la colonisation de l'hôte par *N. meningitidis*. Pour y parvenir, nous avons dû répondre à de nombreuses questions. Quelle est la localisation des pilines mineures ? Sont-elles réellement insérées dans la fibre des PT4 ? Exercent-elles un rôle direct sur les cellules ? A quel niveau de la machinerie exercent-elles leurs fonctions ? Existe-t-il alors un lien fonctionnel entre les pilines mineures ?

J'ai ensuite réalisé une étude Structure/Fonction des ces protéines afin de caractériser les domaines intra-moléculaires de ces pilines responsables de leurs fonctions et de comprendre la spécificité de ces pilines mineures par rapport à la piline PilE avec qui elles partagent de nombreuses caractéristiques structurales.

En parallèle de ces travaux, j'ai eu l'occasion de participer à la caractérisation d'une modification post-traductionnelle subi par la piline PilE après le contact avec les cellules épithéliales humaines.

RESULTATS

Les pilines mineures PilV et PilX permettent les fonctions associées aux PT4 en modulant quantité de pili produits par la bactérie

La colonisation des vaisseaux est une étape cruciale dans l'établissement de la pathologie induite par *N. meningitidis* (Melican et al., 2013). Cette colonisation est un processus complexe qui nécessite les trois principales propriétés bactériennes que sont l'adhésion initiale d'une bactérie, l'agrégation entre les bactéries de la microcolonie et le remodelage de la membrane plasmique aboutissant à la formation de projections membranaires entre-lassées au sein de la microcolonie. L'ensemble de ces étapes de colonisation nécessite non seulement la présence de PT4 à la surface des bactéries, mais également la présence des pilines mineures PilV et PilX. En effet, le mutant n'exprimant plus la protéine PilV est capable d'adhérer aux cellules et d'agréger mais il n'induit plus le remodelage de la membrane plasmique (Mikaty et al., 2009). Le mutant déficient pour le gène *pilX* n'agrège pas, n'adhère pas aux cellules et ne recrute pas la plaque corticale (Helaine et al., 2005, Brissac et al., 2012).

Ces deux protéines sont donc indispensables pour la colonisation des vaisseaux par le méningocoque. L'hypothèse actuelle suggère que les pilines mineures sont insérées dans la fibre des PT4 au même titre que PilE mais en proportion plus réduite. Exposées à l'extérieur des bactéries, les pilines mineures pourraient agir par un mécanisme direct qui assurerait les fonctions associées aux PT4. Bien qu'il existe certains arguments en faveur de cette hypothèse, la question de leur mode d'action n'a pas encore été résolue. Nous avons donc cherché à comprendre comment ces protéines exercent leurs fonctions.

La première étape de ces travaux a consisté en la localisation des pilines mineures PilV et PilX. Pour y parvenir, nous avons généré des protéines PilV et PilX présentant trois peptides FLAG en C-Terminal. Ces protéines PilV-FLAG et PilX-FLAG permettent respectivement la complémentation des mutants *pilV* et *pilX*, indiquant leur fonctionnalité (Article, Figure S1). En immunofluorescence sur bactéries entières non perméabilisées, aucun marquage fibrillaire n'a pu être observé sur les souches exprimant des pilines mineures ainsi étiquetées en utilisant des anticorps monoclonaux anti-FLAG. Cependant, une certaine proportion de bactéries présente un marquage entourant le corps bactérien (Article, Figure 1). Nous pensons que ce marquage apparaît occasionnellement lors de nos préparations lorsque la membrane externe a pu se détériorer permettant le marquage de protéines périplasmiques. Pour s'en assurer, nous avons testé la localisation des protéines PilV-FLAG et PilX-FLAG dans une préparation de sphéroplastes, dans lesquelles la membrane externe est lysée. Par cette technique, nous

observons un marquage circulaire intense pour l'ensemble des bactéries, ce qui démontre une localisation périplasmiques des pilines mineures étiquetées (Article, Figure1). Nous avons ensuite mesuré la quantité de pilines mineures obtenues dans les préparations de PT4 extraits par cassure mécanique et précipités par le sulfate d'ammonium. Alors que dans ces conditions nous purifions 6% de la piline majeure PilE totale, seul 1% et 0.2% des protéines PilX et PilV sont respectivement associées aux PT4 (Article, Figure 1). L'ensemble de ces résultats indique que la majorité des pilines mineures est localisée dans le périplasma des bactéries.

Même si la majorité des pilines mineures reste dans le périplasma, nous ne pouvons pas exclure qu'une faible proportion des pilines mineures localisées dans la fibre des PT4 exercent leur fonction ainsi. Pour exclure cette possibilité, nous avons testé la fonctionnalité de pilines mineures fusionnées à la mCherry. Cette fusion avec une large protéine fluorescente permet de bloquer le passage éventuel des pilines mineures à travers le pore formé par PilQ et de visualiser les protéines. Les pilines PilE, PilV ou PilX fusionnées à la mCherry en C-Terminal présentent un marquage de type périplasmique, similaire au marquage des protéines FLAG (Article, Figure 2). Alors que la protéine PilE-mCherry ne permet pas de former des pili en surface des bactéries, les protéines PilX-mCherry et PilV-mCherry, quant à elles, restent fonctionnelles, indiquant clairement que les pilines mineures exercent leur fonction depuis le périplasma (Article, Figure 2).

La présence et la fonctionnalité des pilines mineures dans le périplasma suggèrent qu'elles exercent un rôle sur la biogenèse des PT4. Afin de répondre à cette problématique, nous avons quantifié la présence des PT4 dans les souches *pilV* et *pilX* par des expériences d'ELISA. Nous avons ainsi montré que les mutants *pilV* et *pilX* présentent respectivement 61% et 27% de pili par rapport à la souche sauvage. De plus, le double mutant *pilV/pilX* n'est presque plus pilié, suggérant que PilV et PilX possèdent des fonctions redondantes (Article, Figure 3). Nous avons ensuite démontré que les effets sur la piliation observés permettent d'expliquer les phénotypes des mutants *pilV* et *pilX*. En effet, en caractérisant une souche *pilF/PilFi* pouvant exprimer différentes quantités de pili à sa surface en fonction de la concentration d'IPTG, nous avons montré que l'ensemble des fonctions dépendantes des PT4 nécessite une forte quantité de PT4, soit au moins 40% pour l'agrégation et l'adhésion et 70% pour le déclenchement de la réponse cellulaire (Article, Figure 4).

Cette étude nous a permis de proposer un nouveau modèle pour comprendre le mode d'action des pilines mineures PilX et PilV. Contrairement à ce qu'envisageait le modèle dominant, les pilines mineures PilV et PilX exercent leur fonction dans l'espace périplasmique en modulant la quantité de pili exprimés à la surface des bactéries.

1 **High amounts of type IV pili are critical to mediate efficient**
2 **interaction of *Neisseria meningitidis* with host cells**

3 Anne-Flore Imhaus^{1,2}and Guillaume Duménil^{1,2,*}

4 ¹INSERM, U970, Paris Cardiovascular Research Center, Paris, F-75015, France

5 ²Université Paris Descartes, Faculté de Médecine Paris Descartes, Paris, F-75006, France

6

7 * To whom correspondence should be addressed.

8 Dr. Guillaume Dumenil

9 INSERM, U970, Paris Cardiovascular Research Center

10 56 rue Leblanc

11 Paris, F-75015, France

12 Tel: **+33 1 53 98 80 49**

13 Fax: **+33 1 53 98 79 53**

14

15 Email: guillaume.dumenil@inserm.fr.

16

17

18 Running title: PilV and PilX minor pilins fine-tune type IV pili biogenesis

19

19 **Abstract**

20 As mediators of the interaction of *Neisseria meningitidis* with host cells, type IV pili are at the
21 heart of the infection process. It is still poorly understood how these filamentous structures
22 composed predominantly of one structural protein, the major pilin, mediate such diverse
23 functions as adhesion, autoaggregation and crosstalk with host cells. Previous studies have
24 implicated two minor pilins, PilX and PilV, as specific effectors of these functions and it was
25 proposed that they exert their function by being displayed on the pilus structure. In contrast
26 with this hypothesis we found that the majority of PilV and PilX are located in the periplasm
27 rather than being associated with pili. Furthermore, mutations in *pilX* and *pilV* exhibited a
28 decrease in piliation and a *pilXpilV* double mutant exhibited a drastic reduction in piliation in
29 favor of a role in pilus biogenesis. To confirm a periplasmic site of action minor pilins were
30 anchored at this site by fusing the proteins with the mCherry protein. Despite this fusion PilV
31 and PilX continue to carry out their functions normally. Finally, by modulating the amount of pili
32 through the regulated expression of the PilF ATPase that powers pilus biogenesis we show that
33 the phenotypes of the *pilV* and *pilX* mutants can be recapitulated by modest reductions of the
34 amount of pili. PilV and PilX thus modulate type IV pili dependent functions by interacting with
35 the periplasmic piliation machinery and fine-tuning the amount of pili displayed on the bacterial
36 surface.

37

37

38 **Introduction**

39 Type IV pili are filamentous organelles found on the surface of a large number of
40 bacterial species among which several are pathogenic (Pelicic, 2008). They can be found in
41 different groups of proteobacteria in species such as *Vibrio cholera*, enteropathogenic
42 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Neisseria spp.* More recently they were also found
43 in firmicutes such as *Clostridium perfringens* illustrating the wide distribution of this structure
44 (Varga et al., 2006). Type IV pili are part of a larger group of bacterial structures. It is
45 increasingly clear that type II secretion systems share several features with type IV pili (Giltner
46 et al., 2012). Competence systems and flagella in archaea also appear to function with common
47 mechanisms. Type IV pili and related structures are thus one the building blocks in the archeal
48 and bacterial world.

49 The wide variety and the importance of functions carried out by type IV pili are
50 exemplified by *Neisseria meningitidis*. In 5 to 30% of the total human population *N. meningitidis*
51 thrives in the human nasopharynx without triggering any damage (Caugant et al., 1994). DNA
52 exchange between different *N. meningitidis* strains occurs in the throat via the natural
53 transformation properties mediated by type IV pili (Weyand et al., 2013). Bacteria proliferate in
54 bacterial aggregates referred to as microcolonies tightly associated with the epithelial surface
55 (Stephens et al., 1983). *In vitro* studies indicate that both adhesion to epithelial cells and
56 autoaggregation are mostly mediated by type IV pili. From this site, bacteria can occasionally
57 access the bloodstream and trigger septic shocks and meningitis. In the circulation bacteria bind
58 to the endothelium and proliferate often filling the vessel lumen(Guarner et al., 2004; Mairey et
59 al., 2006). A recent study involving a humanized model of infection pointed to the importance of
60 type IV pili in the ability of the bacteria to adhere to human vessels and to trigger vascular
61 damage (Melican et al., 2013). During adhesion to endothelial cells an intense crosstalk is
62 engaged by type IV pili that leads to the reshaping of the host cell plasma membrane with the
63 formation of filopodia-like protrusions (Eugene et al., 2002). Type IV pili are therefore involved

64 in numerous steps of the *N. meningitidis* infection process in particular those involving
65 interaction with the host cells.

66 Type IV pili are composed of one main component, the major pilin, PilE in *Neisseria spp.*
67 This protein composed of two domains, a hydrophobic alpha helix and a beta sheet head,
68 assembles in a helical fiber with the alpha helix buried inside the center of the structure (Parge
69 et al., 1995). Determining how this structure carries out such diverse functions remains a central
70 challenge and requires a better understanding of its biogenesis. Systematic genetic studies
71 revealed that building a fully functional type IV pilus requires over 20 proteins (Brown et al.,
72 2010; Carbonnelle et al., 2006), which take part in a complex lodged in both the inner- and
73 outer-membrane. Although certain functional complexes among these different proteins are
74 starting to emerge the function of most of these proteins is unknown (Georgiadou et al., 2012).
75 After translocation to the periplasm via the general secretion pathway pilins are cleaved by the
76 PilD peptidase (Lory and Strom, 1997). The major pilin assembled in fibers in the periplasm exit
77 the outer membrane through a pore composed by the PilQ secretin (Wolfgang et al., 2000). An
78 important aspect of the system is its dynamic properties and the system is powered by several
79 ATPases, which either provide the energy for the extension of the pili fibers or for its retraction.

80 A subclass of proteins referred to as minor pilins in *Neisseria meningitidis* (PilX, PilV and
81 ComP) are unique in that they confer specific functions to the pili (Brown et al., 2010). These
82 proteins are also termed minor pilins because they share structural features with the major
83 pilin. These proteins are in the same range of size as the major pilin, contain a hydrophobic
84 amino terminal alpha helix and a carboxy terminal disulfide bond. The corresponding mutants
85 loose certain functions but still display type IV pili on their surface and maintain certain
86 functions. Because type IV pili are still expressed by the corresponding mutants these genes
87 were qualified as “accessory” to pili biogenesis (Brown et al., 2010). In the absence of PilX
88 bacteria fail to aggregate and adhere to host cells although they maintain competence (Helaine
89 et al., 2005). In the absence of the ComP minor pilin competence is lost but pili are otherwise
90 functional (Wolfgang et al., 1999). Finally, the *pilV* mutant adheres to host cells and is competent

91 but fails to trigger plasma membrane reshaping upon bacterial adhesion (Mikaty et al., 2009). An
92 attractive hypothesis is that these minor pilins are localized in the pilus fiber to carry out their
93 effect. In this view such minor pilins are of central importance in pilus biology as they are the
94 “effectors” of this complex organelle. A number of reports have provided arguments in favor of
95 this hypothesis. In particular, PilX was detected by immuno-electron microscopy associated with
96 type IV pili. The crystallographic structure of PilX showed the presence of a hook that could
97 explain its role in aggregation by a homodimerization process (Helaine et al., 2007). In addition,
98 the purified globular domain of PilV coated on the surface of beads was sufficient to trigger the
99 accumulation β 2-adrenergic receptor under the beads suggesting a direct role in triggering its
100 effects on cells (Coureuil et al., 2010). In the case of ComP, the purified globular domain was
101 recently shown to directly interact with DNA in a sequence specific manner (Cehovin et al.,
102 2013).

103 Although the genetic evidence is compelling questions remain concerning the mode of
104 action of these proteins. First in terms of location, pilus association was addressed by electron
105 microscopy in the case of PilX but not for the other two minor pilins. In addition, location of a
106 proportion of the protein at a given site does not necessarily imply that this is the site of action.
107 Furthermore, evidence suggests that PilX could have a global effect on the conformation of the
108 pili suggesting a possible indirect impact on pilus function (Brissac et al., 2012). It should also be
109 highlighted that, although modestly, in a *pilX* mutant the amount of pilus displayed on the
110 bacterial surface is reduced (Helaine et al., 2005).

111 Because they are key players in type IV pili biology the objective of this study is to determine
112 how *N. meningitidis* minor pilins exert their function. We focused on the two minor pilins that
113 are involved in the interaction with host cells, PilX and PilV. We provide evidence that these
114 minor pilins are required to fully express type IV pili on the bacterial surface and that this effect
115 is sufficient to explain the phenotype of the mutants.

116

116

117 **Results**

118

119 *The bulk of PilV and PilX proteins are localized in the periplasm*

120 The low amounts of protein expression combined with the structural similarities among the
121 minor pilins and the major pilin antibodies render the localization of the minor pilins difficult.
122 To address these points minor pilins were tagged with the FLAG epitope. This strategy offers a
123 high sensitivity due to the high affinity of available antibodies directed against this peptide and
124 the possibility to introduce several tags in one protein. Another advantage is the high specificity
125 due to the availability of monoclonal antibodies.

126 The functionality of the C-terminal triple-tagged proteins was first evaluated. The flagged
127 PilV was able to restore bacteria-induced plasma membrane reorganization upon adhesion to
128 wild type levels (Figure S1). The flagged PilX construct provided normal aggregation levels. In
129 both cases complementation was at the level of the wild type strain indicating that the flagged
130 proteins were functional. To determine their location, strains expressing the flagged minor
131 pilins were immobilized on coverslips and labeled with an anti-FLAG monoclonal antibody.
132 Despite our repeated attempts using a highly sensitive back-illuminated camera staining
133 corresponding to pili could not be detected. Occasionally, a single bacterium on these samples
134 showed a strong staining around the bacterial body (Figure 1A). We reasoned that the positively
135 stained bacteria could have ruptured outer membranes. To test this we generated spheroplasts.
136 Bacteria with lysed outer membranes showed intense staining around the bacterial body
137 indicative of a periplasmic location of the tagged proteins (Figure 1B). The same results were
138 obtained for PilV and PilX. Although a lack of sensitivity cannot be ruled out these results
139 indicate that a large amount of these proteins are localized in the periplasm.

140 In order to determine the proportion of periplasmic versus pili-associated minor pilins we
141 took advantage a well-established pili purification approach based on mechanical shearing and
142 ammonium sulfate precipitation. A number of reports describe the co-purification of PilV and

143 PilX with type IV pili but the proportion of co-purified minor pilins relative to the total amount
144 of these proteins is unknown. Pili were purified and the amount of PilV, PilX and the major pilin
145 PilE was determined in the pili fraction as well as in the initial bacterial suspension (Figure 1C).
146 This approach was performed over 5 times and quantitative analysis of the Western blot signals
147 allowed to determine that $6\pm 2\%$ of the major pilin could be purified in these conditions
148 reflecting the purification efficiency and the balance between periplasmic and pili associated
149 PilE (Figure 1C). In contrast, in the case of PilX and PilV the proportion of pilus associated
150 protein was 1 ± 0.6 and $0.2\pm 0.1\%$ respectively. These results confirm that only a minute
151 proportion of minor pilins as associated with pili and raise the question of a possible function of
152 these minor pilins in the periplasm.

153

154 *Minor pilins exert their functions from the periplasm*

155 Although the PilX and PilV minor pilins are mostly localized in the periplasm this does not
156 exclude that a small proportion of the protein located in the pilus could carry out their functional
157 role. To address this point we designed a strategy to block these proteins in the periplasm and
158 assessed their function in these conditions. Based on available structures of the piliation system
159 we reasoned that fusing the bulky mCherry protein to the carboxy-terminus of the minor pilins
160 would prevent exit from the periplasm through the pilQ outer membrane pore.

161 As a test of the validity of the approach the mCherry protein was fused to the major pilin.
162 Fluorescence analysis of this strain revealed a ring like staining around the bacteria indicating a
163 periplasmic location (Figure 2A). Importantly no external fibrous, pili shaped, staining could be
164 detected on any of the samples analyzed. To validate that the PilE-mCherry fusion was retained
165 in the periplasm the amount of pili expressed at the surface of this strain was determined by
166 ELISA on whole bacteria (Figure 2B). Piliation of the wild type strain was used as a reference. As
167 previously described expression of the unmodified *pilE* gene under the Lac promoter did not
168 lead to full complementation but still reached a piliation value of 0.2 ± 0.1 (Long et al., 2003). In
169 contrast, expression of the *pilEmCherry* fusion did not lead to any detectable pili. This result

170 indicates that the fusion of mCherry with the major pilin blocked its function presumably by
171 preventing exit from the outer membrane and the same strategy was used for PilX and PilV.

172 Carboxy-terminal fusion of the mCherry protein to PilX and PilV led also to the periplasmic
173 location of the protein with a distinct ring around bacteria (Figure 2A). The functionality of the
174 *pilXmCherry* construct was tested for its ability to confer the ability of the bacteria to adhere to
175 host cells via their type IV pili (Figure 2C). At 17 μ M of inducer, the concentration providing the
176 amount of PilX closest to the wild type levels (Figure S2), adhesion was indistinguishable from
177 the wild type stain. In contrast with the major pilin, fusion of PilX with the mCherry protein does
178 not alter its function. Similar results were obtained with PilV and its ability to provide efficient
179 crosstalk with host cells. At the concentration of inducer mimicking the wild type level of PilV,
180 the *pilVmcherry* construct fully complemented the deletion strain (Figure 2D).

181 These results show that preventing the exit of the minor pilins PilX and PilV from the outer
182 membrane does not affect their function and argue that they exert their function in the
183 periplasm rather than outside of the bacteria.

184

185 *PilV, PilX modulate the efficiency of pilus biogenesis*

186 The presence of the minor pilins in the périplasm is in favor of a role in association with
187 the pilus machinery and pilus biogenesis. Accordingly, Brown *et al* reported a subtle decrease in
188 the amount of pili on the bacterial surface in a *pilX* mutant. In addition, given their common
189 pilin-like structural features we reasoned that PilV and PilX could exert redundant functions in
190 pilus genesis. To evaluate this possibility we reassessed the piliation levels of the *pilV* and *pilX*
191 mutants and the double mutant by ELISA on whole bacteria and the morphology of pili was
192 observed by Immunofluorescence (Figure 3A).

193 Testing of individual mutants yielded results similar but not identical to those reported
194 (Brown et al., 2010). Inactivation of *pilV* led to a minor but reproducible defect in piliation with
195 $61\pm 19\%$ of piliation relative to the wild type strain (Figure 3B). PilV overexpression not only
196 rescued the amount of pili but increased pili levels above wild type. Similar results were

197 obtained with PilX, the mutant displays a more severe phenotype with 27±9% piliation and the
198 complemented strain higher piliation than wild type (Figure 3C). Analysis by
199 immunofluorescence was in good agreement with these quantitative results and did not reveal
200 any obvious changes in morphology. These results strengthen the role of these minor pilins in
201 pilus biogenesis.

202 The *pilX* and *pilV* mutations potentiated each other as the double mutant could barely be
203 distinguished from the *pilE* strain by the ELISA approach. Immunofluorescence detection
204 revealed a few pili in contrast with the *pilE* strain indicating that the *pilX/pilV* double mutation
205 still allows some pilus biogenesis although at much reduced levels. This result suggests that the
206 two proteins can at least in part complement each other in pilus biogenesis and exert redundant
207 roles in this context. Although these results do not provide a clear mode of action of these minor
208 pilins they highlight their role in pilus biogenesis and indicate that PilV, PilX can partially
209 complement each other in this function.

210

211 *Amount of surface displayed pili tightly regulates function*

212 A simple hypothesis that arises from the above results is that the phenotypes displayed
213 by the individual mutants are due to their effect on piliation. To test this hypothesis we designed
214 a genetic system that allows fine regulation of the amount of pili on the bacterial surface. The
215 PilF ATPase that provides energy for pilus biogenesis was expressed under the control of the *lac*
216 promoter. The amount of pili produced by the bacteria quantified by ELISA in the presence of
217 different amounts of inducer. When expressed relative to the wild type level of piliation the
218 system allows to finely regulate the amount of pili between 3% in the absence of inducer to 95%
219 in the presence of 100 µM IPTG (Figure 4A). Intermediate values follow a sigmoidal curve (R
220 square= 0.89). Using this system the different type IV pili mediated properties were evaluated
221 with variable amounts of pili, adhesion, aggregation, bacteria-induced plasma membrane
222 reorganization and competence.

223 To measure aggregation, bacteria grown in different amounts of IPTG were incubated for
224 a period of 30 minutes, aggregates were visualized under a microscope and images were
225 analyzed automatically with the ImageJ software package. Results are indicated as a function of
226 the level of piliation as indicated in figure 4A. Up to 40% of piliation no aggregation could be
227 detected. Beyond this value the level of aggregation increased in a linear fashion (Figure 4B). For
228 adhesion bacteria were incubated with endothelial cells, allowed to proliferate for 4 hours and
229 CFUs were determined. Results were similar to aggregation, up to about 40% of piliation a low
230 level of adhesion corresponding to a non-piliated strain was observed (Figure 4C). Between 40
231 and 95% of piliation adhesion increased linearly when the log of bacterial number is plotted.
232 The ability of the bacteria to induce plasma membrane reorganization under microcolonies was
233 then measured in different conditions of induction. This response could only be evaluated in
234 conditions where adhesion was observed, *i.e.* above 40 % of piliation. Efficiency of the cellular
235 response was low up to about 70 % of piliation and then increased sharply up to 95% (Figure
236 4D).

237 The level of piliation thus tightly regulates the ability of the bacteria to form aggregates,
238 adhere to host cells and to induce a host cell response. The *pilX* and *pilV* mutants were included
239 in these different assays. As expected the *pilX* mutant was unable to adhere or aggregate.
240 Plotting the amount of pili of the *pilX* mutant and its performance in the different assays showed
241 a good correlation. These results show that the decreased level of piliation of the *pilX* mutant
242 (27%) is sufficient to explain the decrease in aggregation and adhesion. The *pilV* mutant
243 displayed a mild decrease in aggregation, adhesion and a nearly complete defect in its ability to
244 trigger a cellular response. The level of piliation and the phenotypes also showed good
245 correlation.

246 Optimal levels of type IV pili are thus necessary to foster the biological effects carried by
247 this bacterial organelle. Furthermore, the mild effects of the minor pilins *pilV* and *pilX* are
248 sufficient to explain their biological effects.

249

249

250 **Materials and Methods**

251 **Antibodies and chemicals.**

252 The following antibodies were used for western blot, immunofluorescence labeling or enzyme-
253 linked immunosorbent assay (ELISA): anti-ezrin rabbit polyclonal antibody (generously
254 provided by P. Mangeat, CNRS, UMR5539, Montpellier, France), anti-PilE mouse monoclonal
255 antibody clone 20D9 (Pujol et al., 1997), anti-PilX (Helaine et al., 2007) and anti-PilV (Mikaty et
256 al., 2009), anti-Flag M2 monoclonal antibody (Sigma). The following goat secondary antibodies
257 were used for immunofluorescence labeling or ELISA: anti-mouse IgG (H+L) coupled to
258 horseradish peroxidase (Jackson Immuno Research Laboratories) and anti-rabbit IgG (H+L) or
259 anti-mouse IgG (H+L) coupled to Alexa-488 (Life Technologies). 4',6-Diamidino-2-phenylindole
260 (DAPI) was purchased from Life Technologies. Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)
261 was purchased from Promega.

262 **Bacterial strains and growth conditions**

263 *Growth conditions*

264 *N. meningitidis* strains were grown GC agar base plates (Conda Laboratorios, Spain) containing
265 Kellogg's supplements and when required, 100 μ g/ml kanamycin, 2 μ g/ml erythromycin, 50
266 μ g/ml spectinomycin or 5 μ g/ml chloramphenicol at 37°C in moist atmosphere containing 5%
267 CO₂. *Escherichia coli* transformants were grown on liquid or solid Luria-Bertani medium (Difco)
268 containing 20 μ g/ml chloramphenicol, 50 μ g/ml spectinomycin or 200 μ g/ml erythromycin
269 when necessary.

270 *Gene inactivation and complementation*

271 Mutations in the *pilE*, *pilV* and *pilX* genes were described elsewhere (Geoffroy et al., 2003;
272 Helaine et al., 2005; Nassif et al., 1993). To generate a mutation in the *pilF* gene the entire ORF
273 was amplified using PilF-F and PilF-R (see table for primer sequences); cloned into pCR2.1
274 (Invitrogen); a BamHI site was introduced inside the gene by site-directed mutagenesis; this
275 construct was then subcloned into the pBluescript plasmid (Stratagene) using the SacI and Sall

276 restriction sites; and the spectinomycin resistance cassette (Klee et al., 2000) was introduced
277 inside the BamHI restriction site. Constructs allowing the complementation of the *pilV* and *pilX*
278 mutations were described elsewhere (Helaine et al., 2005; Mikaty et al., 2009). For the
279 complementation of the *pilE* and *pilF* mutations under the control of the Lac promoter, ORFs
280 were cloned into pCR2.1 (PilF-F/PilF-R for *pilF* and PilE-F/PilE-R for *pilE*) and the fragments
281 were introduced into the pGCC4 vector (Mehr et al., 2000) using PacI and PmeI restriction.

282 *Introduction of Flag tags*

283 Generation of PilX-Flag and PilV-Flag fusions was done using mega-primer technique (Ke and
284 Madison, 1997). The first amplification for *pilV* (PilV-F and PilV-Flag) and *pilX* (PilX-F and PilX-
285 Flag) substituted residues found C-Terminal of the second cysteine by a Flag peptide. Then this
286 fragment (mega-primer) was used for the complete amplification of the vector. The PCR product
287 is then treated by DpnI for 4h to remove the starting vector and transformed in XL1 Blue strain.
288 The same strategy was used sequentially to introduce a second (PilV-F/ Flag2, PilX-F/ Flag2)
289 and a third tag (PilV-F/Flag3, PilX-F/Flag3).

290 *Fusion with mCherry*

291 The megaprimer strategy was used to remove the stop codons in *pilV*, *pilX* and *pilE* and to insert
292 a Sall site. The first amplication was done using PilV-F/PilV-mCh, PilX-F/PilX-mCh, PilE-F/PilE-
293 mCh primers. The *mCherry* ORF was amplified using primer mCh-F/mCh-R from the pmCherry-
294 N1 vector (Clonotech). The *mCherry* fragment was then introduced carboxy-terminal of *pilV*, *pilX*
295 and *pilE* using Sall and PmeI restriction. The three mCherry fusions were then subcloned into
296 pGCC4 vector using PacI and PmeI restriction to allow chromosomal insertion.

297 **Immunofluorescence on bacteria**

298 Bacteria resuspended in PBS at an OD600 of 0.1 were centrifuged in the wells of a 96-well plates
299 (Nunc, Germany) for 10 min at 3000g and supernatant carefully removed. Then the plates were
300 incubated without covers at 37°C for 10 min to dry and bacteria were fixed with in PBS
301 containing 4%-paraformaldehyde. Fixed sample were then saturated with PBS-0.2%gelatine
302 (PBSG) for 10 min. Flagged proteins were specifically labelled with the anti-FLAG M2

303 monoclonal antibody at a concentration of 10 µg/ml in PBSG. The secondary antibody was a goat
304 anti-mouse antibody conjugated with Alexa Fluor 488. To generate spheroplasts, bacteria were
305 resuspended in 30 mM Tris (pH 7.5), 20% sucrose, 2 mM EDTA, 1 mg/ml lysozyme and
306 incubated 10 min at room temperature under constant agitation. Cells were then pelleted by
307 centrifugation at 9000 g for 10 min and resuspended in an equal volume of cold 5 mM MgSO₄.
308 After a 10 min incubation at 4°C, bacteria were fixed on coverslips coated by Poly-L-Lysine
309 (Sigma). Tfp were stained with the 20D9 antibody diluted at 2.5 µg/ml in PBSG for 1h. After
310 several washes, samples were incubated in PBSG with anti-mouse secondary antibodies
311 conjugated with Alexa 488 (5 µg/mL) and with DAPI (20 µg/mL). Labelled bacteria were
312 mounted in Mowiol(Valnes and Brandtzaeg, 1985).

313 **Type IV pili quantification**

314 Analysis of piliation was performed using a whole-cell ELISA. Bacteria were resuspended from
315 fresh GCB plates in PBS at an OD₆₀₀ of 0.1. Serial 2-fold dilutions were coated in the wells of a
316 96-well plate (Nunc, Germany). The plates were centrifuged 10 min at max speed and the
317 supernatant was carefully removed. Then the plates were incubated without covers at 37°C for
318 10min to allow drying. Then bacteria were fixed with a solution of PBS 4%-paraformaldehyde.
319 Coated plates were washed 3 times with PBS and then incubated with PBS-1%BSA-0.1%Tween
320 (blocking solution) for 10min. The anti-PilE mouse monoclonal antibody 20D9 diluted at a
321 concentration of 0.25 µg/ml in blocking solution was added to the plates and incubated 1 h.
322 After several washes, a peroxidase-linked anti-rabbit IgG diluted at 1/10000 in blocking solution
323 was added to the wells for 1 h. Finally, after 3 washes, the staining was revealed using TMB
324 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) substrate and stop solution following the manufacturer's
325 instructions (BD Bioscience). The absorbance was read at 450nm using a microtitre plate reader
326 (Flex station 3 from Molecular Devices).

327 **Cell culture.**

328 Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs; PromoCell) were used between passages 1 and
329 8 and grown in endothelial serum-free medium (Endo-SFM) supplemented with 10% heat-

330 inactivated fetal bovine serum (PAA Laboratories GmbH) and 40 µg/ml of endothelial cell
331 growth supplement (Sigma-Aldrich).

332 **Immunofluorescence of infected cells**

333 Cells were plated at a density of 10^5 cells/cm² onto 12-mm diameter glass coverslips coated with
334 0,01% collagen type I (Sigma). Before the assay, bacteria grown on GCB agar plates were
335 adjusted to OD₆₀₀ = 0.05 and then incubated for 2 hours at 37°C in prewarmed RPMI
336 supplemented with 10% FBS. Approximately 10^7 bacteria in culture medium were added to 10^5
337 cells/well in a 24-well (MOI = 100), allowed to adhere for 30 min, unbound bacteria were
338 washed away and infection was allowed to proceed for 2 h. Infected cells were fixed for 20 min
339 in PBS-4% paraformaldehyde (PFA). Cells were permeabilized for 5 min in PBS containing 0.1%
340 Triton X-100. Cells were incubated with primary antibodies in PBS containing 0.2% gelatin for 1
341 h. After 3 washes with the same buffer, DAPI was added to Alexa-conjugated secondary
342 antibodies for 1 h. After additional washes, coverslips were mounted in Mowiol. The recruitment
343 efficiency was estimated by determining the proportion of colonies that efficiently recruit the
344 protein of interest in a honeycomb shape just under the colonies. A minimum of 50 colonies was
345 analyzed per coverslip. Each experiment was performed in duplicate and repeated 3 times.

346 **Bacterial adhesion assay**

347 Adhesion of meningococci on HUVECs was done as described previously (Eugene et al., 2002). In
348 brief, monolayers of 10^5 cells in 24-well plates were infected with 10^7 bacteria (MOI=100).
349 Numbers of added bacteria were systematically determined by counting CFU. After 30 min,
350 unbound bacteria were removed by three washes and the infection was continued for 4h. At the
351 endpoint, 3 washes were done, and adherent bacteria were recovered by scraping the wells
352 were counted by plating appropriate dilutions on GCB agar plates.

353 **Bacterial aggregation assay**

354 Bacteria grown on GCB agar plates were adjusted to OD₆₀₀=0.05 and then incubated for 2 hours
355 at 37°C in. The bacterial suspension was concentrated to OD₆₀₀= 0.3 by a 1 min centrifugation
356 at 15000 g followed by resuspension in medium containing 0.5 µg/ml of DAPI. Bacterial

357 suspensions were briefly vortexed and transferred in a glass-bottom 96-well plate. After 30 min
358 incubation, aggregates were observed microscopically with a 4x lens and size and number
359 determined with the ImageJ software, as previously described (Chamot-Rooke et al., 2011).

360 **SDS-PAGE and Western blot**

361 Preparation of protein samples, SDS-PAGE separation, transfer to membranes and
362 immunoblotting were performed using standard biochemistry techniques (Harlow and Lane,
363 1988). Proteins were separated by SDS-PAGE in tris glycine gels containing 12–15% acrylamide,
364 transferred onto PVDF membranes (Thermo Scientific) using semi-dry electrotransfer.
365 Membranes were blocked with 5% milk in PBS 0.1% Tween and incubated in the specific
366 antiserum (anti-PilE at 1/5000, anti-PilX at 1/3000 and anti-PilV at 1/1500) followed by
367 horseradish peroxidase (HRP)-coupled anti-rabbit antibody (1/20 000). Membranes were
368 developed by enhanced chemiluminescence ECL-plus (Pierce) and recorded using the LAS-4000
369 (Fujifilm). Protein quantifications were done using ImageJ software.

370 **Type IV pili purification**

371 Pili were prepared as previously described (Helaine et al., 2005). The contents of ten Petri
372 dishes were harvested in 10 ml of 150 mM ethanolamine at pH 10.5. Pili were sheared off by
373 vortexing during 1 min. Bacteria were centrifuged at 3000 g during 30 min. Supernatants were
374 centrifuged an additional 30 min at 17 000 g. Pili were then precipitated by adding ammonium
375 sulfate at a concentration of 10% to the supernatants, and samples were allowed to stand for 60
376 min. Precipitates were pelleted by centrifugation at 3000 g for 30 min. Pellets were washed with
377 PBS twice and resuspended in distilled water.

378

379

380

380 Discussion

381 Our results show that a relatively modest decrease in the amount of pili displayed on the
382 bacterial surface leads to a strong effect on the functions carried by these structures. Bacteria
383 with 60% of piliation level relative to the wild type are unable to induce the reorganization of
384 the plasma membrane that allows the bacterium to resist drag forces generated by the blood
385 flow. Below 40% of piliation bacteria are simply unable to aggregate or adhere to host cells and
386 cannot be distinguished from a non-piliated strain. These results are in striking contrast with
387 previous studies on competence. These studies have shown that only low amounts of pili are
388 sufficient to provide efficient natural transformation (Long et al., 2003) showing that the need
389 for large amounts of pili is specific for functions involving interaction with host cells. An
390 intriguing question that emerges from this study is why the amount of pili is so important to
391 carry out the functions involved in the interaction with host cells. One interpretation of this is
392 that pili on the bacterial surface are limiting in number. A lower amount of surface pili would
393 lead to bacteria without pili and thus a loss of associated properties. However, electron
394 microscopy images of *Neisseria spp.* showing a large number of pili per bacteria are not in favor
395 of this hypothesis (Craig et al., 2006; Marceau et al., 1995). Another hypothesis would be in
396 favor of the importance a collective behavior that would require a threshold level of pili to be
397 activated. Pili bundling is an obvious candidate although pili bundle were described in the case
398 of the *pilX* mutant for instance. Further research will be required to understand the exquisite
399 sensitivity to pili levels. In terms of developing potential drugs that would target type IV pili
400 these results are encouraging as only a partial effect on the amount or function would result in a
401 strong effect.

402 Another important result of our study is that the minor pilins PilX and PilV participate in
403 pilus biogenesis rather than by inserting inside the extracellular fibers. Two types of arguments
404 support this idea: (i) all of the effects of the mutations can be reproduced by reducing the
405 amount of surface piliation and an effect on pilus biogenesis is expect to take place in the

406 periplasm; (ii) blocking these proteins in the periplasm has strikingly little effect on their
407 functions.

408 At first glance these results might appear in contradictions with studies that showed the
409 presence of minor pilins inside pilus fibers by electron microscopy. Helaine *et al* showed that
410 PilX could be detected by immuno-electron microscopy inside *N. meningitidis* fibers (Helaine et
411 al., 2005). We showed using biochemical purification of type IV pili that the vast majority of
412 minor pilins are localized in the periplasm rather than associated with pili but we confirm that a
413 proportion is associated with pili. It should be emphasized, however, that localization inside pili
414 does not imply that they exert their function at this site. A small proportion of the minor pilins
415 could end up inside fibers out of the bacteria as a consequence of their function inside the
416 periplasm. In addition, our results do not exclude that this small pool of external minor pilins
417 exert a role out of the bacteria. What are results indicate is that their modulatory role in type IV
418 pili biogenesis is sufficient to explain their effects on the interaction with host cells.

419 Our results highlight similarities between the minor pilins PilV and PilX and to the
420 pseudopilins PilH, I, J and K. These two groups of protein have in common the hydrophobic
421 alpha helix that is the hallmark of pilin type of proteins. They were initially placed in different
422 functional groups because of PilX and PilV were considered to have no effect on pilus biogenesis.
423 Although mutants in the *pilH-K* genes have a stronger phenotype since they do not display pili on
424 their surface they could have similar modes of action. Our knowledge of the function of PilH-K
425 largely comes from the homologous proteins in type II secretion systems. Structural work has
426 shown that GspIJK form a complex and it was suggested that these proteins participate in the
427 initiation of pilus formation and subsequently end up in the pilus fiber as a consequence
428 although their role is in the périplasme (Korotkov and Hol, 2008). It is conceivable that PilV and
429 PilX in some way assist the PilH-K complex in performing this function. The participation of PilX
430 and PilV would not be absolutely required but somehow optimize the process in order to reach
431 an optimal amount of pili that is required to mediate efficient interaction with host cells. This

432 hypothesis would explain that PilX and PilV are needed in the periplasm and occasionally end up
433 in the extracellular pilus fiber.

434

435

436

436 **Figure legends**

437 **Figure 1**, Subcellular localization of the minor pilins PilV and PilX. (A) Immunofluorescence
438 detection of flag tagged PilX (top) and PilV (bottom). Bacteria are visualized by staining their
439 DNA with DAPI (Blue) and anti-FLAG detection appears in green. (B) Immunofluorescence
440 detection of flag tagged PilX (top) and PilV (bottom) after lysis of the outer membrane.(C) Pili
441 from the wild type strain were purified by mechanical shearing and ammonium sulfate
442 precipitation. A total lysate from the starting bacterial suspension assesses the total amount of
443 the proteins, inside and outside of the bacteria. Different dilutions of the result of the pilus
444 preparation were loaded. The fractions of the total sample are indicated. A total lysate from the
445 corresponding mutant indicates the specificity of the detection. (D) Quantitative analysis of pilus
446 association. Intensity of the bands on the immunoblots generated following pilus purification
447 were analyzed and the proportion of pilins associated with pili were plotted. Each dot
448 represents one experiment. Bars represent the mean value and standard deviations.

449
450 **Figure 2**, Anchoring PilX or PilV does not prevent function. (A) Fluorescence analysis of the
451 localization of the *mCherry* fusions, *pilEmCherry* (top), *pilXmCherry* (middle) and *pilVmCherry*
452 (bottom). Bacteria are visualized with DAPI. (B) Impact of the mCherry fusion on the ability of
453 PilE to form pilus fibers. The amount of surface exposed pili was determined by ELISA on whole
454 bacteria for the indicated strains. The amount of added IPTG to induce the Lac promoter is
455 indicated. Each dot represents one experiment. Bars represent the mean value and standard
456 deviations. (C) Ability the PilXmCherry fusion to promote adhesion. Bacteria were incubated
457 with endothelial cells for a period of 4 hours and the number of cell-associated bacteria
458 determined. The amount of inducer added is indicated. Arrows point to the conditions
459 mimicking wild type levels of PilX. (D) Ability the PilVmCherry fusion to promote plasma
460 membrane reorganization following adhesion. Bacteria were incubated with endothelial cells for
461 a period of 2 hours and the proportion of microcolonies efficiently triggering plasma membrane
462 reorganization determined. The amount of inducer added is indicated. Arrows point to the

463 conditions mimicking wild type levels of PilV. For panels B, C and D each dot represents one
464 experiment and bars represent the mean value and standard deviations. Statistical analysis was
465 done by an ordinary one-way ANOVA and the Tuckey multiple comparisons test; *** indicates P
466 ≤ 0.001 .

467

468 **Figure 3**, Effect of PilV and PilX on pilus biogenesis. (A) Immunofluorescence analysis of pili of
469 the surface of the indicated bacterial strains. (B) Elisa analysis of surface exposed pilin in the
470 *pilV* mutant. (C) Elisa analysis of surface exposed pilin in the *pilX* mutant.(D) Elisa analysis of
471 surface exposed pilin in the *pilXpilV* double mutant. Error bars represent mean and standard
472 deviation. Statistical analysis was done by an ordinary one-way ANOVA and the Tuckey multiple
473 comparisons test; * indicates $P \leq 0.05$; *** indicates $P \leq 0.001$.

474

475 **Figure 4**, Impact of the amount of surface piliation on pili dependent functions. (A) Analysis of
476 the piliation of the *pilFpilF_{ind}* strain. The level of piliation relative to the wild type strain was
477 plotted as a function of the amount of inducer (IPTG). A sigmoidal curve fit was performed. (B)
478 Ability of the *pilFpilF_{ind}* strain to aggregate in the presence of different amounts of inducer.
479 Aggregation is indicated as the percentage of bacteria involved in aggregates relative to the total
480 amount. The X axis is the amount of pili in each condition. (C) Ability of the *pilFpilF_{ind}* strain to
481 adhere to host cells in the presence of different amounts of inducer. The X-axis is the amount of
482 pili in each condition. (D) Ability of the *pilFpilF_{ind}* strain to trigger plasma membrane
483 reorganization upon adhesion to host cells in the presence of different amounts of inducer. The
484 X-axis is the amount of pili in each condition. (E) Schematic representation of the different pili
485 mediated functions in the presence of different amount of piliation.

486

487 **Supplementary figures**

488 **Figure S1**, Functionality of carboxy-terminal triple FLAG tagged constructs. (A) Adhesion of the
489 triple flagged *pilX* fusion. (B) Ability of the triple flagged *pilV* to trigger plasma membrane
490 reorganization.

491 **Figure S2**, Amount of PilV and PilX expression in the inducible strains as a function of the
492 concentration inducer. (A) Western blot using an anti-PilV antibody. (B) Western blot using an
493 anti-PilX antibody.

494

495 **Acknowledgements**

496 Authors would like to thank: Keira Melican and Magali Soyer for critical reading of the
497 manuscript; and Olivera Francetic for numerous and fruitful discussions. This work was
498 supported by Fondation pour la Recherche Médicale FRM and the French ministry for research
499 and higher education (AFI); the Avenir INSERM Starting Grant; a CODDIM equipment grant
500 (Région Ile de France) and by a European Research Council starting grant.

501

501 **Table**

Primer	Sequence*	Enz
PilF-F	GTCGAC TTAATTAA AGGAGTAATTTTATGAGCGTAGGTTTGCTGAG	SallPacI
PilF-R	GAGCTC GTTTAAAC CTAATCGTTGGTATTTGCC	SacIPmeI
PilV-F	TTA ATTAAA GGA GTA ATT TTA TGA AAA ACG TTC AAA AAG GC	PacI
PilV-R	GTT TAA ACT TAG TCG AAG CCG GGG CAG	PmeI
PilX-F	TTA ATTAAA GGA GTA ATT TTA TGA TGA GTA ATA AAA TGG	PacI
PilX-R	GTT TAA ACC TAT TTT TTA CGA TTA GAG	PmeI
PilE-F	TTA ATT AAA GGA GTA ATT TTA TGA ACA CCC TTC AAA AAG GTT TTA CCC TTA TCG AGC TGA TG	PacI
PilE-R	GTT TAA ACT TAG CTG GCA GAT GAA TCA TCG	PmeI
mch-F	CAG GTCGAC GTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATG	Sall
mch-R	CTA GTTTAAAC CCTCTACAAATGTGGTATGGCTG	PmeI
PilV-Flag	CGC CCT TGT TTA AAC <i>TTACTT ATC GTC ATC GTC CTT ATA ATCGCA</i> GGA TTG GTT TGT ACC	
PilX-Flag	CGC CCT TGT TTA AAC CTA <i>CTT ATC GTC ATC GTC CTT ATA ATC ACA</i> GCC GAC ATC TGA GGA	
Flag2	CGC CCT TGT TTA AAC TTA <i>CTT ATC GTC ATC GTC CTT ATA ATC CTT</i> ATC GTC ATC GTC CT	
Flag3	CCT TGT TTA AAC TTA <i>CTT ATC GTC ATC GTC CTT ATA ATC CTT ATC</i> GTC ATC GTC CTT ATA ATC CTT ATC GTC	
PilV-mCh	CGC CCT TGT TTA AAC <i>GTC GAC</i> GTC GAA GCC GGG GCA	Sall
PilX-mCh	CGC CCT TGT TTA AAC <i>GTC GAC</i> TTT TTT ACG ATT AGA GAA	Sall
PilE-mCh	CGC CCT TGT TTA AAC <i>GTC GAC</i> GCT GGC AGA TGA ATC	Sall

502 **Inserted regions are in italics and restriction site in bold*

503

504

505

506 **References**

- 507 **Brissac, T., Mikaty, G., Dumenil, G., Coureuil, M. and Nassif, X.** (2012). The
 508 meningococcal minor pilin PilX is responsible for type IV pilus conformational changes
 509 associated with signaling to endothelial cells. *Infect Immun***80**, 3297-306.
- 510 **Brown, D. R., Helaine, S., Carbonnelle, E. and Pelicic, V.** (2010). Systematic functional
 511 analysis reveals that a set of seven genes is involved in fine-tuning of the multiple functions
 512 mediated by type IV pili in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun***78**, 3053-63.
- 513 **Carbonnelle, E., Helaine, S., Nassif, X. and Pelicic, V.** (2006). A systematic genetic
 514 analysis in *Neisseria meningitidis* defines the Pil proteins required for assembly, functionality,
 515 stabilization and export of type IV pili. *Mol Microbiol***61**, 1510-22.
- 516 **Caugant, D. A., Hoiby, E. A., Magnus, P., Scheel, O., Hoel, T., Bjune, G., Wedege, E., Eng,
 517 J. and Froholm, L. O.** (1994). Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly
 518 sampled population. *J Clin Microbiol***32**, 323-30.
- 519 **Cehovin, A., Simpson, P. J., McDowell, M. A., Brown, D. R., Noschese, R., Pallett, M.,
 520 Brady, J., Baldwin, G. S., Lea, S. M., Matthews, S. J. et al.** (2013). Specific DNA recognition
 521 mediated by a type IV pilin. *Proc Natl Acad Sci U S A***110**, 3065-70.
- 522 **Chamot-Rooke, J., Mikaty, G., Malosse, C., Soyer, M., Dumont, A., Gault, J., Imhaus, A.
 523 F., Martin, P., Trellet, M., Clary, G. et al.** (2011). Posttranslational modification of pili upon cell
 524 contact triggers *N. meningitidis* dissemination. *Science***331**, 778-82.
- 525 **Coureuil, M., Lecuyer, H., Scott, M. G., Boularan, C., Enslin, H., Soyer, M., Mikaty, G.,
 526 Bourdoulous, S., Nassif, X. and Marullo, S.** (2010). Meningococcus Hijacks a beta2-
 527 adrenoceptor/beta-Arrestin pathway to cross brain microvasculature endothelium. *Cell***143**,
 528 1149-60.
- 529 **Craig, L., Volkmann, N., Arvai, A. S., Pique, M. E., Yeager, M., Egelman, E. H. and
 530 Tainer, J. A.** (2006). Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography:
 531 implications for pilus assembly and functions. *Mol Cell***23**, 651-62.
- 532 **Eugene, E., Hoffmann, I., Pujol, C., Couraud, P. O., Bourdoulous, S. and Nassif, X.**
 533 (2002). Microvilli-like structures are associated with the internalization of virulent capsulated
 534 *Neisseria meningitidis* into vascular endothelial cells. *J Cell Sci***115**, 1231-41.
- 535 **Geoffroy, M. C., Floquet, S., Metais, A., Nassif, X. and Pelicic, V.** (2003). Large-scale
 536 analysis of the meningococcus genome by gene disruption: resistance to complement-mediated
 537 lysis. *Genome Res***13**, 391-8.
- 538 **Georgiadou, M., Castagnini, M., Karimova, G., Ladant, D. and Pelicic, V.** (2012). Large-
 539 scale study of the interactions between proteins involved in type IV pilus biology in *Neisseria*
 540 *meningitidis*: characterization of a subcomplex involved in pilus assembly. *Mol Microbiol***84**, 857-
 541 73.
- 542 **Giltner, C. L., Nguyen, Y. and Burrows, L. L.** (2012). Type IV pilin proteins: versatile
 543 molecular modules. *Microbiol Mol Biol Rev***76**, 740-72.
- 544 **Guarner, J., Greer, P. W., Whitney, A., Shieh, W. J., Fischer, M., White, E. H., Carlone,
 545 G. M., Stephens, D. S., Popovic, T. and Zaki, S. R.** (2004). Pathogenesis and diagnosis of human
 546 meningococcal disease using immunohistochemical and PCR assays. *Am J Clin Pathol***122**, 754-
 547 64.
- 548 **Harlow, E. and Lane, D.** (1988). Antibodies: a laboratory manual.
- 549 **Helaine, S., Carbonnelle, E., Prouvensier, L., Beretti, J. L., Nassif, X. and Pelicic, V.**
 550 (2005). PilX, a pilus-associated protein essential for bacterial aggregation, is a key to pilus-
 551 facilitated attachment of *Neisseria meningitidis* to human cells. *Mol Microbiol***55**, 65-77.
- 552 **Helaine, S., Dyer, D. H., Nassif, X., Pelicic, V. and Forest, K. T.** (2007). 3D
 553 structure/function analysis of PilX reveals how minor pilins can modulate the virulence
 554 properties of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A***104**, 15888-93.
- 555 **Ke, S. H. and Madison, E. L.** (1997). Rapid and efficient site-directed mutagenesis by
 556 single-tube 'megaprimer' PCR method. *Nucleic Acids Res***25**, 3371-2.

557 **Klee, S. R., Nassif, X., Kusecek, B., Merker, P., Beretti, J. L., Achtman, M. and Tinsley,**
558 **C. R.** (2000). Molecular and biological analysis of eight genetic islands that distinguish *Neisseria*
559 *meningitidis* from the closely related pathogen *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **68**, 2082-
560 95.

561 **Korotkov, K. V. and Hol, W. G.** (2008). Structure of the GspK-GspI-GspJ complex from
562 the enterotoxigenic *Escherichia coli* type 2 secretion system. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 462-8.

563 **Long, C. D., Tobiasson, D. M., Lazio, M. P., Kline, K. A. and Seifert, H. S.** (2003). Low-
564 level pilin expression allows for substantial DNA transformation competence in *Neisseria*
565 *gonorrhoeae*. *Infect Immun* **71**, 6279-91.

566 **Lory, S. and Strom, M. S.** (1997). Structure-function relationship of type-IV prepilin
567 peptidase of *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Gene* **192**, 117-21.

568 **Mairey, E., Genovesio, A., Donnadieu, E., Bernard, C., Jaubert, F., Pinard, E., Seylaz, J.,**
569 **Olivo-Marin, J. C., Nassif, X. and Dumenil, G.** (2006). Cerebral microcirculation shear stress
570 levels determine *Neisseria meningitidis* attachment sites along the blood-brain barrier. *J Exp*
571 *Med* **203**, 1939-50.

572 **Marceau, M., Beretti, J. L. and Nassif, X.** (1995). High adhesiveness of encapsulated
573 *Neisseria meningitidis* to epithelial cells is associated with the formation of bundles of pili. *Mol*
574 *Microbiol* **17**, 855-63.

575 **Mehr, I. J., Long, C. D., Serkin, C. D. and Seifert, H. S.** (2000). A homologue of the
576 recombination-dependent growth gene, *rdgC*, is involved in gonococcal pilin antigenic variation.
577 *Genetics* **154**, 523-32.

578 **Melican, K., Michea Veloso, P., Martin, T., Bruneval, P. and Dumenil, G.** (2013).
579 Adhesion of *Neisseria meningitidis* to dermal vessels leads to local vascular damage and purpura
580 in a humanized mouse model. *PLoS Pathog* **9**, e1003139.

581 **Mikaty, G., Soyer, M., Mairey, E., Henry, N., Dyer, D., Forest, K. T., Morand, P.,**
582 **Guadagnini, S., Prevost, M. C., Nassif, X. et al.** (2009). Extracellular bacterial pathogen induces
583 host cell surface reorganization to resist shear stress. *PLoS Pathog* **5**, e1000314.

584 **Nassif, X., Lowy, J., Stenberg, P., O'Gaora, P., Ganji, A. and So, M.** (1993). Antigenic
585 variation of pilin regulates adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells. *Mol*
586 *Microbiol* **8**, 719-25.

587 **Parge, H. E., Forest, K. T., Hickey, M. J., Christensen, D. A., Getzoff, E. D. and Tainer, J.**
588 **A.** (1995). Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution. *Nature* **378**, 32-8.

589 **Pelacic, V.** (2008). Type IV pili: e pluribus unum? *Mol Microbiol* **68**, 827-37.

590 **Pujol, C., Eugene, E., de Saint Martin, L. and Nassif, X.** (1997). Interaction of *Neisseria*
591 *meningitidis* with a polarized monolayer of epithelial cells. *Infect Immun* **65**, 4836-42.

592 **Stephens, D. S., Hoffman, L. H. and McGee, Z. A.** (1983). Interaction of *Neisseria*
593 *meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar
594 epithelial cells. *J Infect Dis* **148**, 369-76.

595 **Valnes, K. and Brandtzaeg, P.** (1985). Retardation of immunofluorescence fading
596 during microscopy. *J Histochem Cytochem* **33**, 755-61.

597 **Varga, J. J., Nguyen, V., O'Brien, D. K., Rodgers, K., Walker, R. A. and Melville, S. B.**
598 (2006). Type IV pili-dependent gliding motility in the Gram-positive pathogen *Clostridium*
599 *perfringens* and other *Clostridia*. *Mol Microbiol* **62**, 680-94.

600 **Weyand, N. J., Wertheimer, A. M., Hobbs, T. R., Sisko, J. L., Taku, N. A., Gregston, L. D.,**
601 **Clary, S., Higashi, D. L., Biais, N., Brown, L. M. et al.** (2013). *Neisseria* infection of rhesus
602 macaques as a model to study colonization, transmission, persistence, and horizontal gene
603 transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 3059-64.

604 **Wolfgang, M., van Putten, J. P., Hayes, S. F., Dorward, D. and Koomey, M.** (2000).
605 Components and dynamics of fiber formation define a ubiquitous biogenesis pathway for
606 bacterial pili. *EMBO J* **19**, 6408-18.

607 **Wolfgang, M., van Putten, J. P., Hayes, S. F. and Koomey, M.** (1999). The *comP* locus of
608 *Neisseria gonorrhoeae* encodes a type IV prepilin that is dispensable for pilus biogenesis but
609 essential for natural transformation. *Mol Microbiol* **31**, 1345-57.

610

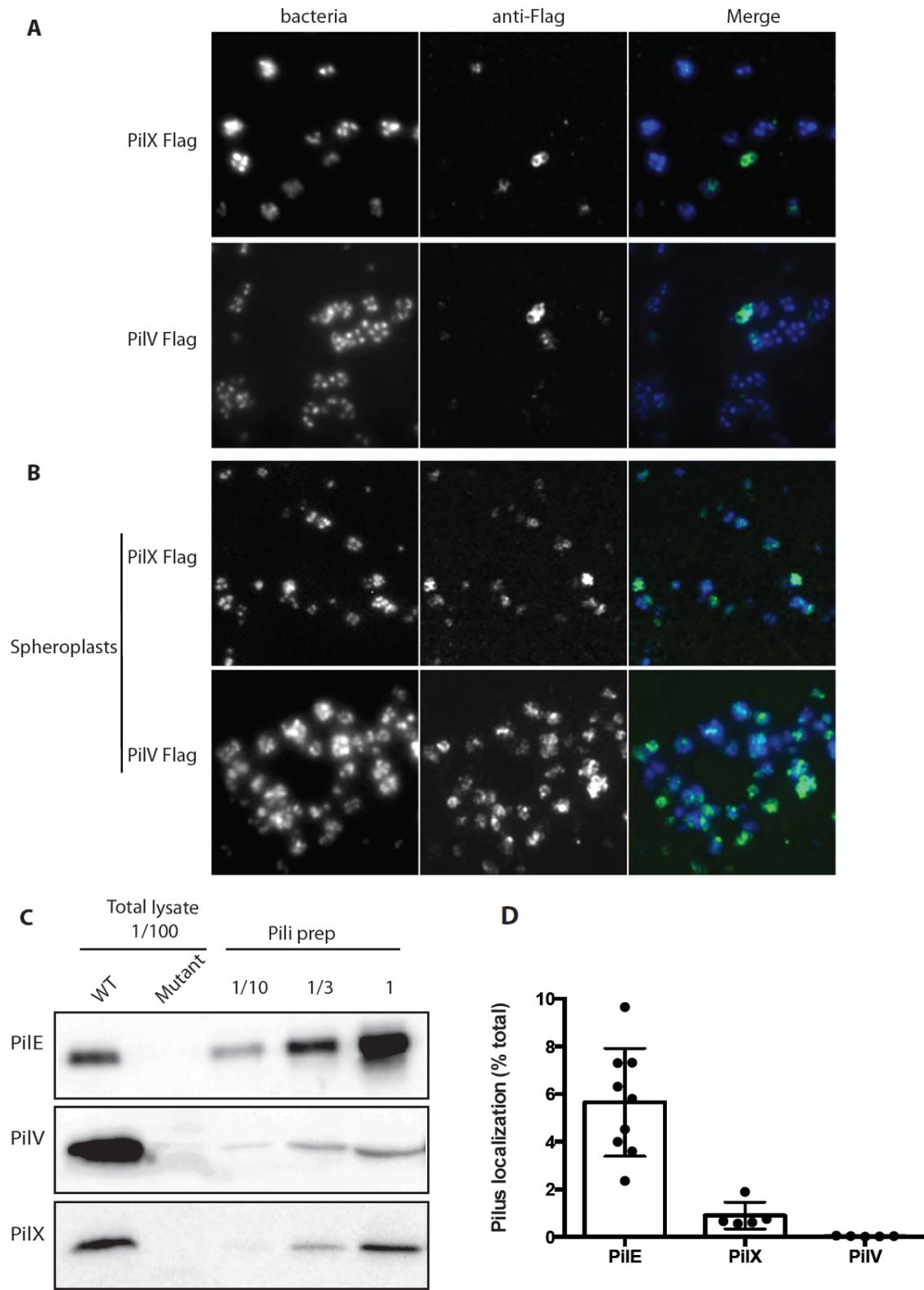


Figure 1

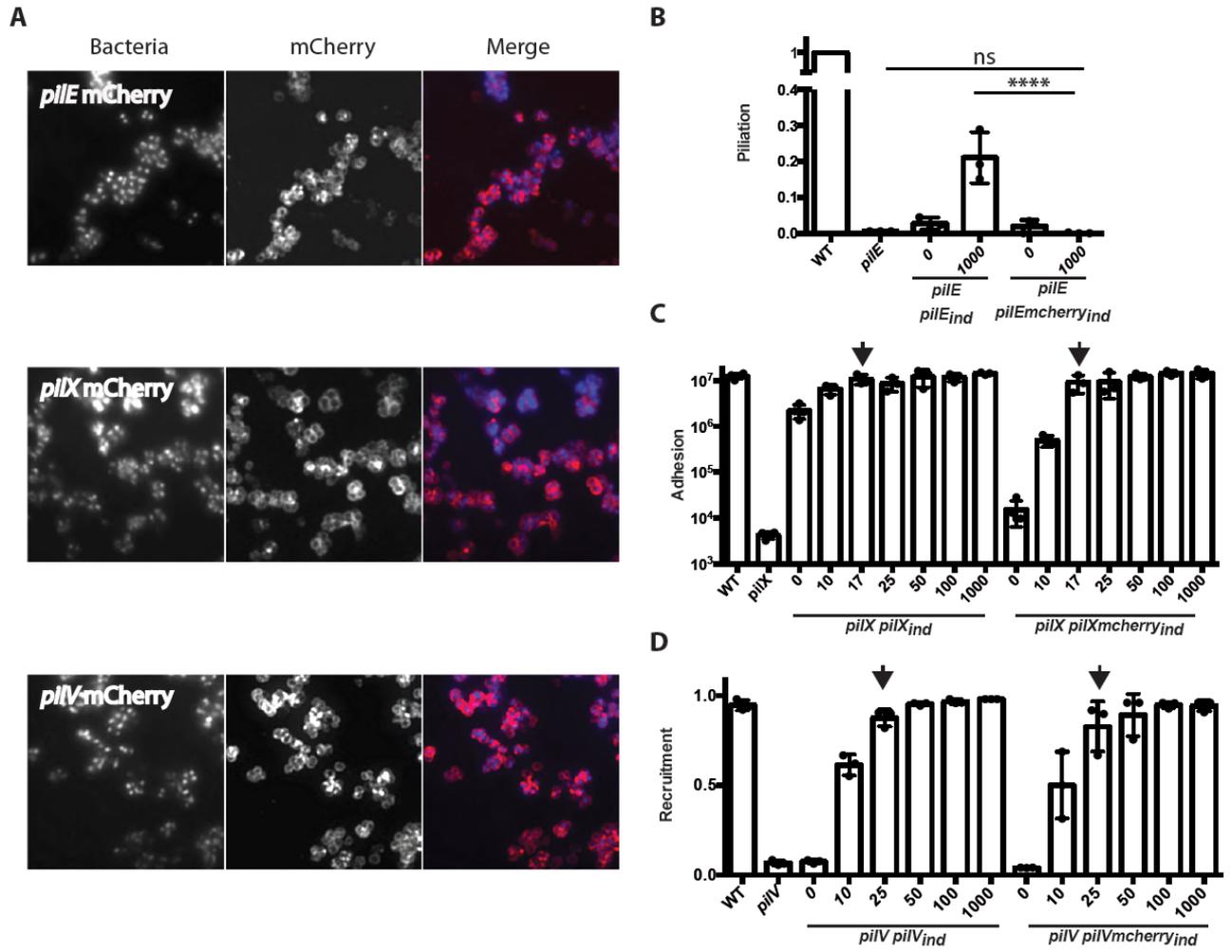


Figure 2

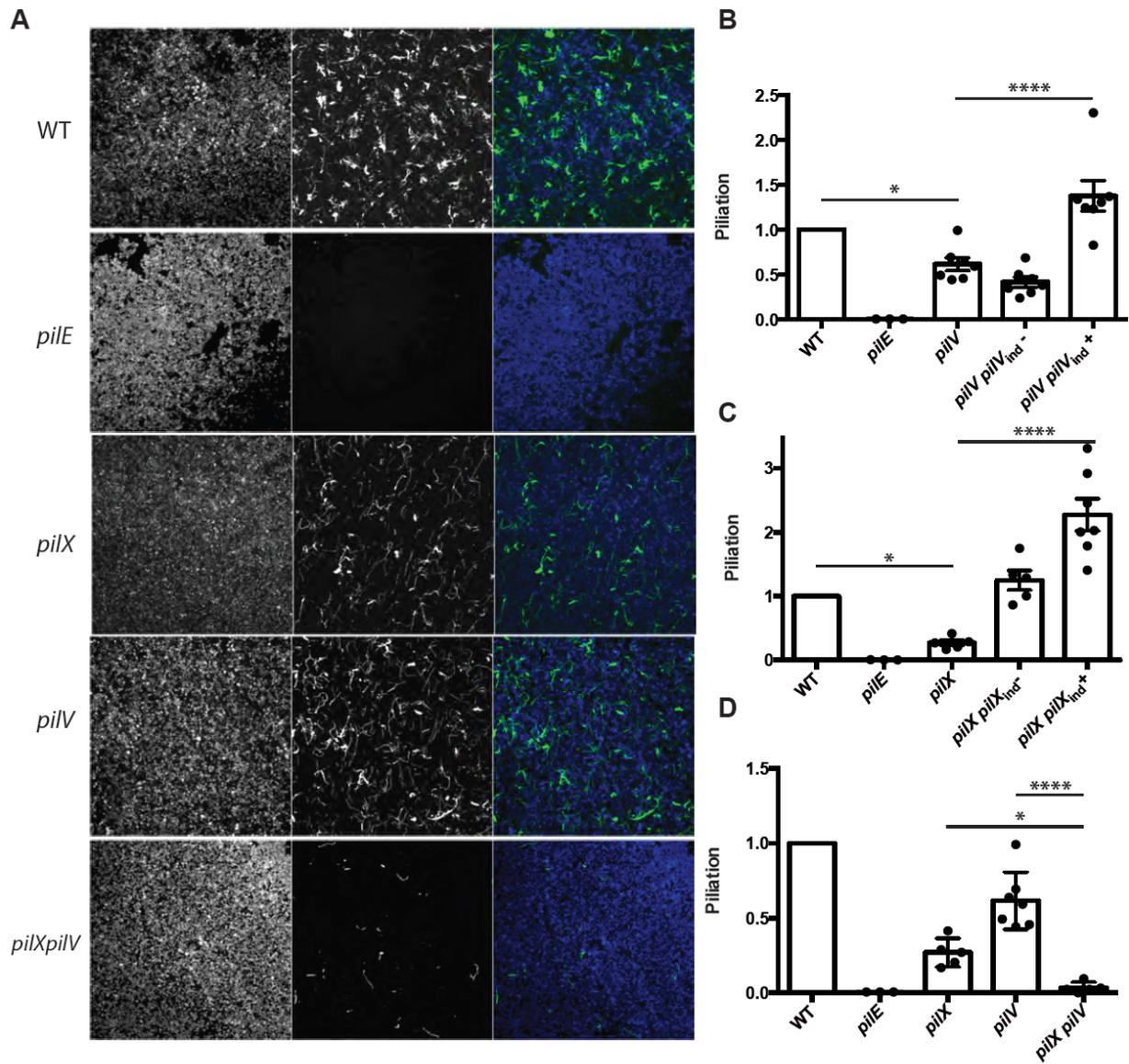


Figure 3

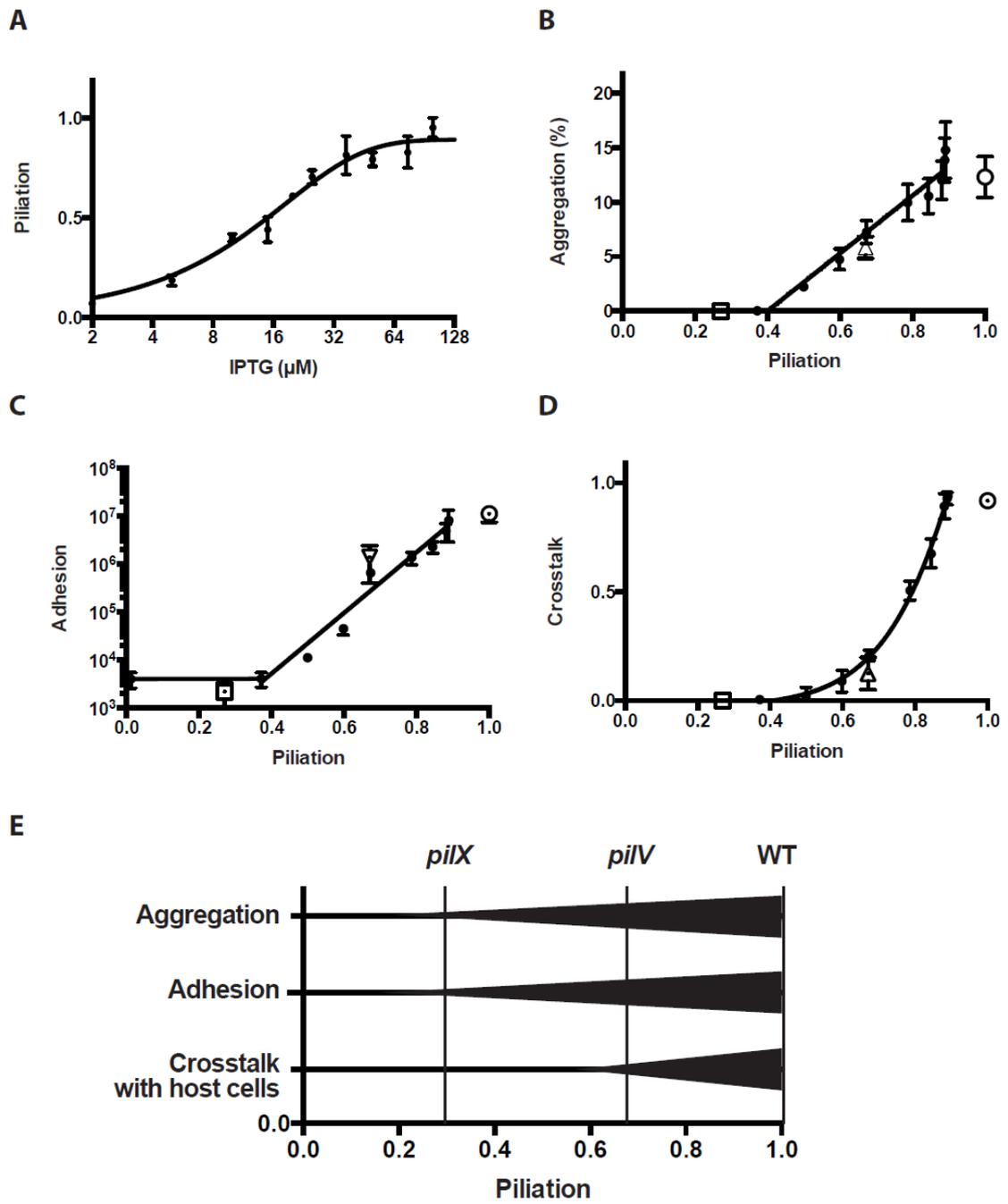


Figure 4

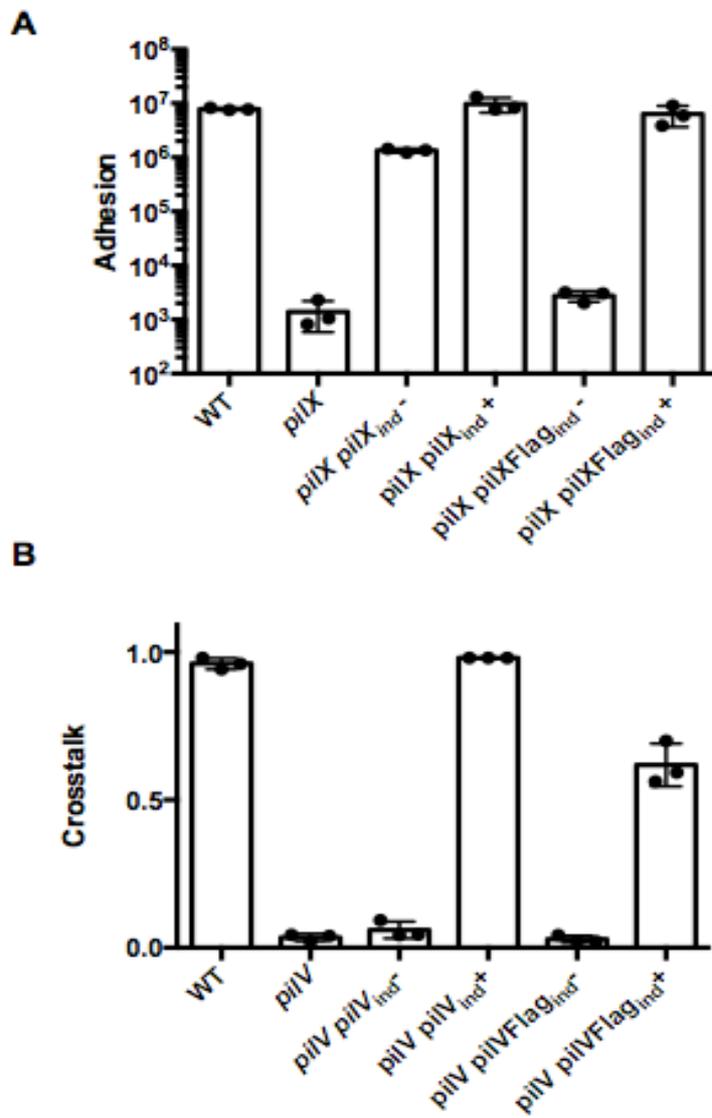


Figure S1

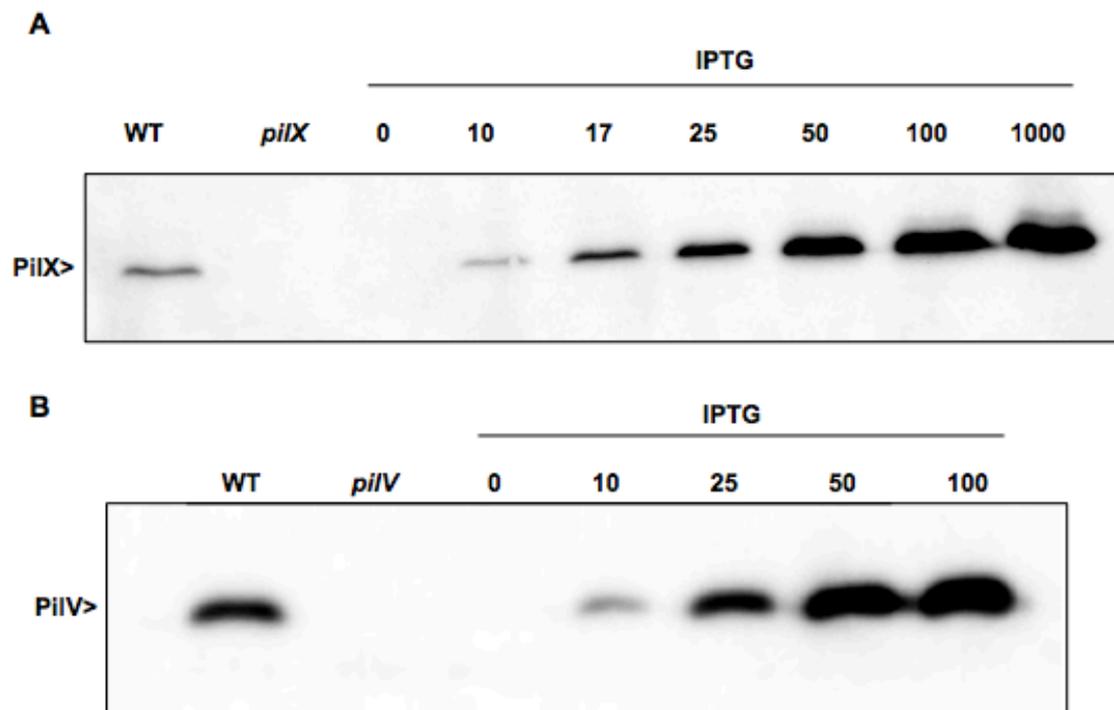


Figure S2

TRAVAUX EN COURS

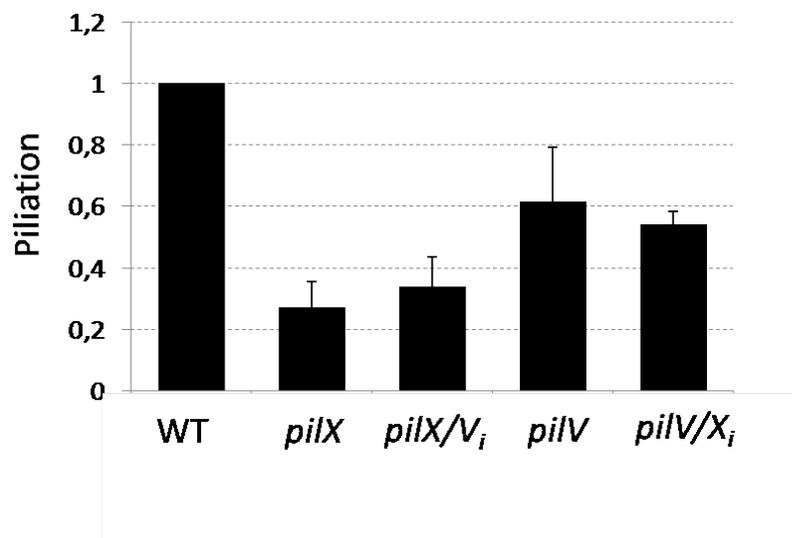


Figure 26 : Les pilines mineures ont des fonctions non redondantes

Quantification des pili exprimés en surface des bactéries par ELISA. Les expériences ont été répétées 5 fois.

I. Mode d'action des pilines mineures

Dans la partie précédente, nous avons montré que les pilines mineures PilV et PilX modulent positivement la quantité de pili exprimés à la surface des bactéries. La diminution de la quantité de PT4 observée dans les mutants correspondants permet d'expliquer leurs phénotypes vis-à-vis de l'agrégation bactérienne, de l'adhésion aux cellules hôtes et de la réponse cellulaire. Dans cette partie, nous avons essayé de comprendre le mode d'action des pilines mineures PilV et PilX sur la biogenèse des pili.

1. PilV et PilX ont des fonctions non redondantes dans la biogenèse des pili

Dans la partie précédente, nous avons démontré le rôle des pilines mineures PilV et PilX dans la biosynthèse des PT4 : les simples mutants *pilV* et *pilX* expriment respectivement 61% et 27% de pili par rapport à la souche sauvage, alors que le double mutant *pilV/pilX* n'est plus pilié. Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer le phénotype du double mutant *pilV/pilX* :

- (i) Les pilines mineures PilV et PilX ont des fonctions redondantes dans la biogenèse des pili. L'absence de l'une pouvant être partiellement compensée par la présence de l'autre, alors que l'absence des deux entraîne un défaut drastique de la piliation. Le fait que la perte de PilX entraîne un défaut de piliation plus important pourrait s'expliquer par une efficacité plus grande de PilX dans la régulation positive de la biogenèse des PT4.
- (ii) Les pilines mineures agissent dans une même voie mécanistique mais portent des fonctions différentes non redondantes.

Pour discriminer entre ces deux hypothèses, nous avons testé la complémentation d'un mutant *pilV* par la copie sauvage de *pilX* et inversement. Nous avons alors mesuré la piliation de ces souches par ELISA (Figure 26). Or aucune complémentation n'est observée : la quantité de pili dans une souche *pilV/pilX_i* est similaire à celle d'un mutant *pilV* et celle de la souche *pilX/pilV_i* est similaire à celle de la souche *pilX*. Il semblerait donc que les pilines mineures PilV et PilX n'ont pas de rôles redondants et qu'elles interviennent à deux étapes différentes et probablement successives.

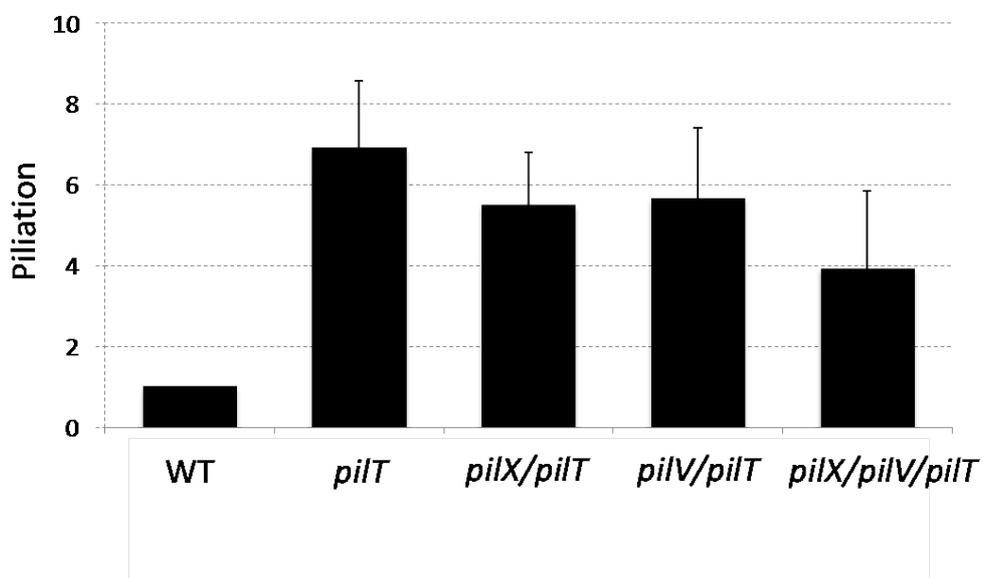


Figure 27 : Le défaut de piliation des souches *pilV*, *pilX* et *pilV/pilX* est restauré par l'absence de rétraction

Quantification des pili exprimés en surface des bactéries par ELISA. Les expériences ont été répétées 5 fois.

2. Les pilines mineures ne sont pas nécessaires en absence de rétraction

Nous venons de montrer que les pilines mineures PilV et PilX portent des fonctions non redondantes toutes les deux nécessaires à l'expression de pili à la surface des bactéries. Cependant nous ne savons pas à quelle étape de la biosynthèse ces pilines agissent. Afin de comprendre comment les pilines mineures exercent leur rôle sur la biogenèse de pili, nous avons vérifié si le défaut de la piliation observé en absence des pilines mineures pouvait être restauré par l'absence de rétraction à la suite de la mutation *pilT*. Cette stratégie, déjà utilisée au préalable pour caractériser le rôle des composants *pil*, nous permettra de trancher entre les deux hypothèses suivantes (Carbonnelle et al., 2006) :

- (i) Les pilines mineures PilV et PilX sont toutes deux indispensables à l'assemblage des pili. Si tel est le cas, aucun pili ne sera exprimé même en absence de rétraction.
- (ii) Les pilines mineures ne sont pas indispensables et peuvent permettre de stabiliser les fibres des PT4 par exemple en inhibant leur rétraction. Dans ce cas, l'absence de rétraction permet de restaurer la piliation.

Pour tester ces hypothèses, nous avons mesuré la piliation des doubles mutants *pilV/pilT*, *pilX/pilT* et du triple mutant *pilV/pilX/pilT* par ELISA. Alors que la souche *pilT* exprime presque 7 fois plus de pili que la souche parentale, les doubles mutants *pilV/pilT* et *pilX/pilT* expriment environ 5.5 fois plus de pili et le triple mutant *pilX/pilV/pilT* exprime 4 fois plus de pili que la souche parentale (Figure 27). Par conséquent, l'introduction de la mutation *pilT* restaure la piliation des souches *pilV*, *pilX*, *pilV/pilX*, suggérant que les pilines mineures PilV et PilX ne sont pas indispensables à la biosynthèse des pili. Des résultats similaires ont été obtenus pour les pseudopilines PilH, PilI, PilJ et PilK (Carbonnelle et al., 2006). Ces protéines semblent favoriser l'initiation des PT4 en formant un complexe à l'apex de la fibre (Cisneros et al., 2012a). Il est alors possible que les pilines mineures PilV et PilX agissent de manière similaire sur la biogenèse des PT4.

3. Interaction des pilines mineures PilV et PilX avec la machinerie des PT4

Pour comprendre comment les pilines mineures PilV et PilX agissent sur la biogenèse des PT4, nous avons fait l'hypothèse que leur mode d'action nécessite une interaction avec les PT4 à l'instar des pseudopilines.

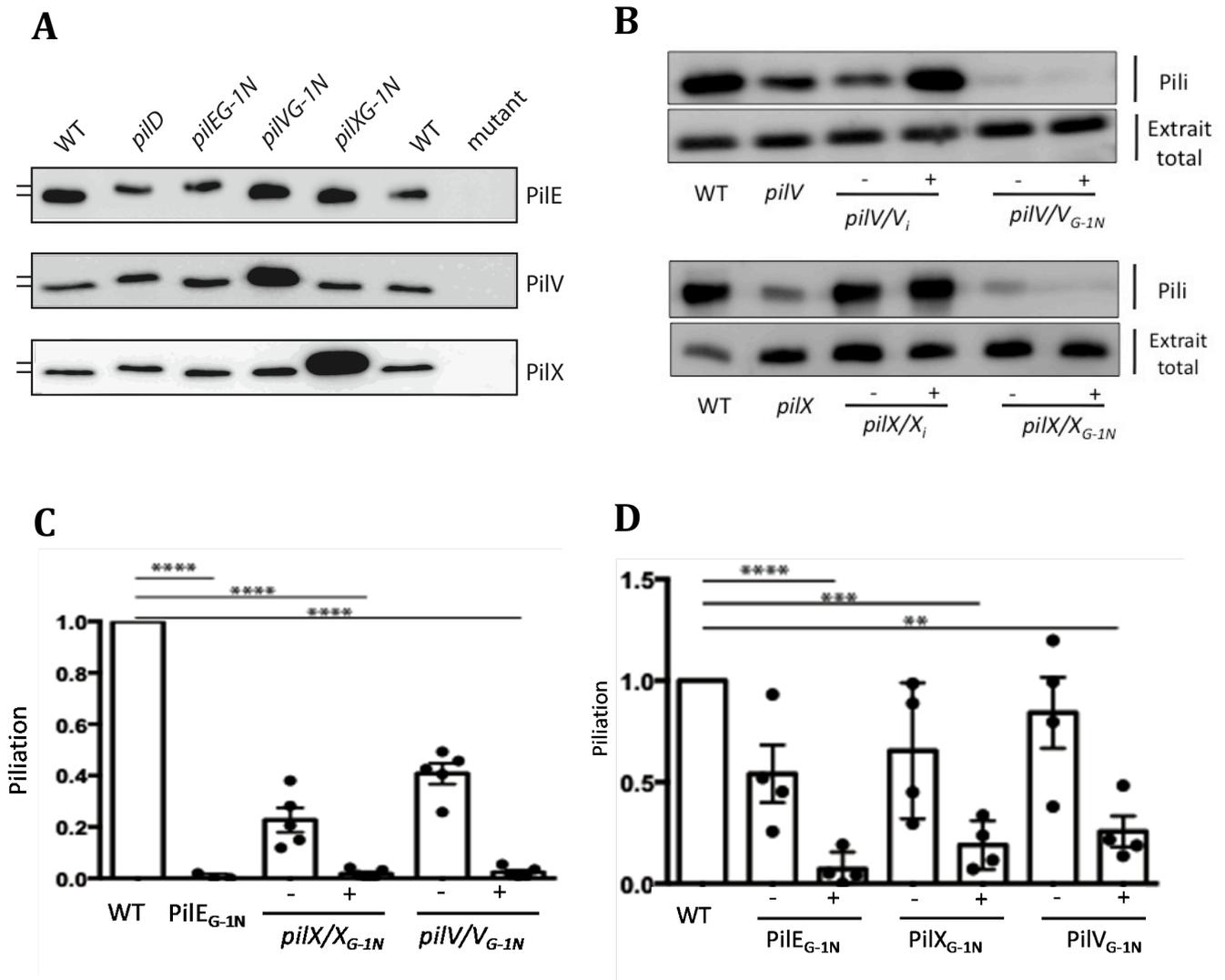


Figure 28 : Le blocage des pilines mineures PilX et PilV dans la membrane interne affecte drastiquement la piliation

Les protéines mutées ont été exprimées par 1mM d'IPTG **A**. Contrôle du clivage des protéines *PilE_{G-1N}*, *PilV_{G-1N}* et *PilX_{G-1N}* par immuno-détection des protéines PilE, PilV et PilX après électrophorèse sur gel d'acrylamide. **B**. Analyse de la quantité de pili purifiés dans les souche *pilV/V_{G-1N}* (en haut) et *pilX/X_{G-1N}*(en bas). Comparaison de la quantité de protéines PilE dans la fraction pili et la fraction cellulaire par immuno-détection de la protéine PilE. **C**. Quantification des pili exprimés en surface par les souches *pilE_{G-1N}*, *pilV/V_{G-1N}* et *pilX/X_{G-1N}* par ELISA. Les expériences ont été répétées 5 fois. **D**. Effet dominant négatif des protéines *PilE_{G-1N}*, *PilV_{G-1N}* et *PilX_{G-1N}*. Quantification des pili exprimés en surface par les bactéries par ELISA. Les expériences ont été réalisées 4 fois.

a) Blocage des pilines mineures dans la membrane interne

Dans la partie précédente, nous avons montré que les pilines mineures agissent dans l'espace périplasmique pour moduler la quantité de pili. Par la suite, nous avons testé l'effet du blocage de ces pilines mineures dans la membrane interne sur la piliation. Pour y parvenir, nous avons inséré la mutation Gly-1→Asn au niveau de la séquence signal des pilines mineures. Cette mutation est connue pour inhiber le clivage par PilD : la protéine portant cette mutation reste bloquée dans la membrane interne (Strom & Lory, 1991).

Nous avons donc introduit cette mutation dans les pilines mineures PilV et PilX ainsi que dans la piline majeure PilE. Par l'analyse de la taille des protéines par western blot, nous remarquons effectivement que cette mutation inhibe le clivage de la protéine mutée et ceci de manière spécifique (Figure 28A).

Nous avons ensuite mesuré la quantité de pili exprimés à la surface des souches *pilV/pilV_{G-1N}* et *pilX/pilX_{G-1N}* dans lesquelles les protéines PilV_{G-1N} ou PilX_{G-1N} sont exprimées sous le contrôle d'un promoteur Lac inductible par l'IPTG respectivement dans les souches *pilV* et *pilX*. L'analyse de la souche PilE_{G-1N} sert, elle, de contrôle. Deux méthodes ont été utilisées : la première repose sur la quantification des pili présent à la surface des bactéries par ELISA et la seconde consiste en la quantification de PilE présents dans la purification des PT4 (Figure 28B et 28C). Par le biais de ces deux techniques, nous observons que l'expression du variant G-1N diminue drastiquement la piliation, puisque les souches *pilV/pilV_{G-1N}*, *pilX/pilX_{G-1N}* et PilE_{G-1N} ne sont plus piliées. De manière surprenante, l'expression d'un variant de PilV ou de PilX bloqué à la membrane interne provoque un défaut de piliation différent de celui observé dans les souches mutantes pour ces protéines.

Pour comprendre comment l'expression de ces variants bloque la piliation, nous avons étudié l'effet de l'expression de ces variants dans une souche parentale afin de tester un effet dominant négatif éventuel (Figure 28D). Nous avons observé que l'expression du variant PilE_{G-1N} en présence de la piline sauvage PilE diminue fortement la piliation pour atteindre 7% par rapport à la souche sauvage. Ce résultat indique que la forme non clivée de la piline majeure PilE interagit avec la machinerie des PT4 probablement à la base de la fibre des PT4, bloquant ainsi son élongation. Dans le cas des pilines mineures, l'expression des variants G-1→N dans une souche parentale diminue la piliation de l'ordre de 75-80%, indiquant également un effet dominant négatif de ces protéines. Ces résultats suggèrent que, comme la piline PilE, les pilines mineures PilV et PilX interagissent avec la machinerie des PT4, probablement par une interaction directe avec PilE.

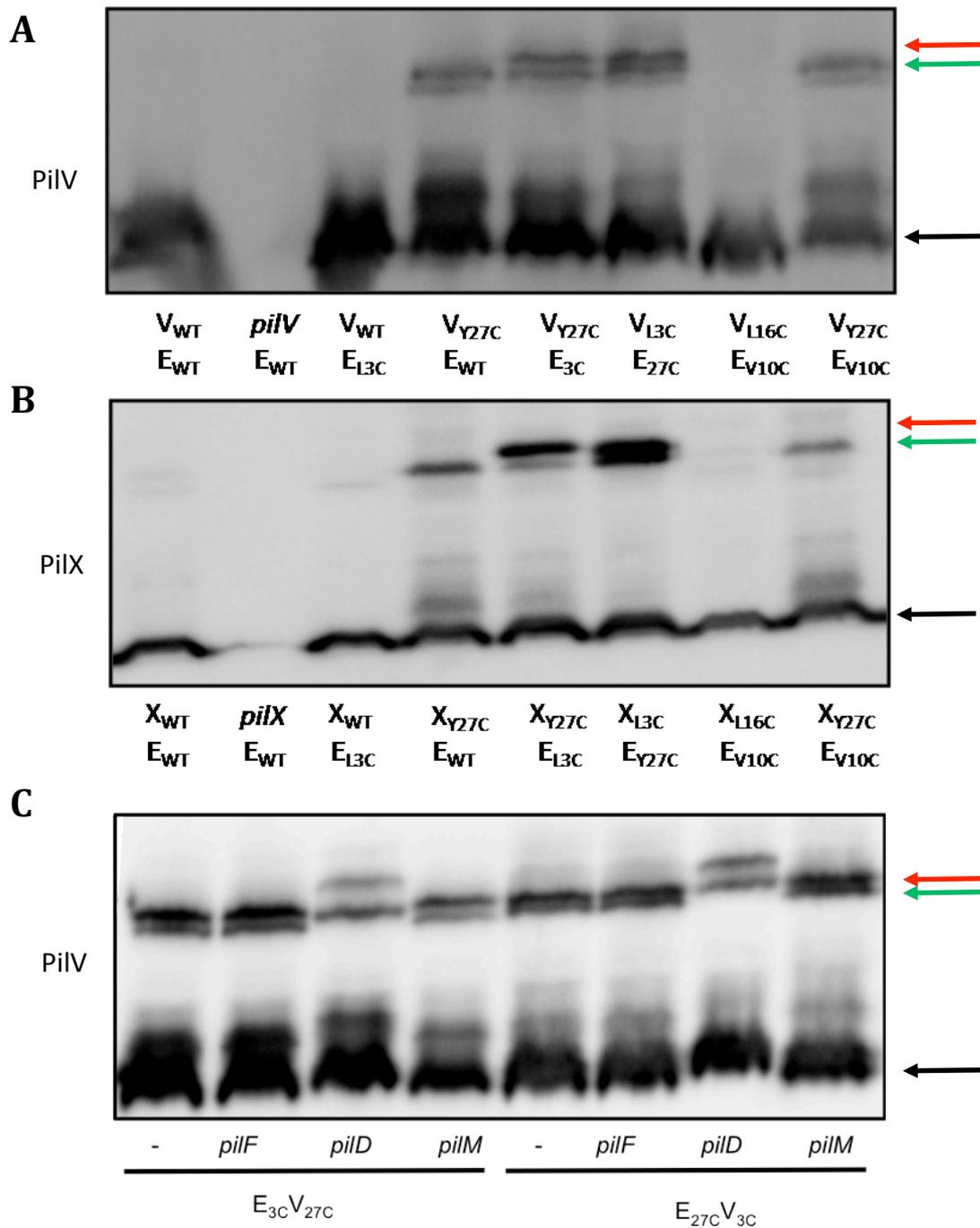


Figure 29 : Pontage disulfure entre les pilines mineures et PilE

Les protéines mutées ont été exprimées par 1mM d'IPTG. **A.** Formation des ponts disulfures entre PilE et PilV dans les différentes souches. La protéine PilV a été immuno-détectée après électrophorèse sur gel d'acrylamide. **B.** Formation des ponts disulfures entre PilE et PilX dans les différentes souches. La protéine PilX a été immuno-détectée après électrophorèse sur gel d'acrylamide. **C.** Formation des ponts disulfures entre PilE et PilV dans les mutants *pil*. La protéine PilV a été immuno-détectée après électrophorèse sur gel d'acrylamide. La flèche noire indique le monomère, la flèche verte indique l'homodimère PilV-PilV ou PilX-PilX et la flèche rouge indique l'hétérodimère PilE-PilV ou PilE-PilX.

b) Pontage disulfure entre les pilines mineures et PilE

Afin de tester si les pilines mineures PilV et PilX sont capables d'interagir directement avec la fibre des PT4, nous avons opté pour une stratégie de pontage disulfure entre ces protéines. Cette stratégie a été récemment utilisée pour valider le modèle de l'assemblage du pseudopilus et pour démontrer la formation du complexe entre les pseudopilines mineures GspI/GspJ/GspK du SST2 (Cisneros et al., 2012a, Campos *et al.*, 2010). Cette stratégie consiste en la substitution par des cystéines de deux acides aminés. Si les résidus cystéines sont à proximité (distance < 7.5Å), elles peuvent former un pont disulfure visible par la formation de dimères. En plaçant une cystéine sur chaque protéine d'intérêt, nous pourrions alors évaluer leur proximité. Dans notre cas, nous avons inséré une cystéine dans la piline PilE et une cystéine dans la piline mineure PilV ou PilX.

Afin de mettre au point cette stratégie pour l'étude des PT4, nous avons tiré partie du modèle de la structure de la fibre des PT4 de *N. meningitidis* qui a été réalisé *in silico* à partir de celui de *N. gonorrhoeae* (Chamot-Rooke et al., 2011). A partir de ce modèle, un certain nombre de couples de résidus de la piline PilE ont été prédit en interaction au sein de la fibre des PT4. Nous nous sommes limités aux couples de résidus présents dans les trente premiers acides aminés, puisque c'est dans cette région que les pilines mineures partagent le plus de similitudes avec la piline majeure PilE. Parmi ces couples, seuls les couples PilE_{L3C}/PilV_{Y27C}, PilE_{Y27C}/PilV_{L3C}, PilE_{L3C}/PilX_{Y27C} et PilE_{Y27C}/PilX_{L3C} sont capables de former des hétérodimères visibles après électrophorèse et immunodétection de la protéine PilV ou PilX (Figure 29A et 29B). Les variants PilV_{L3C}, PilV_{Y27C}, PilX_{L3C}, PilX_{Y27C} sont capables de former des homodimères de taille inférieure à celles de l'hétérodimère et ceci même en l'absence du variant PilE. La disparition des dimères en présence de DTT confirme que les dimères sont formés par des ponts disulfures (données non montrées). La formation de l'hétérodimère est spécifique de la position des cystéines puisque les couples PilE_{V10C}/PilV_{Y27C} et PilE_{V10C}/PilX_{Y27C} ne forment pas d'hétérodimères. De plus, nous avons testé les couples de résidus qui permettent la formation de multimères dans le SST2 de *K. oxytoca* (Campos et al., 2010, Cisneros et al., 2012a). Ces couples PilE_{V10C}/PilV_{L16C} et PilE_{V10C}/PilX_{L16C} ne forment pas non plus d'hétérodimères, indiquant que les paramètres d'hélicité du SST2 sont différents de ceux des PT4. L'ensemble de ces résultats indique que les pilines mineures PilV et PilX sont capables d'interagir avec la piline majeure PilE dans une structure hélicoïdale.

Pour explorer le processus qui aboutit à l'interaction entre PilE/PilX et PilE/PilV, nous avons testé le pontage disulfure dans des mutants *pilF*, *pilD* et *pilM*. Ces souches sont mutées dans des gènes indispensables à la biosynthèse des pili et n'expriment donc pas de pili à leur surface. Malgré l'absence de piliation, le pontage disulfure entre PilE et PilV fonctionne avec la même efficacité qu'en présence d'une machinerie fonctionnelle (Figure 29C). Des résultats similaires ont été obtenus pour le pontage disulfure entre PilE et PilX (données non illustrées). Ce résultat indique que l'interaction entre les pilines mineures et PilE est indépendante de l'assemblage des pili et intervient en amont de celui-ci. Il est possible en effet que les pilines mineures agissent comme des chaperonnes et s'associent avec la piline majeure PilE avant même son assemblage. D'ailleurs, l'association des pseudopilines I, J et K précède également l'assemblage de la fibre (Cisneros et al., 2012a). Cependant, il reste surprenant d'obtenir un pontage dans un mutant *pilD* où les deux pilines sont bloquées dans la membrane interne. En effet, en absence de clivage, les pilines ne peuvent pas se déplacer en hauteur dans la membrane interne puisqu'elles sont retenues par leur séquence signal hydrophile exposée dans le cytosol. Il est donc possible que ces résultats reflètent plutôt la formation d'hétérodimères non spécifique due à un défaut technique. L'analyse de contrôles supplémentaires qui sont en cours de réalisation sera nécessaire pour interpréter ces résultats étonnants.

Au vu de ces résultats, nous souhaitons tester le pontage disulfure entre PilE et les pilines mineures lorsque l'une d'entre elles porte la mutation G-1→N pour pouvoir bloquer spécifiquement une des pilines dans la membrane interne. De plus, nous avons analysé le modèle de pilus de *N. gonorrhoeae* et identifié de nouveau résidus susceptibles d'être en interaction au sein de la fibre. En effet, les couples de résidus Leu6/Iso12, Leu6/Val13, Leu6/Leu16 et Val9/Leu16 ont été identifiés comme étant potentiellement en interaction (Campos et al., 2010). Tous ces résidus étant enfouis dans la membrane interne, la substitution des ces résidus par des cystéines limitera la formation de ponts disulfures non spécifiques.

4. Rôle de la piline mineure ComP sur la biogénèse des pili

Au vu du rôle des pilines mineures PilV et PilX sur la biogénèse des pili, nous nous sommes interrogés quant au rôle que pourrait exercer la troisième piline mineure, ComP. Cette piline est requise pour la compétence pour la transformation d'ADN, puisqu'un mutant *comP* est 1000 fois moins compétent. Cette piline fixe l'ADN et est requise pour son transport à travers la membrane externe (Aas et al., 2002b, Cehovin et al., 2013).

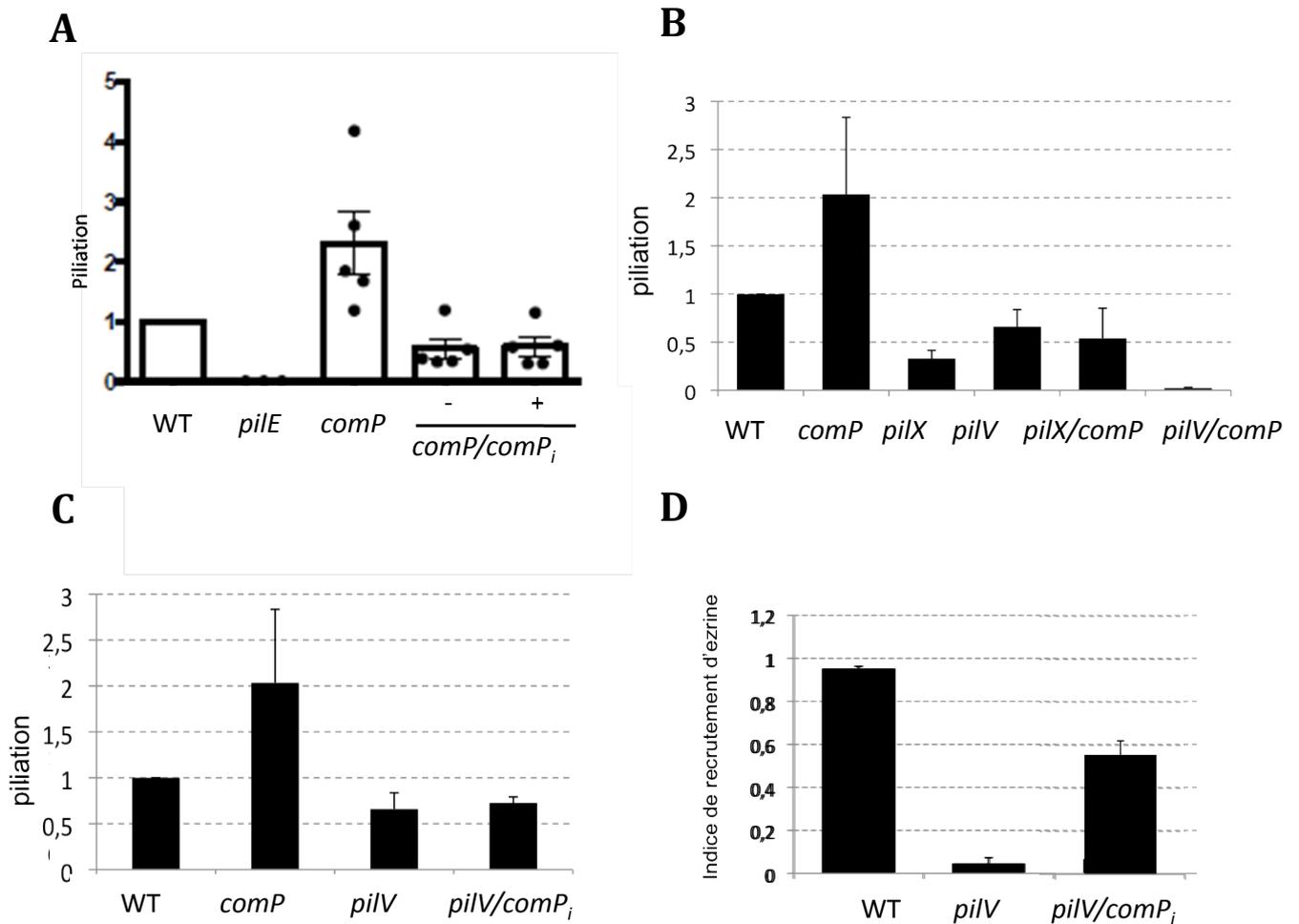


Figure 30 : Rôle de la piline mineure ComP dans la biogenèse des pili

A. Quantification des pili exprimés en surface par les souches *comP* et *comP/comP_i* par ELISA. Les expériences ont été répétées 5 fois. **B.** Quantification des pili exprimés en surface par les souches *comP*, *pilX/comP* et *pilV/comP* par ELISA. Les expériences ont été répétées 5 fois. **C et D.** Effet de la surexpression de ComP dans un contexte *pilV*. **C.** Quantification des pili exprimés en surface des bactéries par ELISA. Les expériences ont été répétées 5 fois. **D.** Fréquence de recrutement d'ezrine après deux heures d'infection.

Nous avons mesuré la quantité de pili exprimés par un mutant *comP* et dans la souche complémentée *comP/comP_i* dans laquelle la copie sauvage du gène *comP*, placé sous le contrôle d'un promoteur régulable par l'IPTG, est introduite dans une région intergénique du génome d'une souche *comP*. Nous avons quantifié la piliation par ELISA. Par cette technique, nous avons mesuré que la quantité de pili est augmentée dans une souche *comP*, avec une piliation de 200% par rapport à la souche sauvage (Figure 30A). Ce résultat indique que, contrairement à PilX et PilV, la piline mineure ComP régule négativement la quantité de pili exprimés à la surface. Cet effet est restauré lorsque la copie sauvage d'un gène *comP* est introduite et ceci même en absence d'induction (Figure 30A).

La piline ComP jouant un rôle négatif sur la piliation, nous avons testé si l'absence de ComP pouvait restaurer la piliation des souches *pilX* et *pilV* (Figure 30B). En analysant la quantité de pili détectés par ELISA, nous avons observé que l'absence de ComP dans une souche *pilX* augmente légèrement la piliation avec 50% de pili comparé à notre souche de référence, contre 27% dans la souche *pilX*. Alors que la mutation *comP* joue un effet positif sur la piliation d'une souche *pilX*, elle inhibe totalement la piliation d'une souche *pilV*, puisque la souche *pilV/comP* est dépourvue de pili. Ce résultat suggère qu'en absence de PilV, la piline mineure ComP est nécessaire pour assurer la biogenèse des pili et jouerait dans ce cas un effet positif sur la piliation. La piline mineure ComP semble donc jouer un double rôle sur la biogenèse des pili : (i) la piline ComP est un facteur « anti-piliation » dans un contexte sauvage et (ii) la piline ComP est un facteur « pro-piliation » dans un mutant *pilV*.

Afin de comprendre l'effet paradoxal de la piline mineure ComP sur la biogenèse des pili, nous avons cette fois-ci étudié l'effet de la surexpression de ComP dans une souche *pilV*. En effet, en absence de PilV, la piline mineure ComP semble nécessaire pour assurer la biogenèse des pili. La surexpression de ComP pourrait donc restaurer la piliation d'une souche *pilV*. En mesurant la quantité de pili exprimée par la souche *pilV/comP_i* par ELISA, nous observons que celle-ci est augmentée et atteint 72% contre 61% dans une souche *pilV* (Figure 30C). Nous avons ensuite étudié l'effet de cette augmentation sur le déclenchement des voies de signalisation de la cellule hôte. La fréquence de recrutement d'ezrine de la souche *pilV/comP_i* est de 50% (Figure 30D). L'effet de la surexpression de ComP dans un mutant *pilV* sur le recrutement de la plaque corticale correspond aux valeurs attendues pour une souche exprimant 72% de pili (Article). Ce résultat confirme que la piline mineure ComP est capable de favoriser la biogenèse des pili dans un contexte *pilV*.

5. Conclusion

Ces résultats ont permis de montrer que les pilines mineures PilV et PilX exercent des fonctions non redondantes dans la biogenèse des pili. Les défauts de piliation des mutants *pilV*, *pilX* et *pilV/pilX* peuvent être compensés par l'absence de rétraction. Les pilines mineures semblent donc agir comme les pseudopilines PilH/PilI/PilJ/PilK et pourraient interagir avec PilE. En effet, nous avons observé la perte de piliation lorsque les pilines mineures sont bloquées dans la membrane interne. Ce défaut est également observé lorsqu'une certaine partie de la piline majeure PilE est bloquée dans la membrane interne. Il est possible que PilE_{G-1N} interagisse avec la machinerie des PT4 et bloque l'assemblage des pili. Afin de tester l'hypothèse selon laquelle les pilines mineures interagissent avec les pili, nous avons testé leur proximité avec PilE par une stratégie de pontage disulfure. Nos résultats suggèrent que les pilines mineures PilV et PilX sont effectivement en interaction avec PilE, mais ils doivent être confirmés par des expériences supplémentaires.

Tandis que les pilines PilV et PilX sont des protéines qui favorisent la biogenèse des pili, la piline ComP semble avoir un effet négatif sur la piliation puisque le mutant *comP* est deux fois plus pilié que la souche parentale. Cependant, cette piline est requise pour la piliation, puisque le mutant *pilV/comP* n'est plus pilié. De plus, la surexpression de la piline ComP peut partiellement restaurer les défauts de la souche *pilV*, ce qui indique que les pilines mineures ComP et PilV ont des fonctions partiellement redondantes pour la biogenèse des pili.

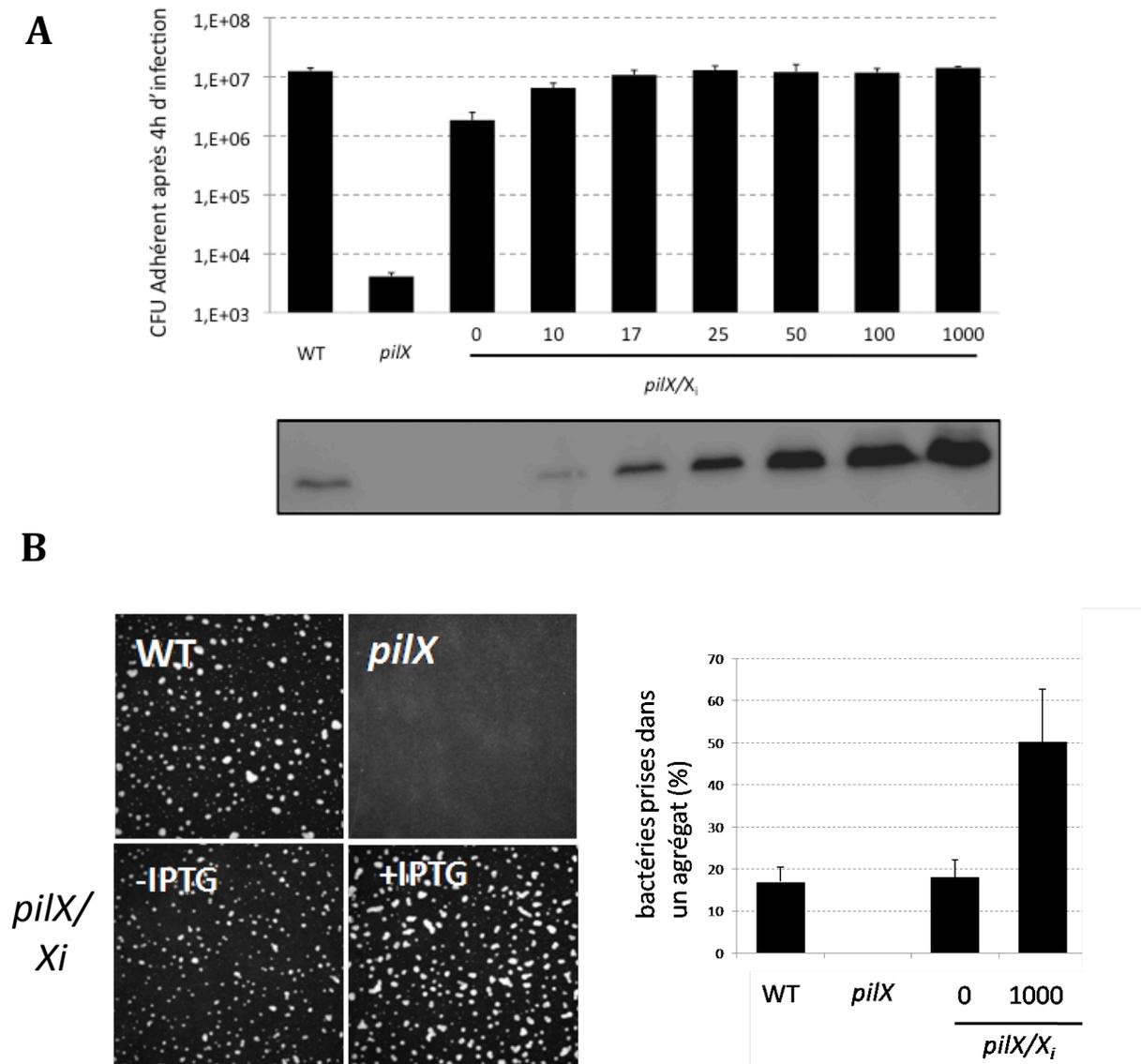


Figure 31 : Complémentation du mutant *pilX*

Complémentation de la mutation dans le gène *pilX* par l'introduction du gène *pilX* placé sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG. **A.** Contrôle de l'expression de la protéine PilX à partir des lysats totaux des différentes souches en utilisant une gamme croissante d'IPTG. **B.** Etude de l'adhésion après 4 heures d'infection. **C.** Etude de la formation d'agrégats sous 30min. Les agrégats sont visualisés grâce au marquage DAPI après homogénéisation à $DO_{600nm}=0,3$. Le volume des agrégats présents dans le champ sont déterminés grâce à Image J et le pourcentage des bactéries impliquées dans les agrégats est calculé en considérant la taille occupée par une bactérie de 4,6 μ m.

II. Etude Structure/Fonction des pilines mineures PilX et PilV

Dans la partie précédente, nous avons montré que les pilines mineures PilV et PilX assurent la stabilité des PT4 très probablement par une interaction directe avec la piline majeure PilE. Dans cette partie, nous avons réalisé une étude structure/fonction de PilV et PilX afin de comprendre les mécanismes d'action de ces pilines dans la modulation de la quantité de PT4. Cette étude nous a permis de déterminer quels étaient les domaines protéiques qui confèrent la spécificité et qui portent la fonction des pilines mineures PilV et PilX. Pour y parvenir, deux stratégies ont été employées. Rappelons que les pilines mineures PilV et PilX possèdent des caractéristiques structurales communes avec la piline majeure PilE. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous nous sommes interrogés quant aux domaines spécifiques de ces pilines en réalisant des protéines chimères entre la piline majeure et les pilines mineures PilV et PilX. Cette méthode nous a permis de déterminer que la spécificité qui existe dans les pilines mineures réside dans leur domaine globulaire. La deuxième stratégie a consisté en un crible systématique de l'ensemble des boucles présentes dans la tête globulaire de ces pilines. Les séquences ont été mutées par remplacement de huit résidus par un épitope FLAG de séquence DYKDDDDK.

1. Caractérisation de la complémentation des souches *pilX* et *pilV*

Pour étudier le mécanisme d'action des pilines mineures PilX et PilV, nous avons testé la fonctionnalité de différentes protéines mutées ou chimériques. Ces constructions, sous le contrôle d'un promoteur Lac inductible par l'IPTG, ont été introduites dans une région intergénique du chromosome d'une souche mutante *pilV* ou *pilX*. Nous avons testé si ces protéines mutées conservaient leur fonctionnalité et étaient capable de restaurer les phénotypes des mutants *pilV* ou *pilX*. En effet, lorsqu'une copie sauvage du gène *pilV* ou *pilX* est respectivement réintroduite dans un mutant *pilV* (souche *pilV/pilV_i*) ou *pilX* (souche *pilX/pilX_i*), les bactéries retrouvent un phénotype sauvage.

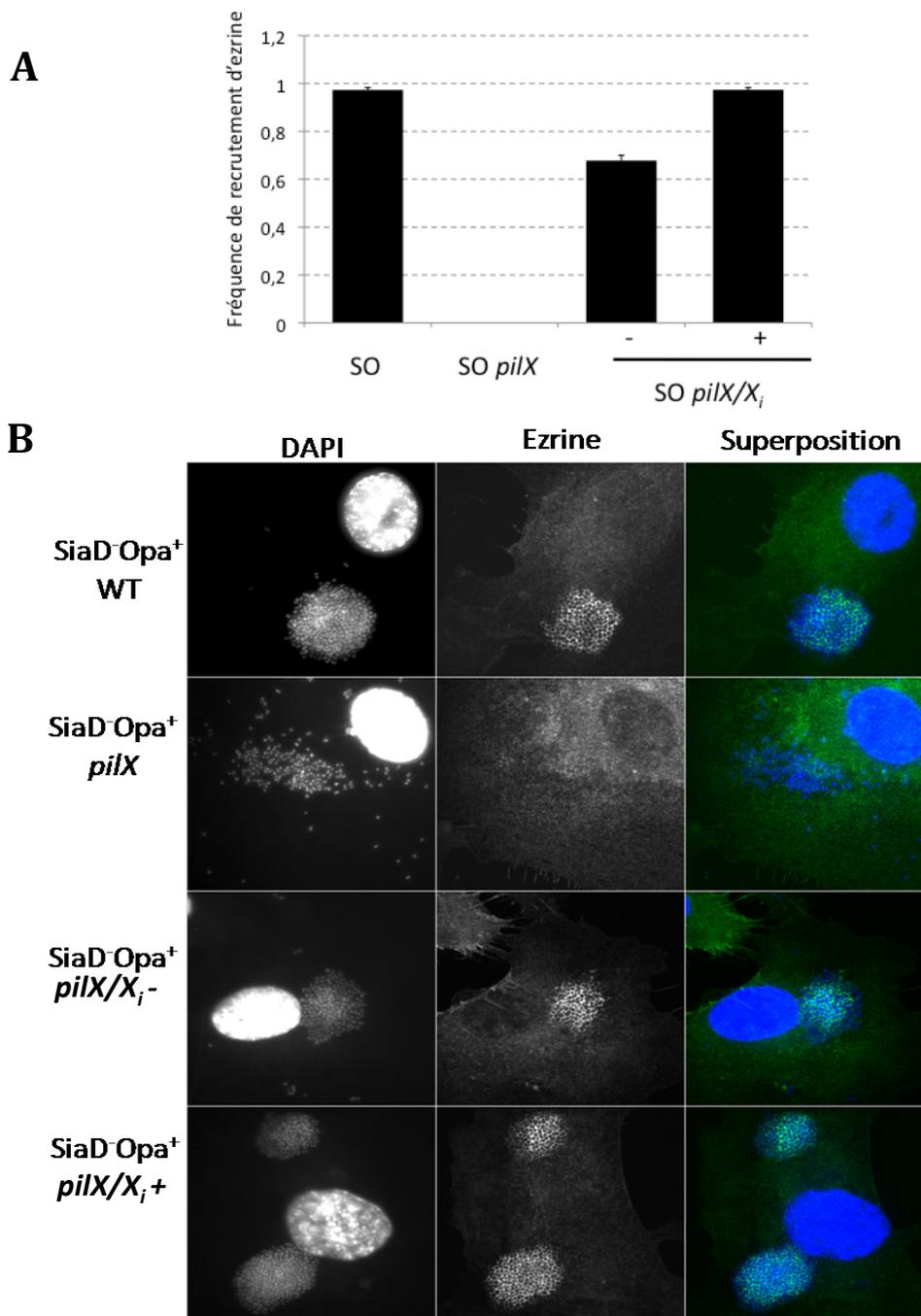


Figure 32 : Complémentation du mutant SiaD⁻Opa⁺*pilX*

Complémentation de la mutation dans le gène *pilX* par l'introduction du gène *pilX* placé sous le contrôle d'un promoteur inducible à l'IPTG. L'étude de la réponse cellulaire est réalisée dans une souche non capsulée et exprimant une adhésine Opa (SiaD⁻Opa⁺ ou SO). **A.** Fréquence de recrutement de l'ezrine. **B.** Analyse du recrutement d'ezrine en nids d'abeille caractéristiques par immunofluorescence. Marquage de l'ADN au DAPI. Marquage de l'ezrine par immunofluorescence

a) Complémentation d'une souche *pilX*

Un mutant *pilX* ne forme pas d'agrégats bactériens, présente une diminution d'adhérence d'un facteur 1000 par rapport à la souche parentale et n'induit aucun recrutement d'ezrine (Helaine et al., 2005, Brissac et al., 2012). L'étude phénotypique d'une souche complémentée *pilX/pilXi* montre que peu de protéine PilX est requise pour induire les fonctions associées aux PT4 telles que l'agrégation, l'adhérence et le déclenchement des voies de signalisation (Figure 31 et 32). En effet, l'adhésion de la souche *pilX/pilXi* est augmentée par un facteur 5,7 en absence d'induction par l'IPTG et atteint des valeurs similaires à la souche parentale dès 17 μ M d'IPTG, induction permettant d'exprimer autant de protéine que la souche parentale (Figure 31A). En étudiant l'agrégation, on observe qu'en absence d'IPTG, 18,1% des bactéries d'une souche *pilX/pilXi* sont comprises dans un agrégat contre 16,9% pour la souche parentale. En présence d'1mM d'IPTG, l'état d'agrégation des bactéries est plus important puisque 50,3% des bactéries font partie d'un agrégat (Figure 31B). Pour étudier l'induction des voies de signalisation par un mutant *pilX*, nous utilisons une souche non capsulée exprimant une adhésine OpaB (SiaD-Opa⁺) pour favoriser l'adhésion des bactéries (Brissac et al., 2012). Comme pour l'adhésion et l'agrégation, l'introduction d'une copie sauvage de *pilX* permet de restaurer partiellement le déclenchement de la réponse cellulaire d'une souche SiaD-Opa⁺*pilX* avec une fréquence de recrutement d'une valeur de 67,8% en absence d'induction. En présence de 1mM d'IPTG, la souche SiaD-Opa⁺*pilX/pilXi* recrute l'ezrine avec une fréquence de 97,3%, similaire à la souche parentale (Figure 32A et 32B).

Pour une raison de simplicité, nous avons testé toutes les formes mutées de PilX en absence et en présence d'1mM d'IPTG. Ceci nous permet de connaître le degré de fonctionnalité de ces protéines et de les classer en trois catégories. En effet, les formes mutées de PilX qui complémentent un mutant *pilX* de la même façon que la forme sauvage seront considérées comme étant fonctionnelles, les protéines efficaces uniquement en présence de 1mM d'IPTG seront considérées comme étant partiellement fonctionnelles, tandis que les protéines qui présentent un défaut phénotypique même en présence d'IPTG seront considérées comme étant non fonctionnelles.

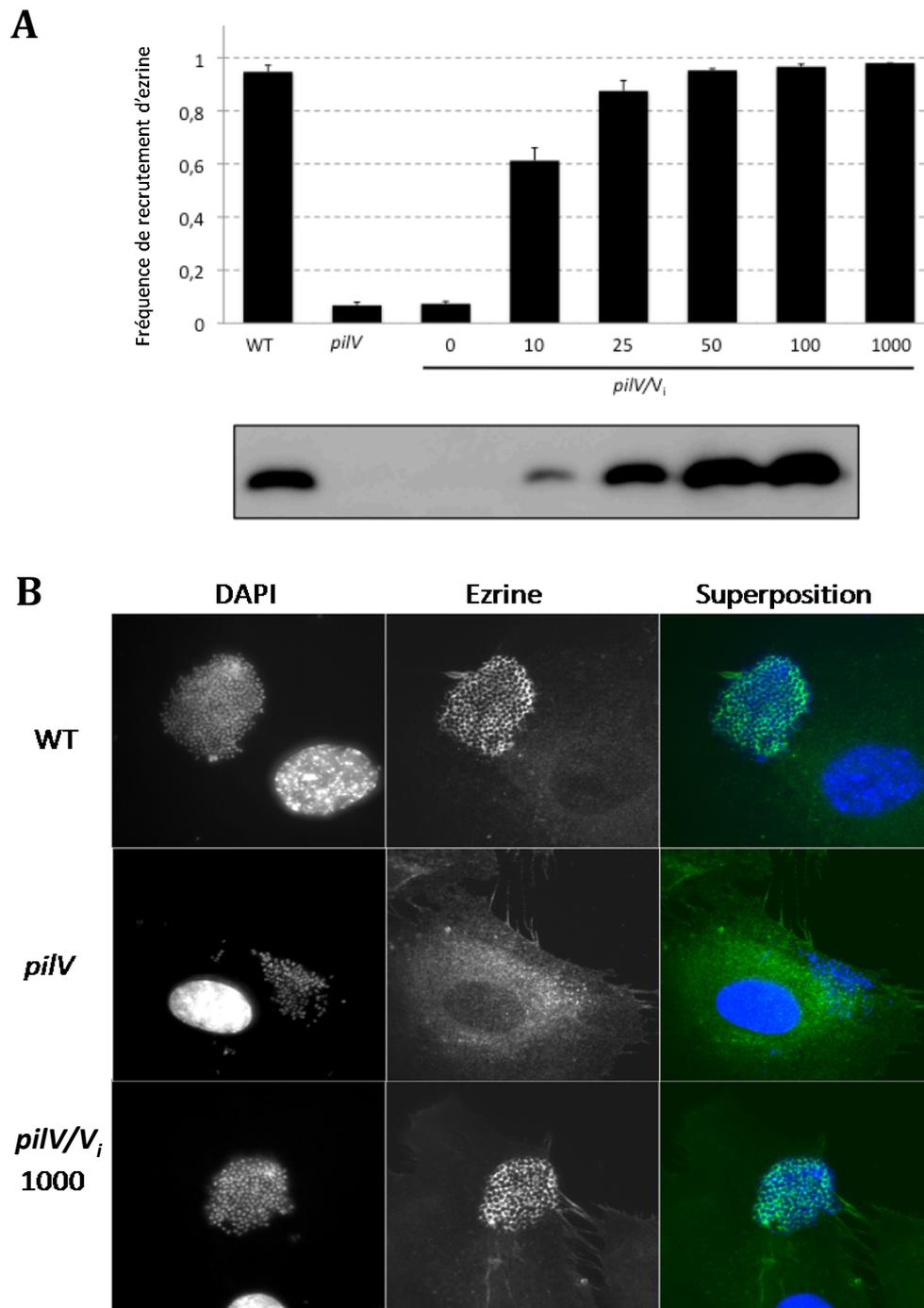


Figure 33 : Complémentation du mutant *pilV*

Complémentation de la mutation dans le gène *pilV* par l'introduction du gène *pilV* placé sous le contrôle d'un promoteur inducible à l'IPTG. **A.** Fréquence de recrutement de l'ezrine et contrôle de l'expression de la protéine PilV par Western Blot. **B.** Analyse du recrutement d'ezrine en nids d'abeille caractéristiques par immunofluorescence. Marquage de l'ADN au DAPI. Marquage de l'ezrine par immunofluorescence.

b) Complémentation d'un mutant *pilV*

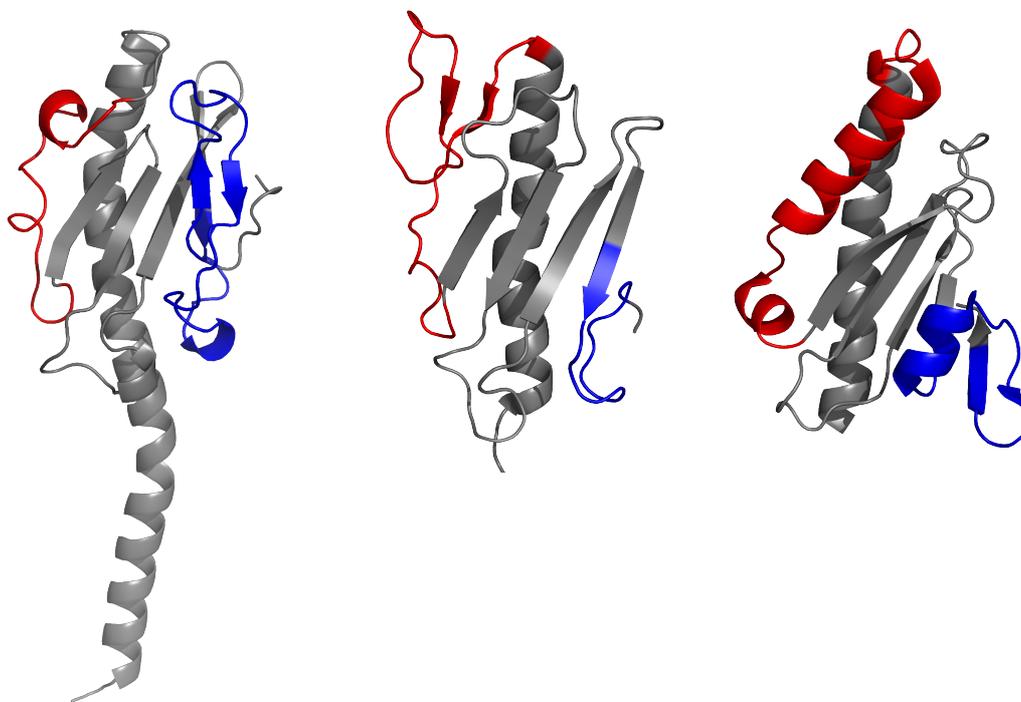
Un mutant n'exprimant plus la protéine PilV présente un défaut important dans l'établissement d'une réponse cellulaire (Mikaty et al., 2009). Alors que les microcolonies formées par la souche parentale induisent un recrutement intense de l'eZRine avec une fréquence de 92%, seul 10% des microcolonies d'une souche *pilV* sont capables d'initier la formation d'un nid d'abeille (Figure 33A et 33B). Dans ce cas d'ailleurs, l'accumulation de la protéine eZRine est faible et la plaque corticale apparaît incomplète. En faisant varier la concentration d'IPTG, nous observons que les microcolonies formées par la souche *pilV/pilV_i* induisent la formation de plaques corticales proportionnellement à la quantité de protéine PilV exprimée. En présence d'1mM d'IPTG, la souche *pilV/pilV_i* recrute l'eZRine avec une fréquence de 95%. Cependant, en absence d'inducteur, cette souche se comporte comme un mutant *pilV* et induit un remodelage de la membrane plasmique dans seulement 10% des cas (Figure 33A et 33B).

Nous avons donc choisi d'étudier la fonctionnalité des différentes formes mutées de PilV en présence de 1mM d'IPTG.

2. Détermination des régions spécifiques aux pilines mineures PilV et PilX

Afin de comprendre le mécanisme d'action des pilines mineures, nous avons essayé de déterminer les régions protéiques nécessaires à leurs fonctions. Nous savons que les pilines mineures PilV et PilX présentent de nombreuses caractéristiques communes avec la piline majeure PilE. Ces similitudes sont tout d'abord observées au niveau de la séquence peptidique de ces protéines : les trente premiers résidus sont en effet très conservés entre PilE et les pilines mineures PilV et PilX (Figure 34). De plus, comme l'ensemble de pilines de type IV, ces protéines possèdent en région C-Terminale deux cystéines capables de former des ponts disulfures. La structure tridimensionnelle de PilX, obtenue par cristallographie aux rayons X montre également que l'architecture globale de ces protéines est similaire. Pourtant ces protéines jouent des rôles différents. Nous avons donc généré une série de protéines chimères entre PilE et les pilines mineures PilV et PilX et testé leur fonctionnalité dans les souches mutées dans le gène *pilV* ou *pilX*. Les représentations des protéines chimères générées sont visibles sur les figures 35A et 36A.

A



B

		10	20	30	
	↓				
PilX	MMSNKMEQKGF	TLIEMMIVVAILGIISVIAIPSYQSYIEKGYQS	QLYTEMVGINNISKQF		60
PilV	---MKNVQKGF	TLELMIAVAILGILTLITYPSYKTYIRR	VRLSEVRTLLHNAQT	MERY	57
Pile	---MNTLQKGF	TLIELMIVIAIVGILAAVALPAYQDY	TARAQVSEAILLAEGQSAVTEY		57
	:	*****:***:**:**: :: *:* * :	*:	.	::
PilX	ILKNPLDDNQT	IKSKLERFVSGYKMPKIAEKYNVSVHFVNKEK	PRAYSLVGVPKTGTGY		120
PilV	YRQK-----	GTFKTYDKNKLKQNKYFNVTLSKVS---	PDHFTLQADPNP----		98
Pile	YLNHG-----	EWPGDNSSAGVATSADIKGKYVQSVTVANGVITAQ	MASSNVNNEIKSK		110
	::	:	.	:	::
PilX	TLSVWMNSVGD	GKCRDAASARAHLETLS	SDVGCEAF	SNRKK-----	162
PilV	-----	TTNDGETCVVTLNDGGT	IAASGTNQSCP	GF-----	129
Pile	KL	SLWAKRQNGSVKWF	CGQPVTRTTATATD	VAAANGKTDDKINTKHL	PSTCRDDSSAS 168
	:

Figure 34 : Caractéristiques des pilines mineures

A. Structure des pilines Pile de *N. meningitidis*, PilA de *P. aeruginosa* et PilX de *N. meningitidis*. La région α/β est colorée en rouge, tandis que la région D est colorée en bleu. Représentation réalisée à partir du logiciel MacPyMOL. Les références de la banque PDB sont 2OPD pour PilX et 1DZO pour PilA. **B.** Alignement des séquences des pilines Pile, PilV et PilX de *N. meningitidis* par le logiciel ClustalW.

a) L'hélice α transmembranaire peut être substituée entre les pilines

Les pilines présentent une homologie de séquence dans leurs trente premiers résidus. En réalisant un alignement de ces séquences à l'aide du logiciel ClustalW, nous observons respectivement 53% et 50% d'identité de séquences entre la piline majeure PilE et les pilines mineures PilX et PilV au niveau des trente premiers résidus. Même si ces séquences sont homologues, il n'est pas impossible que de petites variations soient en réalité responsables de la spécificité existant au sein de ces pilines (Figure 34). En effet, nous pouvons par exemple imaginer que cette région détermine la localisation des protéines ou permet d'éventuelles interactions protéiques impliquées dans les fonctions particulières des pilines mineures. D'ailleurs, au vu de nos résultats présentés dans la première partie, cette région semble responsable de l'interaction des pilines mineures avec PilE. Nous nous sommes donc demandé si ce domaine N-Terminal pouvait porter tout ou une partie de la fonction des pilines mineures. Pour répondre à cette question, nous avons généré les protéines PilE₂₂V et PilE₂₂X. Ces protéines possèdent les premiers résidus de l'hélice α de PilE jusqu'à la proline 22 qui est conservée au sein des pilines, la suite de la protéine correspondant respectivement à la séquence de PilV et de PilX. S'il existe une spécificité au niveau de cette région entre les pilines, ces protéines ne pourront pas restaurer la fonction des mutants *pilV* et *pilX*.

En présence d'1mM d'IPTG, la souche *pilV/pilE₂₂V_i* induit un recrutement de la plaque corticale similaire à la souche parentale (Figure 36B et 36C). De même, la souche *pilX/pilE₂₂X_i* se comporte comme la souche *pilX/pilX_i* tant au niveau de l'adhérence, de l'agrégation que du remodelage de la membrane plasmique (Figure 35B, 35C et 35D). Les deux protéines PilE₂₂V et PilE₂₂X sont donc fonctionnelles. La région correspondant à l'hélice α transmembranaire peut ainsi être substituée entre les pilines sans affecter leur fonction, suggérant ainsi que la spécificité des pilines mineures ne réside pas dans les premiers résidus.

b) Le domaine globulaire forme un domaine fonctionnel

Nous avons poursuivi notre étude sur la partie C-Terminale composée du feuillet β , de la boucle α/β et de la région D. En effet, en comparant la structure des pilines, nous pouvons noter d'importantes différences au niveau de la boucle α/β située entre l'hélice α N-Terminale et le feuillet β et au niveau de la région D (Figure 34). De plus, nous avons montré que la spécificité des pilines mineures ne réside pas dans l'hélice α , ce qui suggère un rôle de la région globulaire. Par conséquent, nous avons généré les protéines PilEgloV/PilEgloX qui sont formées par

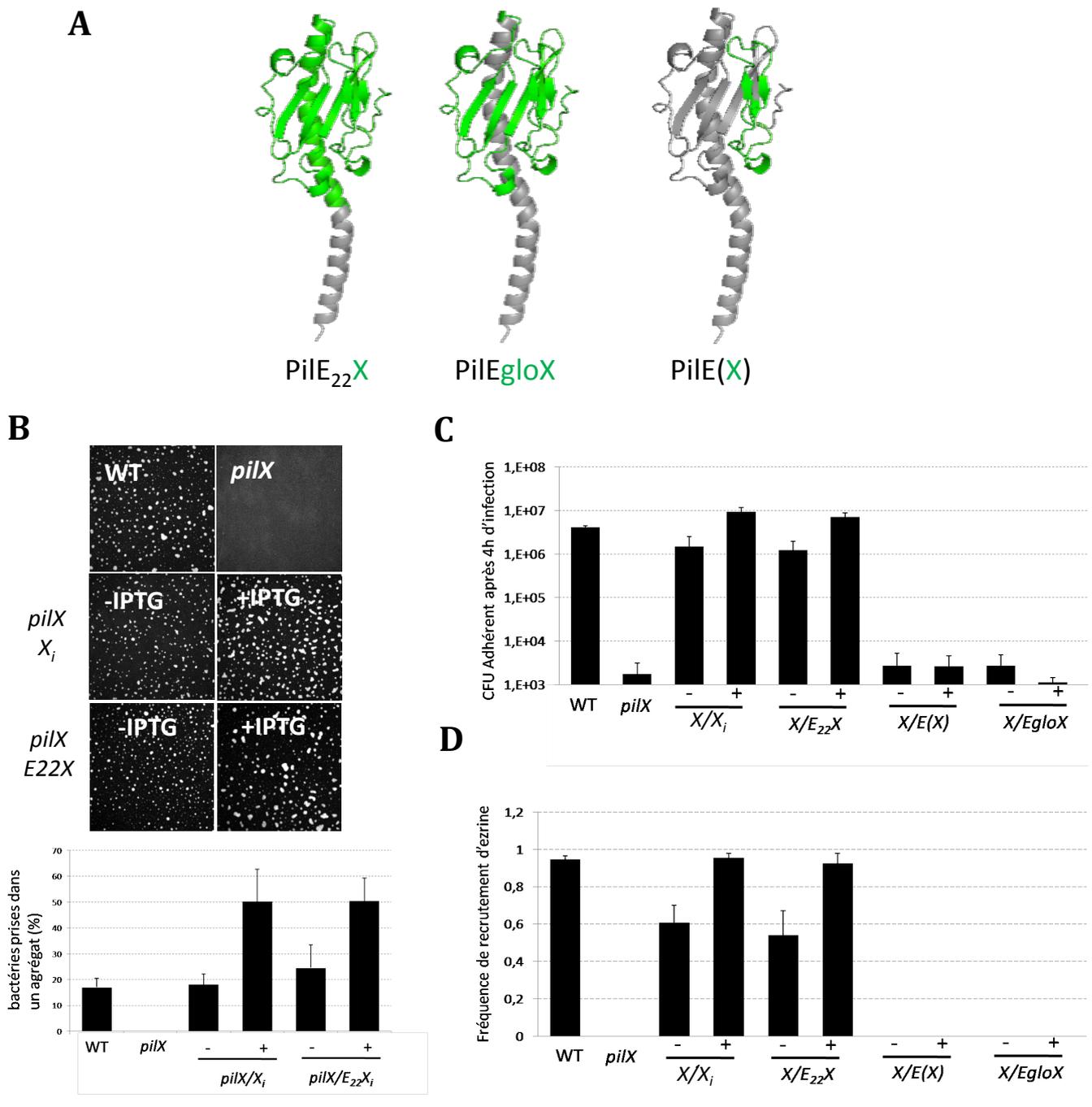


Figure 35 : Etude de la spécificité de la piline mineure PilX

Complémentation de la mutation dans le gène *pilX* par l'expression de protéines chimériques constituées d'un domaine de PilE et de PilX. **A.** Représentation des constructions chimériques testées. La séquence protéique de PilE est affichée en gris et celle de PilX en vert. **B.** Etude de la formation d'agrégats sous 30min. Les agrégats sont visualisés grâce au marquage DAPI après homogénéisation à $DO_{600nm}=0,3$. Le pourcentage de bactéries comprises dans un agrégation est mesurée par Image J. **C.** Etude de l'adhésion après 4 heures d'infection. **D.** Fréquence de recrutement de l'ezrine dans les souches SiaD⁻Opa⁺.

l'assemblage de l'hélice α N-Terminale de PilE et du domaine globulaire de PilV ou PilX (Figure 35A et 36A).

L'expression de la protéine chimérique PilEgloV ne permet pas de restaurer un phénotype sauvage d'une souche déficiente pour le gène *pilV*: aucun recrutement d'ezrine n'est observé sous les microcolonies formées par la souche *pilV/pilEgloV_i* (Figure 36B). La protéine PilEgloX est également incapable de compléter une souche mutée dans le gène *pilX* (Figure 35C et 35D). Ces résultats sont surprenants car nous avons préalablement montré que l'hélice α n'était pas spécifique aux pilines mineures, ce qui signifie que la spécificité des pilines mineures se trouve en aval de cette hélice. En regardant de plus près les structures de PilE et de PilX, nous pouvons observer qu'il existe des interactions entre les résidus présents dans l'hélice α 1C et les résidus de la boucle α/β et du feuillet β . Il est donc très probable que ces interactions ne soient plus permises dans les protéines chimères PilEgloV et PilEgloX et que ces formes mutées présentent alors un défaut de stabilité ou de conformation. Il semble donc que le feuillet β et l'hélice α 1C ne soient pas dissociables et forment un domaine fonctionnel.

c) La région D n'est pas suffisante pour assurer la fonction des pilines mineures

Une troisième région que nous voulions cibler est la région disulfure, ou région D. Il existe en effet plusieurs exemples de pilines exerçant leur fonction par le biais de cette région D. Tout d'abord la piline PilA de *P. aeruginosa* semble interagir directement avec les récepteurs glycolipidiques Asialo-GM1 et GM2 (Hazes et al., 2000). De plus, il a été montré que la séquence de la région D de PilE, soumise à variation antigénique, pouvait moduler l'adhérence du méningocoque aux cellules humaines (Nassif et al., 1993, Marceau et al., 1995) Dans le cas de PilX, nous pouvons remarquer que la région D présente une structure très particulière en forme de « crochet » orienté vers le bas. Il a été d'ailleurs précédemment montré que cette région joue un rôle essentiel dans la fonction de PilX et que la délétion de douze résidus sur les dix-huit présents dans cette région abolit la fonction de PilX (Helaine et al., 2007). Si ces régions semblent importantes dans la fonction des pilines, elles pourraient être suffisantes pour assurer ces fonctions. Dans ce cas, la structure en hélice α et en feuillet β des pilines permettrait d'exposer et de présenter la région D pour qu'elle puisse exercer les fonctions des pilines mineures. Afin de tester cette hypothèse, nous avons généré les protéines PilE(V) et PilE(X) permettant d'utiliser la piline PilE comme présentatrice de la région D des pilines mineures PilV et PilX. Ces protéines chimères permettent de vérifier si la région D est suffisante pour induire les fonctions associées aux pilines mineures.

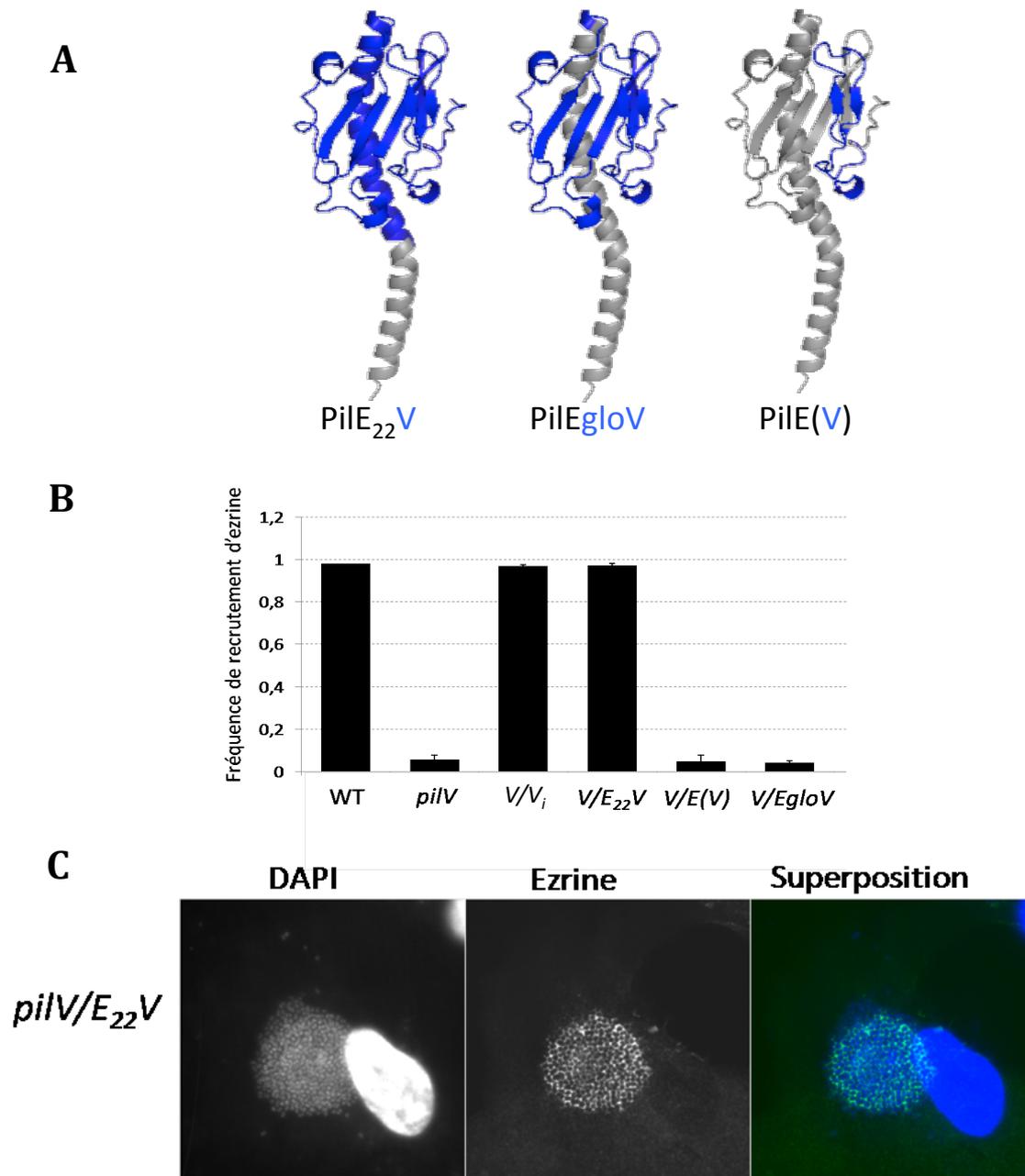


Figure 36 : Etude de la spécificité de la piline mineure PiIV

Complémentation de la mutation dans le gène *pilV* par l'expression de protéines chimériques constituées d'un domaine de PiE et de PiIV. **A.** Représentation des constructions chimériques testées. La séquence protéique de PiE est affichée en gris et celle de PiIV en bleu. **B.** Fréquence de recrutement de l'ezrine des différentes souches. **C.** Analyse du recrutement d'ezrine en nids d'abeille caractéristiques par immunofluorescence.

L'expression de la protéine PilE(V) ne permet pas de compléter une souche *pilV*. En effet, la souche *pilV/pilE(V)_i* présente un défaut de recrutement de la plaque corticale équivalent à un mutant *pilV* (Figure 36B). La souche *pilX/pilE(X)_i* reste non agrégative et non adhérente, et ceci même en surexprimant la forme chimérique (Figure 35B et 35C). De plus, les microcolonies de la souche *SiaD-Opa+pilX/pilE(X)_i* ne déclenchent pas la formation de la plaque corticale (Figure 35D). Par conséquent, la région D n'est pas suffisante en elle-même pour exercer les fonctions des pilines mineures. Cette région est nécessaire pour que la protéine PilX exerce ses fonctions, mais il existe donc d'autres domaines nécessaires. Cependant, il est important de noter que pour l'instant le rôle de cette région pour la protéine PilV n'a pas encore été exploré.

L'ensemble de ces résultats basés sur l'étude de la fonctionnalité de protéines chimères montre que l'hélice $\alpha 1$ n'est pas spécifique des pilines mineures et que la région globulaire est très certainement responsable de cette spécificité. Cependant la région D n'est pas la seule région nécessaire à la fonction de ces pilines. Nous avons donc poursuivi notre étude en réalisant une série de substitutions au niveau de la région globulaire, afin d'identifier toutes les régions nécessaires aux fonctions des pilines mineures.

3. Etude du rôle des boucles des pilines mineures

Grâce à l'analyse des protéines chimériques, nous avons pu déterminer que la spécificité des pilines mineures réside dans la région globulaire de ces protéines en partie C-Terminale. Dans cette partie, nous nous intéresserons à déterminer quels sont les domaines à l'intérieur de cette région globulaire qui portent la fonction des pilines mineures afin d'en décrypter le mécanisme d'action à l'échelle moléculaire. Pour y parvenir, nous avons opté pour une stratégie de substitution plutôt que de réaliser des séries de délétions qui pourraient affecter la structure globale de la protéine en y ajoutant des contraintes structurales. De plus, nous avons choisi de cibler uniquement les boucles comprises entre les structures secondaires des protéines, toujours dans le but de conserver la structure globale de la protéine la plus intacte possible. Même si la région D présente des structures secondaires, nous avons tout de même ciblé cette séquence, car nous savons par de nombreux exemples que cette région est nécessaire à la réalisation de plusieurs fonctions (voir paragraphe précédent). Finalement, nous avons substitué huit résidus par une étiquette FLAG.

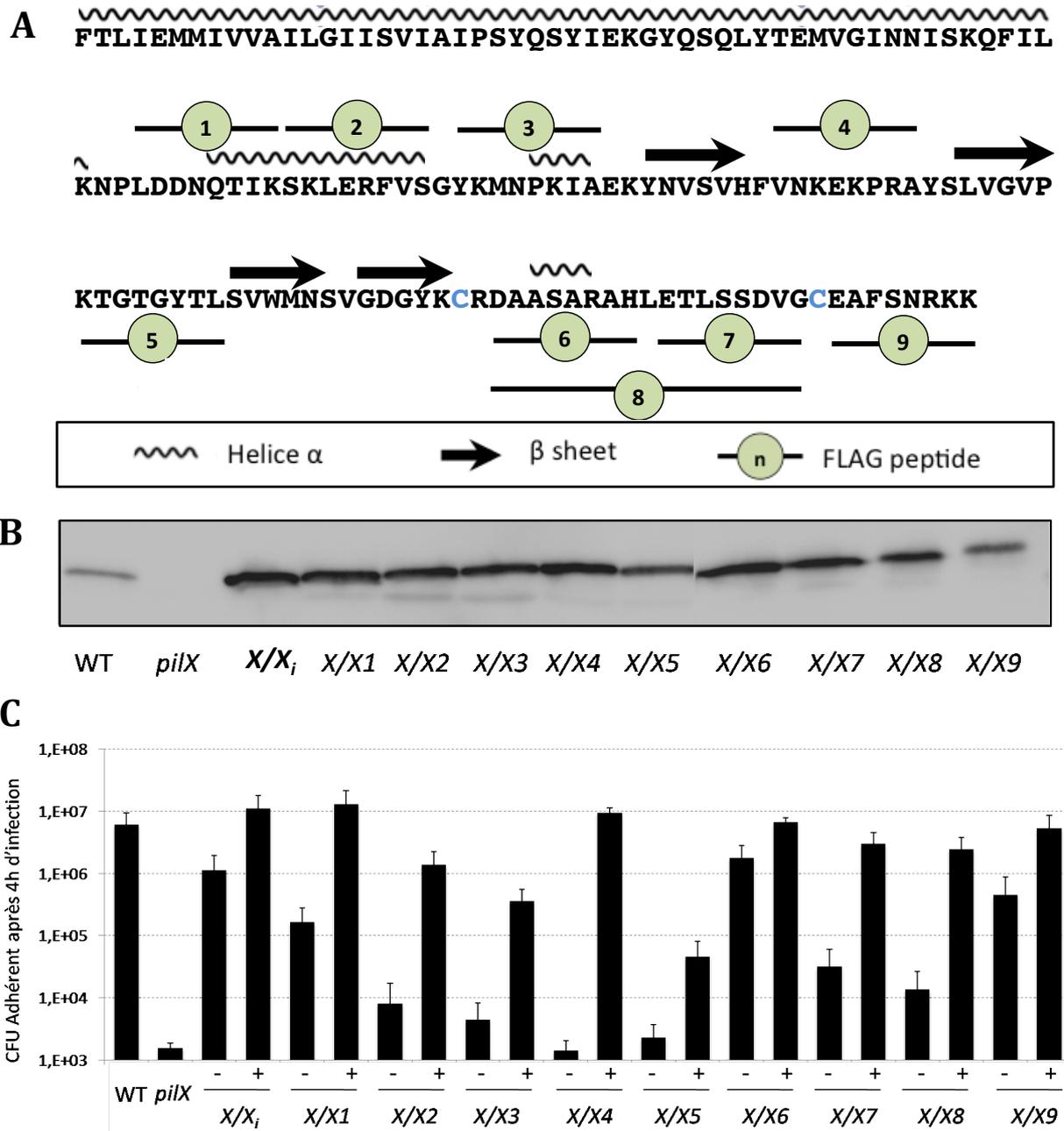


Figure 37 : Etude du rôle des boucles de la piline mineure PilX (partie 1)

Complémentation de la souche *pilX* par l'expression des formes mutées de PilX par une insertion Flag avec 1mM d'IPTG ou sans. **A.** Séquence et structures secondaires de PilX. Les séquences substituées par un peptide FLAG sont numérotées de 1 à 9. **B.** Contrôle de l'expression de ces protéines à partir de lysats totaux par immuno-détection de la protéine PilX après électrophorèse sur gel d'acrylamide. **C.** Etude de l'adhésion sur les cellules endothéliales après 4 heures d'infection.

a) Etude structure/fonction de PilX

Dans le cas de la protéine PilX, nous avons ainsi généré neuf protéines présentant une substitution de huit résidus par la séquence FLAG. Ces protéines seront nommées PilX1 à PilX9. La localisation de ces délétions-insertions est répertoriée dans la figure 37A et résumée ci-dessous :

- Les protéines PilX1 à PilX3 présentent une substitution par le peptide FLAG au niveau de la boucle α/β comprise entre l'hélice α et le feuillet β .
- La protéine PilX4 possède une substitution FLAG dans la boucle $\beta1/\beta2$.
- La protéine PilX5 présente une substitution FLAG dans la boucle $\beta2/\beta3$.
- Les protéines PilX6 et PilX7 ont une substitution FLAG respectivement dans la partie N-Terminale et C-Terminale de la région D. La protéine PilX8, quant à elle, possède deux peptides FLAG consécutifs permettant de remplacer la totalité de la région disulfure comprise entre les deux cystéines.
- La protéine PilX9 présente un peptide FLAG à la place des sept résidus terminaux.

Avant de tester la fonctionnalité de ces protéines, nous avons vérifié leur expression et leur stabilité par western blot à partir des lysats totaux obtenus après 2 heures de culture en présence de 1mM d'IPTG (Figure 37B). Nous pouvons observer que toutes les protéines PilX1 à PilX9 présentent la même stabilité que la protéine PilX sauvage et sont exprimées dans les mêmes proportions.

Ces protéines PilX1 à PilX9 ont été testées pour l'ensemble des fonctions portées par la protéine PilX à savoir l'agrégation bactérienne, l'adhérence et le déclenchement des voies de signalisation (Figure 37C, 38A et 38B).

Nous pouvons observer que les souches *pilX/X1_i*, *pilX/X7_i* et *pilX/X9_i* se comportent comme la souche *pilX/Xwt_i* en terme d'adhérence avec ou sans IPTG. Ainsi les protéines PilX1, PilX7 et PilX9 sont complètement fonctionnelles pour l'adhérence et les régions correspondant à ces substitutions ne sont donc pas impliquées dans la fonction d'adhérence. Nous pouvons également observer que les souches *pilX/X4_i*, *pilX/X6_i* et *pilX/X8_i* présentent un défaut d'adhérence en absence d'IPTG. Cependant ce défaut peut être aboli lorsque ces formes mutées sont fortement exprimées en présence de 1mM d'IPTG. Ceci suggère que ces régions substituées ne sont pas essentielles pour la fonction d'adhérence. Enfin, les souches *pilX/X2_i*, *pilX/X3_i* et *pilX/X5_i* présentent un défaut d'adhérence même en présence de fortes concentrations d'IPTG,

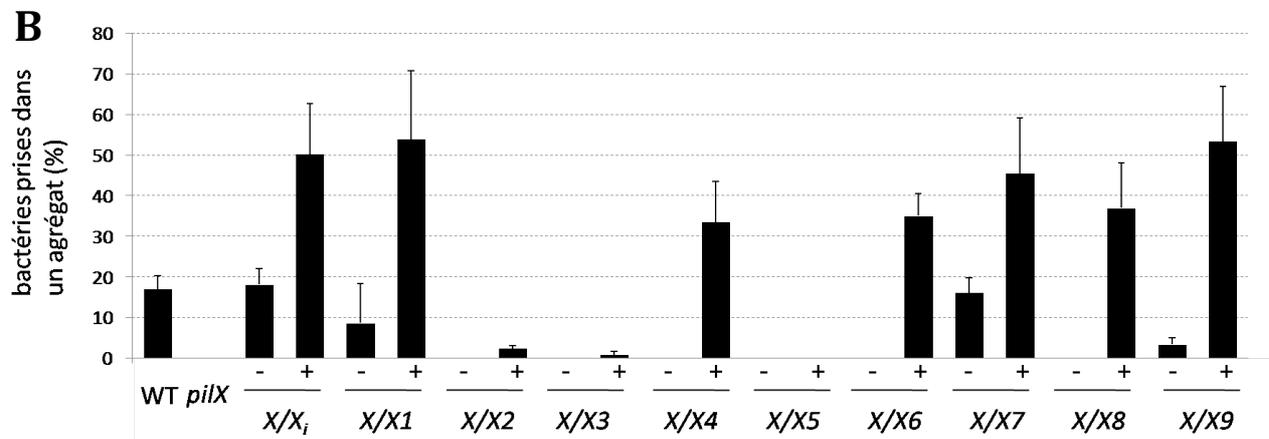
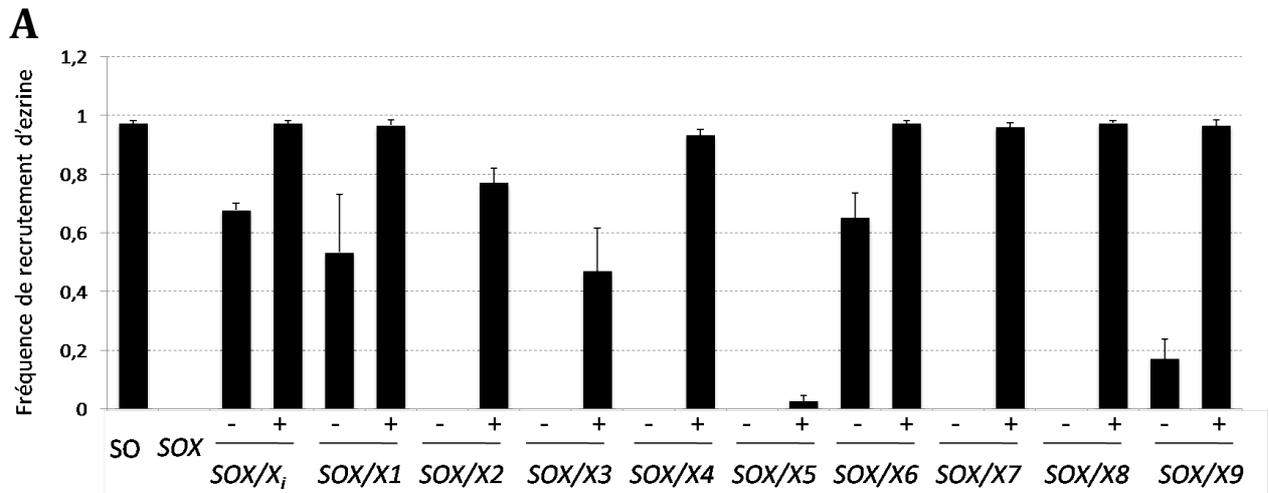
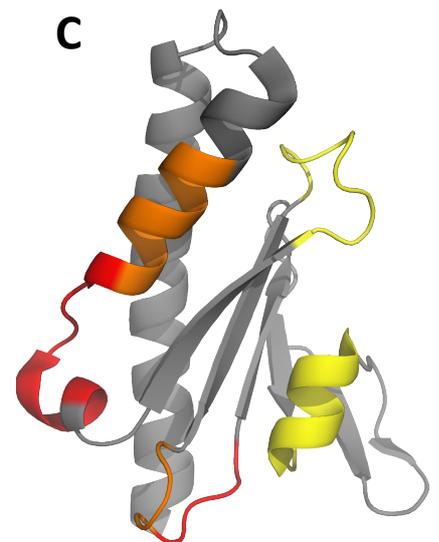


Figure 38 : Etude du rôle des boucles de la piline mineure PilX (partie 2)

Complémentation de la souche *pilX* par l'expression des formes mutées de PilX par une insertion Flag avec 1mM d'IPTG ou sans. **A.** Fréquence de recrutement de l'enzyme des différentes souches *SiaD*⁻*Opa*⁺ après deux heures d'infection. **B.** Etude de la formation d'agrégats sous 30min représentée par le pourcentage de bactéries comprises dans un agrégat. **C.** Localisation des régions protéiques nécessaires à la fonction de PilX. En rouge, les régions indispensables, en orange, les régions dont l'absence entraîne une diminution de fonctions même en présence d'IPTG et en jaune, les régions dont la mutation entraîne une perte de fonction restaurée en surexprimant PilX.



suggérant que la boucle α/β et la boucle $\beta 2/\beta 3$ jouent un rôle important dans l'adhérence des bactéries aux cellules humaines (Figure 37C).

Lorsqu'on analyse la fonctionnalité des protéines PilX1 à PilX9 pour le déclenchement des voies de signalisation et de l'agrégation bactérienne nous observons les mêmes tendances (Figure 38A et 38B). En effet, toutes les souches présentant un défaut important dans l'adhérence présentent également un défaut dans l'induction des voies de signalisation et la formation des agrégats bactériens. Par conséquent, en comparant l'ensemble de ces résultats nous pouvons montrer qu'il existe une corrélation entre les trois fonctions induites par PilX. Dans la première partie de nos résultats, nous avons pu montrer que les pilines mineures jouaient leur rôle en modulant la quantité de pili présente à la surface des bactéries. Nous avons également montré que la quantité de pili influençait l'ensemble des fonctions associées aux PT4 dépendantes des pilines mineures PilX et PilV. Il est donc logique d'observer une corrélation entre l'ensemble de ces fonctions.

Ainsi nous pouvons conclure que la région N-Terminale de la boucle α/β , la région C-Terminale de la région D et les derniers résidus C-Terminaux ne sont pas impliqués dans la fonction de PilX, tandis que les dix-sept résidus de la partie C-Terminale de la boucle α/β et la boucle $\beta 2/\beta 3$ sont essentielles à la fonction de PilX. Ces régions apparaissent en rouge sur la structure de PilX (Figure 38C).

Nous avons également montré que PilX exerce son rôle dans la piliation par une interaction directe avec la piline majeure PilE. Il est donc envisageable que ces régions permettent ou favorisent cette interaction. Il serait alors intéressant de déterminer si les constructions PilX2, PilX3 et PilX5 sont toujours capable d'interagir avec PilE en utilisant le pontage disulfure utilisé précédemment.

Il est de même intéressant de noter que les protéines PilX7, PilX6 et PilX8 restent totalement ou partiellement fonctionnelles. En effet, il a été montré par des études de délétion que la région D de PilX qui présente une structure en crochet était essentielle à la fonction de PilX. Il a été proposé que cette région soit responsable de l'agrégation par une interaction directe entre les régions disulfures de deux protéines PilX. Cependant, l'ensemble de nos résultats suggère un mode d'action de PilX totalement différent tant au niveau de la localisation de cette protéine qu'au niveau de son mode d'action.

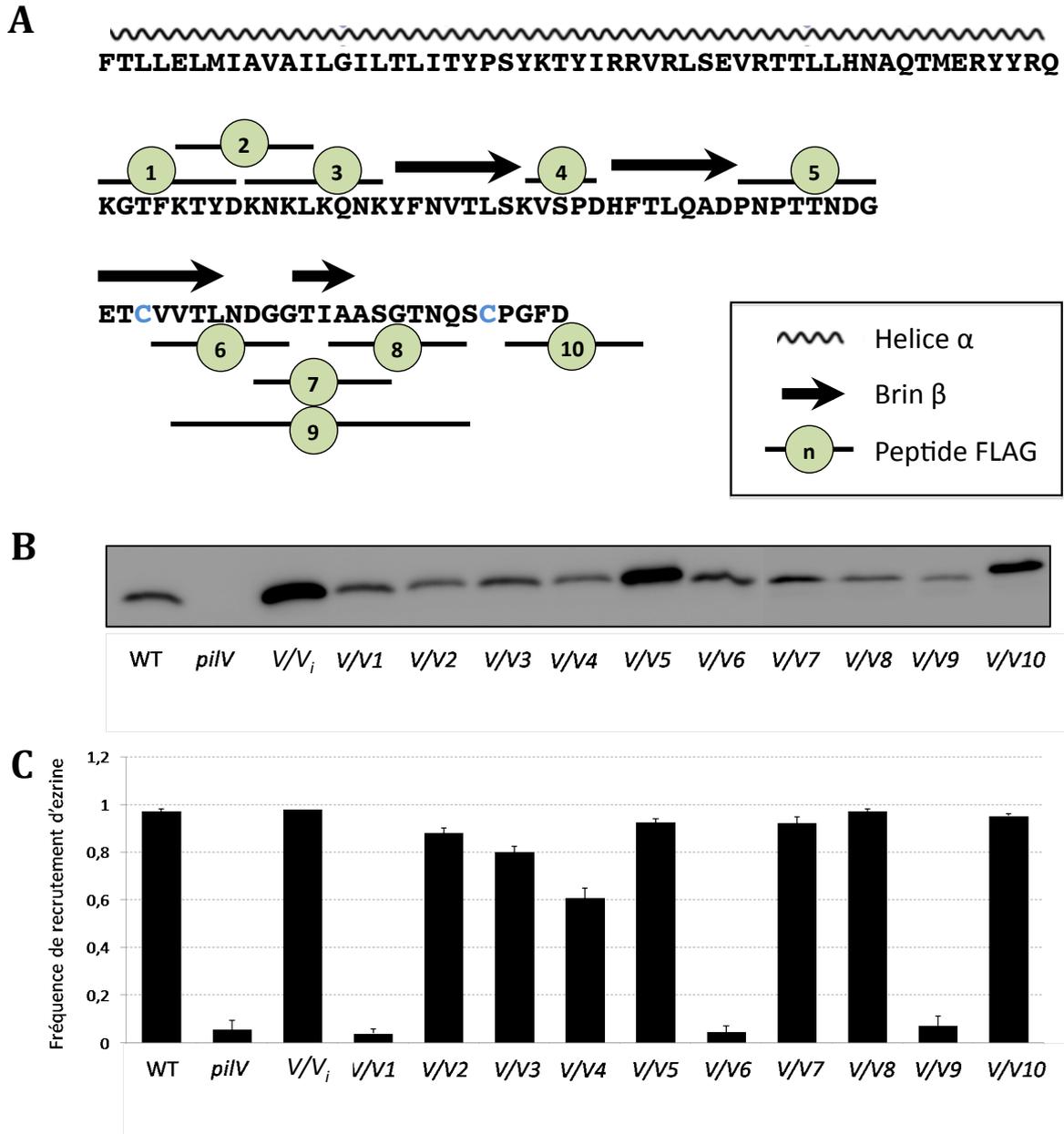


Figure 39 : Etude du rôle des boucles de la piline mineure PilV

Complémentation de la souche *pilV* par l'expression des formes mutées de PilV par une insertion Flag avec 1mM d'IPTG. **A.** Séquence et structures secondaires de PilV. Les séquences substituées par un peptide FLAG sont numérotées de 1 à 10 **B.** Contrôle de l'expression de ces protéines à partir de lysats totaux par immuno-détection de la protéine PilV après électrophorèse sur gel d'acrylamide. **C.** Fréquence de recrutement de l'ezrine des différentes souches après 2 heures d'infection.

b) Etude structure/fonction de PilV

Dans le cas de PilV, nous avons généré dix protéines différentes présentant une substitution de huit résidus par un peptide FLAG. Comme pour la protéine PilX, nous avons choisi de placer ces substitutions au niveau des boucles stabilisées par les structures secondaires, afin de ne pas générer de contraintes structurales. La structure tridimensionnelle de PilV n'ayant pas encore été résolue, nous avons dû prédire les structures secondaires de PilV. Pour y parvenir, nous avons utilisé le logiciel de prédiction de structures secondaires YASPIN accessible sur internet (<http://www.ibi.vu.nl/programs/yaspinwww/>). La localisation des délétions-insertions ainsi générées est répertoriée sur la figure 39A et résumée ci-dessous :

- Les protéines PilV1 à PilV3 présentent une substitution avec le peptide FLAG au niveau de la boucle α/β comprise entre l'hélice α et le feuillet β .
- La protéine PilV4 possède une substitution par les quatre premiers résidus du peptide FLAG à la place des quatre résidus présents dans la boucle $\beta1/\beta2$.
- La protéine PilV5 présente une substitution FLAG dans la boucle $\beta2/\beta3$.
- Les protéines PilV6, PilV7 et PilV8 ont une substitution FLAG dans la région D respectivement dans la partie N-Terminale, centrale et C-Terminale de cette région. La protéine PilV9, quant à elle, possède deux peptides FLAG consécutifs permettant de remplacer la totalité de la région disulfure comprise entre les deux cystéines.
- La protéine PilV10 présente un peptide FLAG à la place des quatre résidus terminaux.

Avant de tester la fonctionnalité de ces protéines, nous avons testé leur expression et leur stabilité par western blot à partir des lysats bactériens obtenus après 2 heures de culture en présence de 1mM d'IPTG et en utilisant un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la protéine PilV (Figure 39B). Contrairement aux formes mutées de PilX, nous observons une grande variabilité dans l'expression des protéines PilV. Seules deux protéines présentent un taux d'expression équivalent à la copie sauvage : PilV4 et PilV10. Pour les autres constructions, nous remarquons une nette diminution d'expression, cependant les quantités de protéines observées correspondent aux quantités de PilV présentes dans la souche parentale.

Nous avons ensuite testé la capacité des souches *pilV/V1_i* à *pilV/V10_i* à induire la formation de la plaque corticale en présence de 1mM d'IPTG (Figure 39C). Nous pouvons observer sur la figure 39C que les trois souches *pilV/V1_i*, *pilV/V6_i* et *pilV/V9_i* présentent un défaut de recrutement d'ezrine similaire à la souche *pilV*, alors que les autres souches induisent un recrutement de la plaque corticale avec une fréquence supérieure à 60%. Ces résultats indiquent d'une part que les huit premiers résidus de la région D sont nécessaires à la fonction de PilV, et

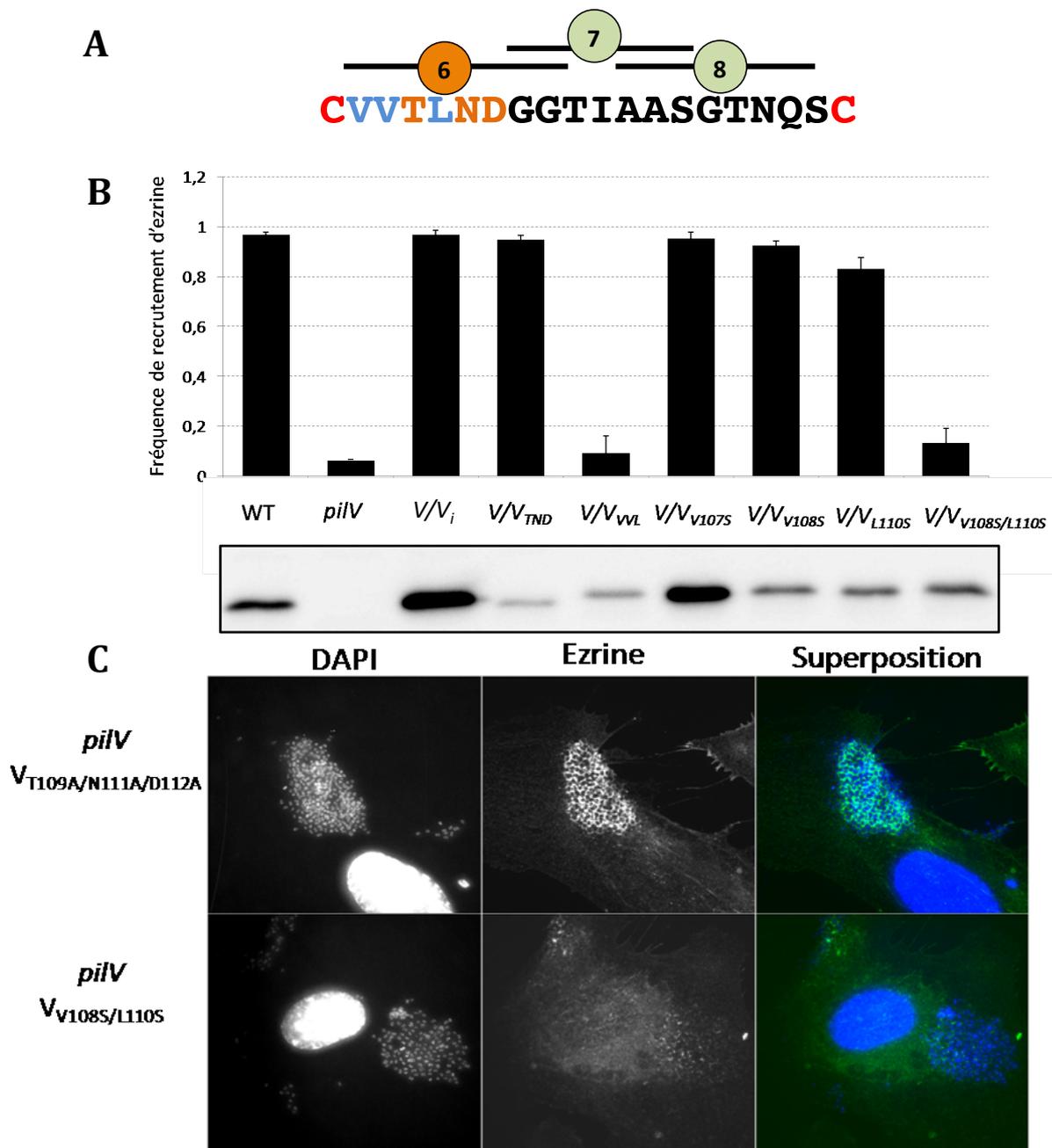


Figure 40 : Etude de l'effet de mutations ponctuelles dans la région D de PiIV

Complémentation de la mutation dans le gène *pilV* par l'expression de protéines PiIV mutées en présence de 1mM d'IPTG. **A.** Séquence de la région D de PiIV. La localisation des délétions-insertions FLAG est indiquée par un trait et le numéro correspondant. Les cystéines délimitant la région D sont en rouge. Les résidus en bleu correspondent aux résidus hydrophobes qui ont subi en mutation en sérine et les résidus en orange correspondent aux résidus hydrophiles qui ont été substitués par une alanine. **B.** Fréquence de recrutement de l'ezrine après deux heures d'infection et contrôle de l'expression des protéines PiIV mutées par immuno-détection de la protéine PiIV à partir de lysats totaux. **C.** Analyse du recrutement d'ezrine en nids d'abeille caractéristiques par immunofluorescence.

d'autre part que la partie N-Terminale de la région α/β semble également nécessaire à la fonction de cette protéine. Cependant, cette région est responsable du repliement en épingle à cheveux de nombreuses pilines dont la structure a déjà été déterminée. Dans la protéine PilV, cette région contient un résidu glycine. Les glycines, tout comme les prolines, sont souvent impliquées dans ce type de structures car elles permettent une certaine liberté structurale. Il est alors possible que cette glycine soit nécessaire au repliement de cette boucle et que la protéine PilV1 présente un défaut de conformation expliquant la perte de fonctionnalité observée. Pour valider cette hypothèse, nous avons choisi de générer la protéine PilV2 dans laquelle l'insertion du peptide FLAG est légèrement décalée par rapport à celle de la protéine PilV1. Les microcolonies formées par la souche *pilV/V2_i* sont, elles, capables d'induire le recrutement d'ezrine avec une fréquence de 83%, indiquant finalement que la région N-Terminale de la boucle α/β n'est pas nécessaire à la fonction de la protéine PilV. Finalement, seule la protéine PilV6 présente un défaut important dans l'induction de la réponse cellulaire, indiquant que la région D joue un rôle important dans la fonction de PilV.

c) Seuls deux résidus de la région D de PilV sont indispensables à sa fonction

D'après ces résultats, la partie N-Terminale de la région disulfure de PilV semble être nécessaire pour induire le recrutement d'ezrine. Afin d'affiner notre étude, nous avons donc réalisé des mutations ponctuelles dans cette région (Figure 40A).

Tout d'abord, nous avons généré deux nouvelles formes mutées de PilV :

-La protéine PilV_{T109A/N111A/D112A} ou PilV_{TND} présente une substitution de trois résidus hydrophiles de cette région en alanines.

-La protéine PilV_{V107S/V108S/L110S} ou PilV_{VVL} présente une substitution de trois résidus hydrophobes de cette région en sérines.

L'expression de la protéine PilV_{V107S/V108S/L110S} ne permet de restaurer le phénotype sauvage d'une souche mutée dans le gène *pilV*, tandis que l'expression de la protéine PilV_{T109A/N111A/D112A} restaure parfaitement un mutant *pilV* (Figure 40B).

Nous avons donc poursuivi notre étude en mutant individuellement chaque résidu qui était muté dans la protéine PilV_{V107S/V108S/L110S}. Sur la figure 40B, nous pouvons observer que la mutation ponctuelle de chaque résidu hydrophobe de la région disulfure n'est pas suffisante pour abolir la fonction de PilV. Cependant, nous avons remarqué que la fréquence de recrutement d'ezrine induit par les souches *pilV/pilV_{V108S}* et *pilV/pilV_{L110S}* était légèrement plus faible que la souche *pilV/Vwt_i*. De plus, la formation de la plaque corticale induite par ces

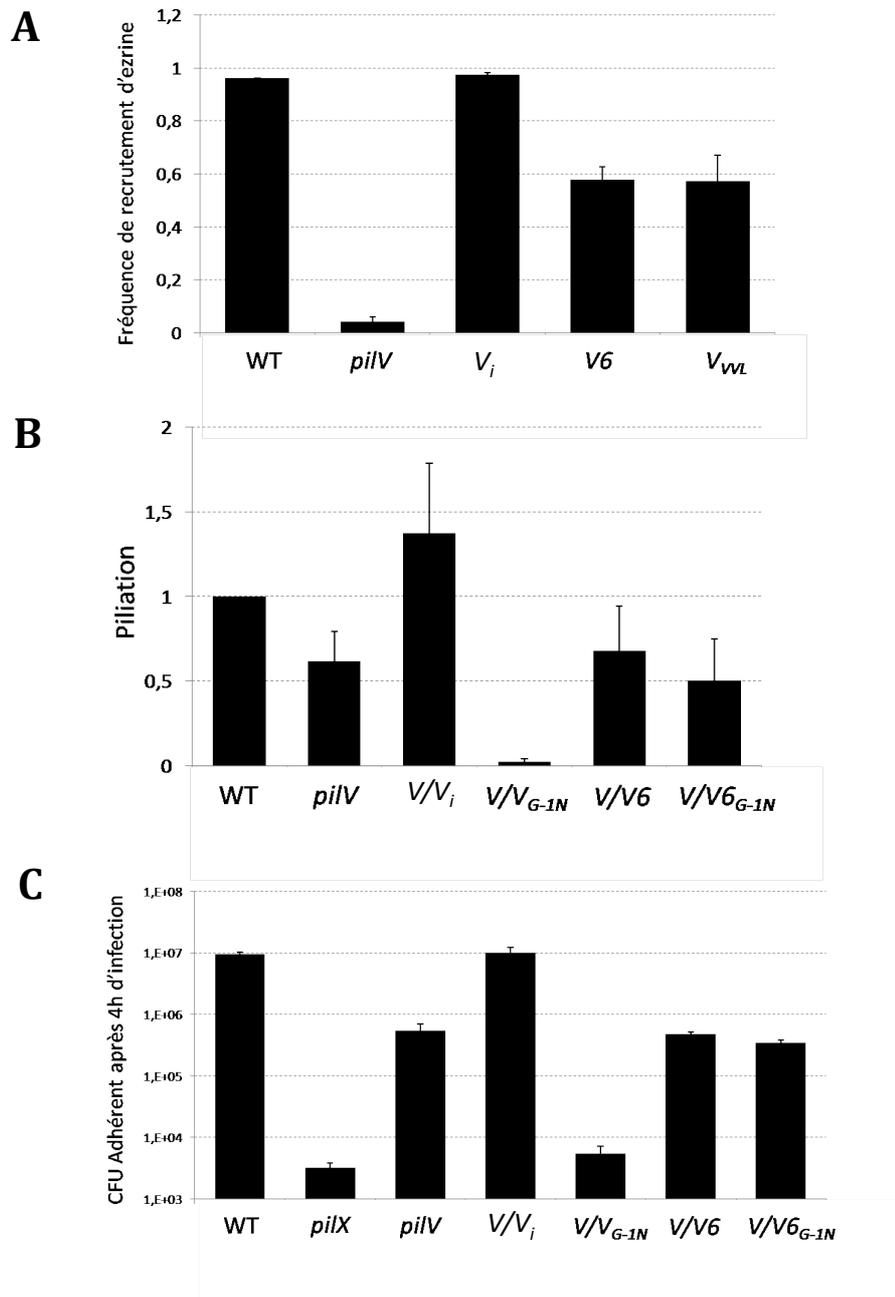


Figure 41 : Etude du rôle de la région D de PilV

L'expression des protéines PilV est induite en présence de 1mM d'IPTG. **A.** Etude de l'effet dominant négatif dû à l'expression de PilV6 et PilV_{WVL} dans un fond génétique sauvage. Fréquence de recrutement de l'ezrine après 2 heures d'infection. **B-C.** La mutation PilV6 supprime l'effet de la mutation G-1N. **B.** Quantification de la piliation par ELISA. **C.** Etude de l'adhésion sur les cellules endothéliales après 4 heures d'infection.

souches est souvent imparfaite. Nous avons donc décidé de vérifier la fonctionnalité d'une protéine qui portait les deux mutations, soit la protéine PilV_{V108S/L110S}. Nous pouvons observer que la souche *pilV/pilV_{V108S/L110S}* présente un défaut dans le recrutement de la plaque corticale semblable à celui de la souche *pilV*.

En conclusion, les résidus hydrophobes Val108 et Leu110 sont nécessaires à la fonction de PilV.

d) Examen du rôle de la région D de PilV

La région D de PilV semble être une séquence importante pour la fonction de PilV. Nous avons donc poursuivi notre étude pour comprendre le rôle de cette région.

Tout d'abord, nous avons vérifié que la perte de fonction associée aux formes mutées PilV6 et PilV_{V107S/V108S/L110S} n'était pas due à un problème de stabilité. Avant d'aborder cette problématique, nous avons étudié l'effet de l'expression de ces protéines dans une souche parentale qui exprime la protéine PilV sauvage de manière endogène. En effet, l'expression d'une protéine stable et fonctionnelle aura un effet dominant négatif dans une souche parentale. La protéine sauvage PilV sera alors en compétition avec la forme mutée de PilV non fonctionnelle et ne sera plus capable d'exercer sa fonction.

L'expression des formes mutées PilV6 ou PilV_{V107S/V108S/L110S} dans une souche parentale diminue respectivement la fréquence de recrutement d'ezrine à 58% et 59%, alors que l'expression de la forme sauvage n'influence pas la formation de la plaque corticale par les microcolonies (Figure 41A). Ces résultats montrent un effet dominant négatif partiel de l'expression de ces formes mutées, indiquant que ces protéines sont capables d'entrer en compétition avec la forme sauvage. Ceci nous suggère que la perte de fonction des protéines PilV6 et PilV_{V107S/V108S/L110S} n'est pas liée à un problème de stabilité des protéines.

Afin de comprendre en quoi la région D est nécessaire à la fonction de PilV, nous avons testé si la mutation PilV6 pouvait supprimer l'effet de la mutation Gly-1Asn (G-1→N). Cette mutation permet d'inhiber spécifiquement le clivage par PilD de la piline qui porte cette mutation, bloquant ainsi cette protéine dans la membrane interne. Dans la partie 1, nous avons montré un effet important de cette mutation sur les pilines mineures. En effet, l'expression d'une protéine PilV_{G-1N} abolit la piliation de la souche qui l'exprime. Nous présumons que cet effet sur la piliation est dû à une interaction directe avec la machinerie des PT4 et plus précisément avec la piline majeure PilE. La protéine PilV_{G-1N} étant bloquée dans la membrane interne, cette interaction est stabilisée et ne permet plus l'assemblage des PT4.

Nous avons alors testé l'effet de l'expression de la protéine PilV6_{G-1N} sur la piliation par des expériences d'ELISA (Figure 41B). Nous avons donc comparé la quantité de pili exprimée par les souches *pilV/V_{G-1N}*, *pilV/V6_i* et *pilV/V6_{G-1N}* en présence de 1mM d'IPTG. La souche *pilV* présente un défaut de piliation de l'ordre de 61%. Ce défaut n'est pas restauré par l'expression de la forme mutée PilV6 alors que l'expression de la copie sauvage de PilV restaure et augmente la piliation d'un mutant *pilV*. Ainsi la souche *pilV/V6_i* ne présente pas assez de PT4 pour induire le remodelage de la membrane plasmique, ce qui explique la perte de fonction observée. Contrairement à l'effet de l'expression de PilV_{G-1N}, l'expression de PilV6_{G-1N} n'abolit plus la piliation, qui est similaire à celle de la souche *pilV* ou *pilV/V6_i*. Ceci suggère que la protéine PilV6 n'est plus capable d'interagir avec la machinerie des PT4, alors qu'elle est capable de rentrer en compétition avec la forme sauvage. De plus, la souche *pilV/V6_{G-1N}* est capable d'adhérer aux cellules humaines avec la même efficacité que les souches *pilV* ou *pilV/V6_i*, suggérant que les PT4 présents dans la souche *pilV/V6_{G-1N}* sont fonctionnels (Figure 41C).

L'ensemble de ces résultats indique que la région D est nécessaire pour que la protéine PilV puisse interagir avec ses partenaires afin d'exercer ses fonctions.

4. Conclusion

L'étude de protéines chimères entre les pilines mineures et la piline majeure PilE a tout d'abord montré que les deux pilines mineures PilV et PilX, agissent certainement par des mécanismes similaires. Par cette étude nous avons montré que l'hélice $\alpha 1$ n'est pas spécifique des pilines mineures et qu'en revanche la région globulaire est très certainement responsable de leur spécificité et de leur fonction. Nous avons montré que le domaine globulaire est une entité fonctionnelle et que les régions de ce domaine ne peuvent pas fonctionner l'une sans l'autre. Ainsi l'hélice $\alpha 1C$ est totalement dépendante de son feuillet β et ils ne peuvent pas être dissociés sans perte de fonction. De plus nous avons montré que la région D, région importante pour de nombreuses pilines, n'est pas suffisante seule pour assurer les fonctions des pilines mineures. Il est possible que le repliement de la région D dépende de l'ensemble du domaine globulaire ou que l'environnement de la région D détermine son exposition.

En réalisant une étude de mutagenèse ciblée sur les boucles du domaine globulaire, nous avons pu identifier des boucles nécessaires à la fonction des pilines mineures. Pour la piline PilX, nous avons montré que la région α/β et la boucle $\beta 2/\beta 3$ sont nécessaires pour la fonction de PilX. Cependant la région D n'est pas indispensable pour les fonctions de PilX, contrairement à ce

qui avait déjà été publié (Helaine et al., 2007). Nous avons identifié une seule région, la région D, nécessaire à la fonction de PilV. Cependant la région D n'étant pas suffisante, il est très probable que le feuillet β joue aussi un rôle puisqu'il est exposé à la surface de la protéine. Si la région D est requise pour la fonction de PilV, il est néanmoins possible de muter les huit derniers résidus de cette région. Nous avons également montré que seuls les résidus Val108 et Leu110 sont déterminants pour la fonction de la région D de PilV. Enfin, nous avons montré que la mutation PilV6 supprime l'effet de la mutation G-1 \rightarrow N, puisque le mutant *pilV/V6_{G-1N}* présente une piliation similaire à la souche *pilV*. Ce résultat suggère que la région amino-terminale de la région D permet d'interagir avec la machinerie des PT4.

MATERIELS ET METHODES

Souches et conditions de culture

La souche de *N. meningitidis* utilisée dans cette étude est issue de la souche de référence 8013 (ou 2C43, souche sauvage) (Geoffroy et al., 2003). Il s'agit d'un isolat clinique du séro groupe C, capsulé, pilié et exprimant un variant antigénique de piline de type SB permettant une forte adhésion aux cellules humaines (Nassif et al., 1993). Les mutants *pilV* et *pilX* ont été produits par insertion d'une cassette de résistance à la kanamycine dans les gènes cibles (Geoffroy et al., 2003). La mutation *pilT* a été obtenue par délétion du gène entier et porte une cassette de résistance à l'érythromycine (Pujol et al., 1999). Les souches *pilV/V_i* et *pilV/V1_i* à *pilV/V10_i* correspondent à des souches *pilV* respectivement complémentées par la copie sauvage du gène *pilV*, ou par les constructions PilV1 à PilV10 placées sous le contrôle d'un promoteur Lac inductibles par l'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside). Les souches *pilX/X_i* et *pilX/X1_i* à *pilX/X9_i* correspondent à des souches *pilX* respectivement complémentées par la copie sauvage du gène *pilX*, et les constructions PilX1 à PilX9 inductibles à l'IPTG. La mutation *comP* a été obtenue par délétion et porte une cassette de résistance à la spectinomycine (Mikaty et al., 2009). Pour étudier le comportement de souches non adhérentes sur cellules, la souche SiaD⁻Opa⁺ a été utilisée. Cette souche non capsulée porte une mutation dans le locus *siaD* et exprime l'adhésine OpaB. La mutation *siaD* a été obtenue par délétion et porte une cassette de résistance à la spectinomycine (Brissac et al., 2012). La plupart des mutants sont issus d'une banque de mutants déjà décrite (Geoffroy et al., 2003).

N. meningitidis est cultivée pendant 16 heures à 37°C sous atmosphère humide et contenant 5% de CO₂ sur des boîtes de GCB agar (Difco) contenant les suppléments de Kellogg et l'antibiotique adéquat : vancomycine (3µg/mL), kanamycine (100 µg/mL), érythromycine (4 µg/mL), spectinomycine (60 µg/mL) et chloramphénicol (2 µg/mL) (Kellogg et al., 1968). Pour les étapes de culture liquide, les bactéries sont mises en suspension dans du milieu préchauffé à une densité optique DO_{600nm}=0,05, à 37°C, 5% de CO₂ et sous atmosphère humide avec agitation pendant 2h. Pour les infections ou les tests d'adhésion, le milieu des cellules HUVECs est utilisé ; pour les tests d'agrégation et pour préparer les échantillons pour les western blots, les bactéries sont cultivées dans du RPMI contenant 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF, PAA Laboratories GmbH, Pasing, Austria). Afin d'exprimer les constructions d'intérêt, 1mM d'IPTG est ajouté.

Biologie moléculaire : construction des protéines mutées

Afin d'exprimer les formes mutées des protéines PilV, PilX, ComP et PilE dans le méningocoque, plusieurs étapes de biologie moléculaire ont été suivies. Brièvement, les phases ouvertes de

lecture (en anglais Open Reading Frames, ou ORFs) ont été amplifiées et clonées dans le plasmide pCR2.1-TOPO (TOPO TA Cloning, Invitrogen). L'insertion de mutations a été réalisée par mutagenèse dirigée. Ensuite les ORFs sauvages ou mutées ont été sous clonées dans le vecteur d'expression pGCC4 en aval d'un promoteur Lac inductible par l'IPTG en utilisant les enzymes de restriction *PacI* et *PmeI*. De part et d'autre du promoteur Lac et de l'ORF se trouvent deux gènes *aspC* et *LctP* présents dans le génome de *N. meningitidis* qui permettront la recombinaison de ce vecteur avec l'ADN chromosomique et ainsi l'insertion de la construction suivie d'une cassette de résistance à l'érythromycine dans une région intergénique (Mehr et al., 2000).

Les réactions de polymérisation en chaîne (en anglais Polymerization Chain Reaction ou PCR) ont été réalisées avec 100ng d'ADN matrice (plasmidique ou chromosomique) et 100pM d'amorces en utilisant l'ADN polymérase Takara (Longa) dans le tampon recommandé par le fournisseur. Après une étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 3 minutes, 30 cycles de PCR ont été employés comme suit : dénaturation à 94°C pendant 45 secondes, hybridation des amorces pendant 1 min à 50°C et élongation à 72°C pendant 1min par kb. Tous les fragments de PCR utilisés pour le TA-Cloning et les inserts issus de digestions enzymatiques utilisés pour le sous clonage dans le vecteur pGCC4 ont été séparés sur gel d'agarose par électrophorèse et purifiés grâce au kit Wizard PCR & Gel Purification System (Promega). Les ligatures des fragments dans le vecteur pGCC4 ont été effectuées sur la nuit à 16°C en utilisant 1µL de DNA ligase dans le tampon recommandé. Préalablement, le vecteur pGCC4 a été digéré par les enzymes de restriction *PacI* et *PmeI*, puis déphosphorylé par l'ajout de 2µL de Phosphatase alcaline et incubé à 37°C pendant 4 heures. Toutes les enzymes utilisées pour le clonage ont été fournies par New England BioLabs. Tous les plasmides utilisés dans cette étude ont été purifiés à l'aide du kit QIAprep Spin Miniprep (Promega), puis vérifiés par séquençage (Eurofins, Institut Cochin). Toutes les transformations bactériennes ont été réalisées dans des bactéries thermocompétentes *E. coli* XL1-Blue obtenues par la méthode d'Inoue.

Clonage des ORFs dans le plasmide TOPO

Les ORFs des gènes *pilE*, *pilV*, *pilX* et *comP* ont été amplifiées par PCR à partir de l'ADN chromosomique de la souche parentale en utilisant respectivement les couples d'amorces PilE-F/PilE-R, PilV-F/PilV-R et PilX-F/PilX-R (Tableau 2). Ces oligonucléotides portent à leurs extrémités les sites de restriction reconnus par les enzymes *PacI* ou *PmeI* qui seront utilisées pour les sous clonages. Pour permettre l'expression de ces gènes, la séquence du RBS (Ribosome binding site) du gène *pilE* a été insérée avant le codon START. Pour insérer les mutations dans le gène *pilE*, nous avons généré un vecteur contenant une fusion transcriptionnelle *pilE:Kan* qui

permet d'introduire un allèle muté de *pilE* sous son propre promoteur. Un vecteur similaire avait déjà été décrit auparavant et permettait d'obtenir une souche *pilESB:Kn* (Nassif et al., 1993). Cependant ce vecteur ne contenait pas la séquence amino-Terminale de *pilE* et ne permet pas de modifier les premiers résidus. Nous avons donc amplifié par PCR cette fusion transcriptionnelle ainsi que les 100pb du promoteur *pilE* à partir de l'ADN chromosomique de la souche *pilESB:Kn* et des amorces PromE-F et PilE2-R (Tableau 2). Ce fragment a ensuite été cloné dans le plasmide pCR2.1 et vérifié par séquençage.

Mutagenèse dirigée

Afin d'optimiser les réactions de mutagenèse, la stratégie du Megaprimer a été employée pour réaliser l'ensemble des constructions décrites dans cette étude (Ke & Madison, 1997). Cette technique repose sur deux étapes de PCR. La première étape consiste à amplifier un Megaprimer. La PCR utilise un oligonucléotide sens en amont du gène et un oligonucléotide anti-sens contenant la mutation. Les amorces utilisées pour la mutagenèse de PilV sont répertoriées dans les tableaux 3 et 4. Les amorces utilisées pour la mutagenèse de PilX sont répertoriées dans les tableaux 5 et 6. Les amorces utilisées pour la mutagenèse de PilE sont répertoriées dans le tableau 7. Le fragment amplifié mesure entre 300 et 500 pb selon la localisation de la mutation dans le gène et contient en partie 3' la mutation. Ce fragment a été purifié et utilisé pour amplifier le plasmide entier. Les produits de PCR ont été digérés par l'enzyme DpnI pour éliminer le plasmide matrice méthylé puis transformées dans des bactéries thermocompétentes XL1-Blue.

Construction des protéines chimériques

Pour la génération des protéines chimériques, plusieurs stratégies basées sur celle du Megaprimer ont été utilisées selon la construction. Les oligonucléotides portent à la fois des nucléotides homologues au gène *pilE* et homologues au gène *pilV* ou *pilX* (Tableau 8). L'amplification du Megaprimer et l'amplification finale n'utilisent pas le même vecteur. Toutes les étapes sont synthétisées dans le tableau 9.

Extraction d'ADN chromosomique et transformation

N. meningitidis est naturellement compétente. Cependant, une soixantaine de gènes sont soumis à variation de phase ce qui génère une population très hétérogène. Afin de préserver cette hétérogénéité, les transformations sont réalisées en deux temps: obtention d'un clone, puis transformation de l'ensemble d'une population avec l'ADN chromosomique de ce clone. L'ADN

de *N. meningitidis* a été extrait à partir de cultures de 16 heures sur GCB Agar à l'aide du kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) en suivant les recommandations du fabricant.

Des cultures de *N. meningitidis* étalées sur GCB Agar ont été mises en suspension dans 3mL de GCB liquide pour transformation (protéose peptone 15mg/mL, K_2HPO_4 4mg/mL, KH_2PO_4 1mg/mL, NaCl 5mg/mL, $MgCl_2$ 5mg/mL, $MgSO_4$ 2,5mg/mL) à $DO_{600nm}=1$ soit 10^9 bactéries/mL. 100ng de plasmides ont été ajoutés à 200 μ L de cette suspension préalablement placée dans des puits d'une plaque 24 puits. La plaque a ensuite été placée sous agitation forte dans l'incubateur. Au bout de 30 minutes, 800 μ L de GCB pour transformation ont été ajoutés et les bactéries ont été cultivées pendant 3h supplémentaires. Les transformants ont été sélectionnés sur la nuit par l'antibiotique adéquat sur GCB Agar, puis réamplifiés sur le même milieu pendant 16h afin d'en extraire l'ADN chromosomique. Puis les différentes étapes ont été répétées avec 5 μ g d'ADN chromosomique. Finalement, les transformants obtenus après sélection sur l'antibiotique adéquat ont été congelés à $-80^\circ C$ dans 1,5mL de GCB liquide contenant 20% de glycérol (vol/vol).

Tests d'agrégation

Les bactéries ont été mises en suspension dans du milieu RPMI supplémenté en SVF 10% préchauffé à une densité optique $DO_{600nm}=0,05$ et mises en culture. Afin d'exprimer les constructions codant pour des protéines recombinantes, 1mM d'IPTG a été ajouté dans les cultures. Après 2 heures de culture, les bactéries ont été centrifugées pendant 5 min à 2500g et resuspendues à une densité optique $DO_{600nm}=0,3$ dans du RPMI SVF 10% additionné de DAPI dilué au 1/50 000 afin de visualiser les bactéries. 100 μ L de cette suspension ont été déposés dans un puit d'une plaque pour microscopie (IBIDI). Les bactéries ont été ensuite placées à $37^\circ C$, 5% de CO_2 et sous atmosphère humide pendant 30 minutes afin de leur permettre d'agréger. Les agrégats ont été observés au microscope, à l'aide d'un objectif 4X. Trois puits ont été analysés par souche et par expérience et les expériences ont été répétées trois fois.

Pour quantifier l'agrégation bactérienne, les images ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ (Abramoff et al.,). La surface de chaque agrégat a pu être mesurée et a été utilisée pour déterminer son volume en considérant les agrégats comme sphériques. Les agrégats d'une surface inférieure à $10\mu m^2$ ont été négligés. Le nombre de bactéries participant à un agrégat a pu être calculé à partir du volume total occupé par les agrégats et en considérant que le volume occupé par une bactérie est de $4,6 \mu m^3$ (cette estimation a pu être réalisée par l'observation d'agrégats à plus haute résolution avec un objectif 60X).

Culture cellulaire

Des cellules endothéliales humaines de veine ombilicale (Human Umbilical Vein Endothelial Cells ou HUVECs, PromoCell) ont été utilisées entre les passages 3 et 10 et cultivées en Endo-SFM L-glutamine 2mM (Gibco) supplémenté avec 10% de SVF (PAA laboratories) et 10µg/mL de supplément de croissance pour cellules endothéliales (ECGS, Harbor Bioproducts). Les cellules ont été cultivées à 37°C, 5% de CO₂ et sous atmosphère humide.

Infections

La veille des infections, des cellules HUVECs ont étéensemencées à une densité de 10⁵/cm² sur des lamelles de verres de 12mm de diamètre préalablement recouvertes d'une solution à 0,01% de collagène de type I (Sigma). Le milieu de culture a été renouvelé 2 heures avant l'infection. Les bactéries ont été cultivées en milieu liquide pendant 2 heures. Afin d'exprimer les constructions codant pour des protéines recombinantes, 1mM d'IPTG a été ajouté à cette culture.

Les cellules ont été infectées avec 10⁷ bactéries (multiplicité d'infection MOI=100). Pour les souches Caps-Opa⁺ non piliées et/ou non adhérentes, 4.10⁷ bactéries ont été ajoutées (MOI=400), afin d'obtenir des colonies de taille comparable à celles de la souche sauvage. Après 30 minutes d'incubation, les cellules sont lavées afin de retirer les bactéries non adhérentes, et recouvertes de milieu frais avec ou sans IPTG. L'infection a ensuite été poursuivie pendant 2h supplémentaires.

Tests d'adhésion

La veille des infections, des cellules HUVECs sontensemencées à une densité de 10⁵/cm² directement dans les puits de plaques 24 puits. Les cultures liquides de bactéries ont été réalisées comme décrit précédemment. Les cellules ont été infectées avec 10⁷ bactéries (multiplicité d'infection MOI=100). L'inoculum de chaque souche et/ou de chaque condition a été vortexé, dilué en série puis étalé sur GCB Agar. Après 30 minutes d'adhésion initiale, les cellules sont lavées et recouvertes de milieu frais contenant ou non 1mM d'IPTG. L'infection a été poursuivie 4 heures supplémentaires. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois avec du milieu frais, grattées et vortexées. Différentes dilutions de cette suspension ont été étalées sur

GCB agar. Les colonies ont été énumérées après 16h de croissance. Les résultats ont été normalisés par rapport au nombre de colonies comptées dans l'inoculum.

Anticorps et réactifs

Pour les immunofluorescences, nous utilisons un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre l'ezrine (don de Mangeat P.). Les anticorps secondaires anti-Immunoglobuline G (IgG) de lapin ou de souris produits dans la chèvre sont couplés au fluorochrome Alexa-488 ou Alexa-568 (Lifescience). Les bactéries et le noyau des cellules sont visualisés grâce à un intercalant de l'ADN, le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole, Sigma).

Pour les western blots, les membranes sont hybridées soit avec un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre PilV dilué au 1 :1500, produit par le laboratoire, soit avec un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre PilX dilué au 1 :3000, soit avec un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre PilE dilué au 1 :5000 (Mikaty et al., 2009, Helaine et al., 2007). Les anticorps secondaires IgG de lapin produits dans la chèvre sont couplés avec la peroxydase du raifort (horseradish peroxidase ou HRP, Sigma).

Immunofluorescence

Les cellules infectées ont été fixées pendant 20 minutes en paraformaldehyde (PFA) 4% dilué en PBS, perméabilisées 5 min en PBS Triton 100X 0,1% et bloquées 20 min en PBS gélatine 0,2% (PBSG). Les cellules ont été incubées pendant 1 heure avec les anticorps primaires dilués en PBSG. Les cellules ont été lavées en PBS et incubées pendant 1 heure avec des anticorps secondaires fluorescents et le DAPI dilués en PBSG. Enfin les lames sont lavées trois fois en PBS et montées entre lames et lamelles avec du Mowiol (Sigma) avant observation microscopique et comptage à l'aide d'un microscope à fluorescence.

L'indice de recrutement correspond au pourcentage de microcolonies pour lesquelles on peut détecter un recrutement d'ezrine. Seules les microcolonies constituées de 100 à 200 bactéries ont été comptabilisées. Le recrutement de composants cellulaires a été quantifié comme suit : une plaque corticale complète ou partielle sous la microcolonie est comptée comme positive alors qu'une absence de recrutement est comptée comme négative. Au moins cinquante microcolonies ont été comptées pour chaque mutant et pour chaque infection. Les expériences ont été répétées trois fois.

ELISA, Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Pour la quantification des PT4, les bactéries ont été étalées la veille sur des milieux frais de GCB Agar sans antibiotiques en absence ou en présence de 1mM d'IPTG. Le lendemain, les bactéries ont été mises en suspension dans du PBS à une $DO_{600nm}=0,1$. 200 μ L de cette suspension ont été déposés dans un puit d'une plaque ELISA 96 puits (Nunc). Sur cette même plaque, 100 μ L de cette suspension ont été prélevés et déposés dans le puit suivant contenant 100 μ L de PBS afin de diluer l'échantillon par deux. Cette opération a été répétée six fois afin d'obtenir une gamme variant de 10^7 à 39000 bactéries par puits. Après centrifugation 10 minutes à 700g, le surnageant a été délicatement retiré et la plaque a été incubé 10 minutes à 37°C en atmosphère sèche pour laisser évaporer l'excédent. Les bactéries ont ensuite été fixées en PBS PFA 4% pendant 10 minutes. Après trois lavages en PBS, les échantillons ont été bloqués en PBS albumine de sérum de bœuf 1% (Serum Albumine Bovine ou BSA, VWR), Tween 20 0,1% (Sigma). Les PT4 ont été détectés en incubant 1 heure les bactéries avec un anticorps monoclonal de souris anti Pile (clone 20d9 (Pujol et al., 1997)) dilué au 1:5000 dans la solution de blocage, puis avec un anticorps secondaire anti IgG de souris couplé à la HRP dilué au 1:10 000 dans la solution de blocage. Après quatre lavage, la plaque a été incubée 20 minutes en présence du substrat 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidine (TMB, BD Biosciences). La réaction a été stoppée par l'ajout de 50 μ L de H₂SO₄ à 1M. Enfin, l'absorbance à 450nm a été mesurée par le lecteur de plaque Flex station 3 (Molecular Devices).

Western Blot

Les protéines ont été séparées par la technique de Glycine-SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) sur des gels de polyacrylamide 15%. L'acrylamide a été polymérisé dans une solution de 1M de Tris, 0,1% de SDS par l'ajout de persulfate d'ammonium et de tetramethylethylenediamine (TEMED) dans un système d'électrophorèse vertical fourni par BioRad. Les échantillons ont été préparés dans une solution de Laemmli contenant 10mM de dithiothréitol (DTT), 50 mM de Tris, 2% de SDS, 10% de glycérol et du bleu de bromophenol à une concentration finale de 10 μ g/mL. Pour contrôler l'expression et la stabilité des protéines, 10^7 bactéries ont été prélevées à partir d'une culture liquide en présence de 1mM d'IPTG, puis centrifugées et resuspendues dans 100 μ L de tampon de Laemmli. Pour les expériences de pontage disulfure, les bactéries ont été incubées 1h dans une solution d'éthanolamine à 0,15M pH 10.5, lavées en PBS et resuspendues dans une solution de Laemmli

sans DTT. Les échantillons ont été incubés 10 min à 100°C avant d'être déposés dans le gel à raison de 10µL par puits. La séparation des protéines a été d'abord réalisée à 90V pendant 30 minutes puis à 120V pendant 2h. Le tampon de migration utilisé contient 25mM de Tris base, 192mM de Glycine, 0.1% de SDS ajusté à pH8.3. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène) (Thermo Scientific) en phase semi-sèche pendant 45 minutes à 10V, dans un tampon de transfert contenant 20% de méthanol, 20mM de Tris base, 150mM de Glycine.

La membrane a été ensuite lavée sous agitation en PBS 0,1% Tween 20 (PBST), bloquée en PBST contenant 5% de lait écrémé en poudre (Régilait) pendant 1h, puis incubée 1h avec l'anticorps primaire en PBST lait 5%. Après trois lavages de 5 minutes en PBST, la membrane a été incubée 1h dans du PBST lait 5% avec l'anticorps secondaire dirigé contre les IgG de lapin couplé à la HRP. Après plusieurs lavages en PBST, l'activité de la peroxydase a été révélée en ajoutant 1mL d'un mélange des deux réactifs du kit ECL+ (GE Healthcare) avec un ratio volumique de 1:40. Après 5 minutes d'incubation, l'acquisition a été effectuée à l'aide de l'appareil LAS-4000 (Fujifilm).

Purification de pili

Les bactéries sont mises en suspension à partir de cultures fraîches sur gélose dans 10mL d'une solution d'éthanolamine à 0,15M pH 10.5 favorable à la dissociation des fibres de PT4. Le contenu de dix boîtes de Petri a ainsi été mis en suspension par souche et par condition. 100µL de cette suspension ont été prélevés afin de préparer les échantillons de lysats totaux. La suspension a été vortexée 1 minute à puissance maximale afin de casser les fibres, puis centrifugée à 3200g pendant 30 minutes à 4°C afin de séparer les corps bactériens du surnageant enrichi en PT4. Le surnageant est centrifugé à 17000g pendant 30 minutes supplémentaires. Les PT4 se retrouvant dans le surnageant ont été précipités avec du sulfate d'ammonium à saturation dilué au 1/10 pendant 1 heure à température ambiante, puis centrifugés à 3200g pendant 30 minutes. Le culot a ensuite été lavé en Tris 50mM pH 7.5 puis resuspendu dans un tampon Laemmli.

Tableau 2 : Amorces utilisées pour le clonage

PilV-R	TTAATTAAGGAGTAATTTTATGAAAAACGTTCAAAAAGGC	PacI
PilV-R	GTTTAAACTTAGTCGAAGCCGGGGCAG	PmeI
PilX-F	TTAATTAAGGAGTAATTTTATGATGAGTAATAAAATGG	PacI
PilX-R	GTTTAAACCTATTTTTTACGATTAGAG	PmeI
PilE-F	TTAATTAAGGAGTAATTTTATGAACACCCTTCAAAAAGGTTTTACCCTTATC GAGCTGATG	PacI
PilE-R	GTTTAAACTTAGCTGGCAGATGAATCATCG	PmeI
PromE-F	TAATACACAGGTATCGCAACA	
PilE2-R	CAGCCAAAACGGACGACCCC	

Les sites de restriction sont notés en gras et les sequences du RBS sont soulignées

Tableau 3 : Amorces utilisées pour la mutagenèse de PilV utilisant l'amorce PilV-F

PilV1	TTGTTTCAGTTTGTTTTTCTTATCGTCATCGTCCTTATAATCTTGGCGGTAGTAACGTTCC
PilV2	ATATTTGTTTTGTTTCTTATCGTCATCGTCCTTATAATCAAACGTCCCTTTTTG
PilV3	AGGTAACGTTGAAATACTTATCGTCATCGTCCTTATAATCGTCGTAGGTTTTAAACGTCC
PilV4	GGCCTGAAGGGTAAAGTGATCGTCCTTATAATCGCTTAAGGTAACGTTG
PilV5	GTAACGACGCAGGTTTCTTATCGTCATCGTCCTTATAATCGTCGGCCTGAAGGGTAAAG
PilV6	GAAAGCGGCAATGGTCTTATCGTCATCGTCCTTATAATCGCAGGTTTCGCC
PilV7	GGATTGGTTTGTCTTATCGTCATCGTCCTTATAATCGTCGTTGAGCGT
PilV8	GAAGCCGGGGCACTTATCGTCATCGTCCTTATAATCAATGGTACCGCC
PilV9	GGACTTATCGTCATCGTCCTTATAATCTTTGTCATCGTCATCTTTGTAGTCGACGCAGG
PilV10	CGCCCTTGTTTAACTTACTTATCGTCATCGTCCTTATAATCGCAGGATTGGTTTGTACC
PilV_{TND}	GGTACCGCCGTCGTTGGACGTAGAGACGCAGGTTTCGCC
PilV_{VVL}	GGCAATGGTACCGCCGGCGGCAGCGCAACGACGCAGGTTTC
PilV_{V107S}	GTCGTTGAGCGTAACGGAGCAGGTTTCGCCGTC
PilV_{V108S}	GCCGTCGTTGAGCGTAGAGACGCAGGTTTCGCC
PilV_{L110S}	GGTACCGCCGTCGTTGGACGTAACGACGCAGGT
PilV_{V108SL110S}	GGTACCGCCGTCGTTGGACGTAGAGACGCAGGTTTCGCC

Les mutations insérées sont en rouge

Tableau 4 : Amorces utilisées pour la mutagenèse de PilV utilisant l'amorce PilV-R

PilV_{G-1N}	AAAAACGTTCAAAAA AACT TTACGCTGCTCGAG
PilV_{L3C}	CAAAAAGGCTTTACG TCG CTCGAGCTGATG
PilV_{V10C}	GAGCTGATGATTGC CTGC GCCATCCTCGGCATC
PilV_{L16C}	GCCATCCTCGGCAT CTGC ACGCTCATCACCTACCCT
PilV_{Y27C}	CCCTTCCTATAAAAC CTGC ATCCGGCGCGTCC

Les mutations insérées sont en rouge

Tableau 5 : Amorces utilisées pour la mutagenèse de PilX utilisant l'amorce PilX-F

PilX1	ACAAATCTTCCAGTTTGCT CTTATCGTCATCGTCCTTATAATC GGGATTTTCAAAATAAACTG
PilX2	CGGATTCATCTTATAGCC CTTATCGTCATCGTCCTTATAATC CCTTGATGGTCTGATTATC
PilX3	CGAAACATTATATTTTTC CTTATCGTCATCGTCCTTATAATC GCCTGAGACAAATCTTTC
PilX4	CGCCGACCAAGCTGT ACTTATCGTCATCGTCCTTATAATC AAAATGCACCGAAACATT
PilX5	GCTGTTCCATCCATACCG ACTTATCGTCATCGTCCTTATAATC TGGAACGCCGACCAAGCT
PilX6	TGAGGACAAGGTCTCCA ATTCATCGTCATCGTCCTTATAATC ACGGCATTGTATCCGTC
PilX7	GAAAGCTTCACA CTTATCGTCATCGTCCTTATAATC CAAATGGGCTCG
PilX8	GTCATCGTCCTTATAATCCA ACTTATCGTCATCGTCCTTATAATC ACGGCATTGTATCCGTCGCC
PilX9	CGCCCTGTTTAAACCT ACTTATCGTCATCGTCCTTATAATC ACAGCCGACATCTGAGGA

Les mutations insérées sont en rouge

Tableau 6 : Amorces utilisées pour la mutagenèse de PilX utilisant l'amorce PilX-R

PilXG-1N	AAAATGGAACAAAA AACT TTACATTGATTGAGATGATG
PilXV10C	GAGATGATGATAGT CTGC GCGATACTCGGCATT
PilXL3C	CAAAAAGTGTTTAC ATGC ATTGAGATGATGATAG
PilXL16C	GCGATACTCGGCATT CTGC AGCGTCATTGCCATAC
PilXY27C	CCTTCTTATCAAAGT CTGC ATTGAAAAAGGCTATC

Les mutations insérées sont en rouge

Tableau 7 : Amorces utilisées pour la mutagenèse de Pile utilisant l'amorce Pile3-R

Pile3-R	TTAGCTGGCAGATGAATCATCG
PileG-1N	AACACCCCTCAAAAA AACT TTACCCTTATCGAG
PileL3C	CTCAAAAAGGTTTTACCT TGC ATCGAGCTGATGATTG
PileI10C	ATCGAGCTGATGATTGTGT TGC GCCATCGTCGGCATT
PileY27C	CCTGCTTATCAAGACT TGC ACAGCCCGCGCAC

Les mutations insérées sont en rouge

Tableau 8 : Amorces utilisées pour les constructions des protéines chimères

M13rev	GGAAACAGCTATGACCATG
Pile22V	GTCGGCATT TTGGCGGCAGTCGCCCTTCCTTCCTATAAAACCTACATCCGGCGCGTC
PilegloV	CAAAAATCAGCCGTCACAGAGTATT ACCGCCAAAAAGGGACGTTTAAAACC
Pile(V)	CAGATGAATCGCGGCAG GGATTGGTTTGTACCGGAAGCGGCAATGGTACCGCCGTCGT TGAGCGTAACGACGCAGAACCATTGACCG
Pile22X	GTCGGCATT TTGGCGGCAGTCGCCCTTCCTTCTTATCAAAGTTATATTGAAAAAGGC
PilegloX	CGTCACAGAGTATTACCTGAAT CACAATCCCCTGGACGATAATCAGACC
Pile(X)	CAGATGAATCGCGGCAG CCGACATCTGAGGACAAGGTCTCCAAATGGGCTCGGGCA GAAGCGGCATCACGGCAGAACCATTGACCG

Les séquences homologues à Pile sont en noir, les séquences homologues à PilV en bleu et les séquences homologues à PilX en vert

Tableau 9 : Etapes de mutagenèse pour les protéines chimères

PCR1		PCR2	
Constructions	Amorces	Plasmide	Plasmide
Pile22V	Pile22V/M13rev	TOPO-PilV	TOPO-Pile
PilegloV	PilegloV/M13rev	TOPO-PilV	TOPO-Pile
Pile(V)	Pile(V)/Pile-F	TOPO-Pile	TOPO-Pile
Pile22X	Pile22X/M13rev	TOPO-PilX	TOPO-Pile
PilegloX	PilegloX/M13rev	TOPO-PilX	TOPO-Pile
Pile(X)	Pile(X)/Pile-F	TOPO-Pile	TOPO-Pile

RESULTATS ANNEXES

I. Une modification post-traductionnelle de la piline majeure induite au contact des cellules hôtes provoque la dissémination de *Neisseria meningitidis*

Nous avons vu en *Introduction* que la piline majeure est le support de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPT) pouvant influencer les propriétés des PT4. Les travaux présentés dans les pages suivantes ont permis de caractériser l'impact de l'une des ces MPT sur le cycle de vie de *N. meningitidis*. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'équipe de Spectrométrie de masse structurale et protéomique récemment installée à l'Institut Pasteur et dirigée par Julia Chamot-Rooke et ont fait l'objet d'une publication scientifique dans la revue *Science* en 2011.

Une approche utilisant la spectrométrie de masse sur la piline PilE entière purifiée à partir des PT4 a permis de montrer que dans notre souche la piline est modifiée par un phosphoglycérol (PG) au niveau des résidus sérines S69 et S93, alors qu'on observe une phosphorylcholine ou une phosphoéthanolamine sur la piline de *N. gonorrhoeae* (Hegge et al., 2004). Toutes les pilines portent ce groupement PG sur la sérine S69 mais seulement 15% de la masse totale des pilines sont également modifiés sur la sérine S93 (Article Figure 1). Cette modification est ajoutée par l'action de la phosphotransférase PptB dont l'expression est régulée par un promoteur CREN (Contact Regulatory Elements of *Neisseria*) inductible au contact des cellules de l'hôte (Morelle et al., 2003) (Article Figure 1). En utilisant une souche mutée dans le gène *pptB* et complémentée par une copie sauvage sous un promoteur inductible par l'IPTG, nous avons montré que la quantité de PG est proportionnelle au taux d'expression du gène *pptB* (Article Figure2).

Nous avons ensuite caractérisé l'effet de cette MPT sur les fonctions associées aux PT4. Tout d'abord, une modélisation moléculaire des fibres des PT4 a permis de montrer que l'ajout des PG sur la piline modifie les propriétés électrostatiques de la surface des pili, ce qui abolit les interactions entre eux. Ce défaut a pu également être observé par microscopie électronique à transmission. En effet, les souches surexprimant le gène *pptB* ne présentent plus de faisceaux de pili mais seulement des fibres individuelles indiquant l'incapacité des pili à interagir entre eux. Ces changements ont pour conséquence un défaut d'agrégation proportionnel à la quantité de piline modifiée par le PG (Article, Figure3). Un phosphoglycérol est une modification importante, tant au niveau de sa masse que de sa charge. En substituant le résidu Ser93 par une alanine nous avons montré que la charge négative du PG et non la masse est responsable de la perte d'agrégation (Article, Figure supplémentaire S6).

Par la suite, nous avons montré que l'ajout d'un PG sur la piline majeure ne modifie ni les propriétés d'adhésion ni la prolifération des bactéries sur les cellules épithéliales (Article, Figure 4). Cependant, nous avons montré que les bactéries se détachent plus facilement de la surface des cellules après plusieurs heures lorsque les fibres des PT4 sont modifiées par le PG (Article, Figure 4). Le décrochage des bactéries permet aux bactéries de traverser l'épithélium nasopharyngé puisqu'un mutant *pptB* n'est plus capable de franchir cette barrière (Article, Figure 4).

Nous proposons donc un modèle dans lequel une modification post-traductionnelle de la piline participe à la colonisation des cellules eucaryotes par le méningocoque. Le gène *pptB* responsable du transfert d'un phosphoglycérol est surexprimé au contact des cellules, modifiant ainsi la surface des pili. Les pili perdent leur capacité à former des faisceaux, ce qui inhibe l'agrégation bactérienne. Ce mécanisme pourrait permettre la dissémination des bactéries soit pour coloniser de nouveaux sites au sein du même hôte soit pour infecter un nouvel hôte. Ce phénomène pourrait être notamment responsable du passage des bactéries du nasopharynx vers la circulation sanguine.

Dans cette étude, j'ai pu montrer l'effet de l'ajout d'un PG de la piline sur l'agrégation bactérienne en montrant que la capacité d'agrégation des bactéries est inversement proportionnelle à la modification de la piline par le PG. En réalisant une série de mutagenèse sur le résidu sérine S93, j'ai également mis en évidence que la charge négative du PG est responsable de la perte d'agrégation. De plus, mes travaux ont permis de montrer que l'ajout du PG n'a pas d'effet sur l'adhésion et la prolifération des bactéries sur les cellules épithéliales. Enfin, j'ai pu révéler que le franchissement de la barrière épithéliale ne dépend pas uniquement d'un passage par voie transcellulaire mais très certainement aussi par voie paracellulaire.

II. Imagerie de la dynamique moléculaire de la réponse cellulaire induite par *Neisseria meningitidis*

La colonisation efficace des vaisseaux est une étape importante dans le développement des pathologies des infections méningococciques (Melican et al., 2013). Cette colonisation requiert la formation de projections membranaires et le recrutement de nombreux composants cellulaires après contact des bactéries avec les cellules de l'hôte. L'ensemble de ces processus, également nommé réponse cellulaire, permet notamment de stabiliser les agrégats au contact des cellules et d'ouvrir les jonctions cellulaires favorisant le franchissement des barrières cellulaires de l'hôte par les bactéries (Mikaty et al., 2009) (Coureuil et al., 2009). De nombreuses études s'intéressent à comprendre ce phénomène tant au niveau des facteurs bactériens qu'au niveau des voies de signalisation cellulaires impliqués. Cependant, l'ensemble de ces travaux se basent sur des échantillons fixés après plusieurs heures d'infection par le méningocoque. De ce fait, elles n'apportent aucun renseignement sur la chronologie des événements aboutissant à la réponse cellulaire. Les travaux qui suivent ont permis d'identifier la séquence d'événements qui prend place lors du déclenchement de la réponse cellulaire par une stratégie de microscopie à fluorescence à haute résolution dans le temps et dans l'espace de l'infection du méningocoque en temps réel.

Les techniques d'analyse de cellules vivantes par imagerie en dynamique ne cessent de se développer et ont permis d'identifier les événements précoces qui ont lieu lors de nombreux processus biologiques notamment les mécanismes de l'endocytose et les interactions hôte-pathogènes. Cette étude utilise des techniques similaires pour observer le déroulement de l'infection par le méningocoque de cellules vivantes exprimant un des composants cellulaires fusionnés à des protéines fluorescentes. Grâce à un logiciel développé pour quantifier la variation de fluorescence sous les agrégats, cette stratégie permet d'observer le profil de recrutement de n'importe quel composant cellulaire après contact avec des agrégats préformés de méningocoque avec une résolution temporelle élevée (Article, Figure 1).

Cette stratégie a permis de montrer que les agrégats déclenchent le recrutement d'ezrine très rapidement pour atteindre un plateau 5 minutes après le contact avec la cellule (Figure 1). Malgré la rapidité de ce déclenchement, ces travaux ont permis d'établir que la déformation de la membrane plasmique précède le recrutement des composants cellulaires comme l'ezrine et l'actine (Article, Figure 3). De plus, ces travaux ont confirmé que la polymérisation d'actine n'est pas responsable de la déformation membranaire, mais que les propriétés de la membrane plasmique, elles, jouent un rôle déterminant (Article, Figure 4 et 5). De plus l'induction des voies

de signalisation notamment celle dépendante du récepteur β 2-adrénérique, ne semble pas être nécessaire à l'établissement des projections membranaires (Article, Figure 6).

Au-delà de l'étude du processus cellulaire induite par le méningocoque, cette stratégie permet de caractériser les facteurs bactériens impliqués. Alors que les agrégats d'une souche parentale déclenchent le recrutement de l'ezrine dans les 20 secondes succédant leur contact avec la cellule hôte, des agrégats formés par une souche *pilV* ne permettent pas de recruter l'ezrine même après 10 minutes d'infection (Article, Figure 1 et 2). L'analyse d'un mutant *pilT* montre que celui-ci induit un recrutement des composants cellulaires plus lentement qu'une souche parentale. De plus, il est parfois observé que l'accumulation des composants cellulaires sous les agrégats formés par une souche *pilT* disparaît, indiquant que la rétraction des pili régule finement l'initiation du recrutement mais également son maintien dans le temps (Article, Figure 2).

L'ensemble de ces travaux permet de proposer un nouveau modèle pour les mécanismes mis en jeu par le méningocoque dans l'établissement et le maintien de la réponse cellulaire. En effet, ces résultats montrent l'importance de la déformation de la membrane plasmique. Cette déformation serait responsable de l'accumulation des composants cellulaires comme l'actine, mais ne serait pas dépendant de l'activation des voies de signalisation intracellulaire. Ma participation dans ces travaux se résume à l'élaboration des constructions fluorescentes permettant de visualiser les agrégats bactériens.

1 **Chronology of the early events triggered by the interaction of *Neisseria***
2 ***meningitidis* with endothelial cells**

3 Magali Soyer^{1,2§}, Arthur Charles-Orszag^{1,2}, Thibault Lagache³, Silke Machata^{1,2}, Anne-Flore
4 Imhaus^{1,2}, Corinne Millien^{1,2}, Jean-Christophe Olivo-Marin³, Guillaume Duménil^{1,2,*}

5 ¹ Université Paris Descartes, Faculté de Médecine Paris Descartes, Paris F-75006, France.

6 ² INSERM, U970, Paris Cardiovascular Research Center, Paris F-75015, France.

7 ³ Institut Pasteur, Unité d'Analyse d'Images Quantitative, Centre National de la Recherche
8 Scientifique, Unité de Recherche Associée 2582, Paris, France.

9

10 * To whom correspondence should be addressed: guillaume.dumenil@inserm.fr

11 § Current address: Randall Division of Cell and Molecular Biophysics, Room 2.34, King's College
12 London, New Hunt's House, Guy's Campus, London SE1 1UL, UK

13

13 **Summary**

14 *Neisseria meningitidis* is a bacterium responsible for severe sepsis and meningitis. Following
15 type IV pilus-mediated adhesion to endothelial cells, bacteria proliferating on the cellular
16 surface trigger a potent cellular response that enhances the ability of adhering bacteria to resist
17 the mechanical forces generated by the blood flow. This response is characterized by the
18 formation of numerous membrane structures morphologically related to filopodia. In this
19 study, a high-resolution quantitative live-cell fluorescence microscopy procedure was
20 designed and used to study this process. A farnesylated plasma membrane marker was first
21 detected only a few seconds after bacterial contact, rapidly followed by actin cytoskeleton
22 reorganization and bulk cytoplasm accumulation. The bacterial type IV pili-associated minor
23 pilin PilV is necessary for the initiation of this cascade. Plasma membrane composition is a key
24 factor as cholesterol depletion with methyl- β -cyclodextrin completely blocks the initiation of the
25 cellular response. In contrast membrane deformation does not require the actin cytoskeleton.
26 Strikingly, plasma membrane remodeling under microcolonies is also independent of common
27 intracellular signaling pathways as cellular ATP depletion is not inhibitory. This study shows
28 that bacteria-induced plasma membrane reorganization is a rapid event driven by a direct
29 crosstalk between type IV pili and the plasma membrane rather than by the activation of an
30 intracellular signaling pathway that would lead to actin remodeling.

31

32

32 **Introduction**

33 *Neisseria meningitidis* (or meningococcus) is a Gram-negative bacterium responsible for two
34 severe forms of infection, sepsis and meningitidis, that can occur either separately or together
35 (van Deuren *et al.*, 2000). The reservoir of meningococcus is the human upper airways, and
36 particularly the nasopharynx mucosa. Meningococcus can be isolated from the throat of a large
37 percentage of the human population in the absence of symptoms. In the case of invasive
38 infection bacteria can be isolated from the bloodstream and/or the cerebrospinal fluid (Pron *et*
39 *al.*, 1997, Nassif *et al.*, 2002).

40 The ability of meningococci to adhere to host cells has emerged as a key step in the
41 pathogenesis process (Melican *et al.*, 2012). In the nasopharynx the bacterium adheres to
42 epithelial cells and forms microcolonies on the cellular surface likely allowing its survival and
43 proliferation at this site prior to accessing the blood (Stephens *et al.*, 1983). Histological analysis
44 of human cases of invasive infection reveals bacteria in tight association with blood vessels in
45 different organs including the brain. Bacteria appear as tight clusters that can completely fill
46 capillaries (Mairey *et al.*, 2006). Infected capillaries in the brain are likely sites of cerebrospinal
47 fluid colonization in meningitis cases. Recently, the importance of bacterial interaction with
48 endothelial cells in triggering vascular damage during sepsis has been demonstrated in an
49 animal model of infection (Melican *et al.*, 2013).

50 *Neisseria meningitidis* expresses several adhesins. Type IV pili (tfp) have emerged as central
51 players because they are expressed by all clinical strains and because adhesion is drastically
52 reduced in the absence of these bacterial structures. Tfp are long filamentous organelles that can
53 measure up to several microns. Tfp are helical polymers of a protein known as the major pilin,
54 PilE in the case of *Neisseria* species (Giltner *et al.*, 2012). Functional pilus expression on the
55 bacterial surface requires a complex machinery composed of over 20 proteins (Carbonnelle *et*
56 *al.*, 2006).

57 Following adhesion, bacteria and host cells engage in an elaborate crosstalk process, which
58 also involves type IV pili (Merz *et al.*, 1999, Mikaty *et al.*, 2009). Adhering meningococci trigger a
59 local remodeling of host cell plasma membrane. The area of plasma membrane located under
60 bacterial microcolonies forms numerous flexible filopodia-like structures intertwined between
61 aggregated bacteria (Eugene *et al.*, 2002). This cellular response has been observed *in vitro* on
62 cells in culture and has been seen in human cases of meningococemia (Nassif *et al.*, 2002).
63 Bacteria-induced protrusions allow most bacteria to be in direct contact with host cells and this
64 has been shown to enhance the cohesion of bacterial microcolonies. In the absence of cellular
65 protrusions the mechanical forces generated by blood flow dissociate bacterial aggregates thus
66 preventing efficient endothelium colonization (Mikaty *et al.*, 2009).

67 At the molecular level, membrane remodeling is accompanied by the accumulation of
68 several proteins under the microcolony that organize in a shape reminiscent of a honeycomb.
69 This structure is sometimes referred to as a “cortical plaque”. Those structures are formed by
70 the accumulation of adhesion molecules, membrane receptors (Doulet *et al.*, 2006, Merz *et al.*,
71 1999), molecular linkers, such as ezrin and moesin (Eugene *et al.*, 2002), components of the actin
72 cytoskeleton and junctional proteins (Coureuil *et al.*, 2009). Another important consequence of
73 the recruitment of junctional proteins is the weakening of existing junctions between
74 endothelial cells, potentially providing a way for bacteria to exit the vessel lumen (Coureuil *et al.*,
75 2009). A key aspect of this crosstalk is the activation of a number of signaling pathways,
76 including the activation of Src kinase (Hoffmann *et al.*, 2001), of Rho, Cdc42 (Eugene *et al.*,
77 2002), Rac1 (Lambotin *et al.*, 2005) GTPases, PI3-kinase, mitogen-activated protein kinases
78 (Sokolova *et al.*, 2004) and most recently of the β 2 adrenergic receptor/ β arrestin pathway
79 (Coureuil *et al.*, 2010). The exact relationship between these different pathways, their impact on
80 protein accumulation and plasma membrane remodeling remain unclear.

81 The aim of this study is to better understand the mechanisms of the crosstalk between the
82 bacterium and the host cell, a key feature of the pathogenesis process that stabilizes bacterial

83 aggregates on the host cell surface and favors the opening of cellular junctions. Although
84 numerous components involved in bacterial crosstalk with host cells have been described both
85 on the cellular and bacterial side, the functional connections and sequence of events remain
86 unclear. Most studies were performed on fixed cell preparations taken from a few infection time
87 points, thus only providing a static view of the tfp-mediated cellular response. The value of
88 dynamic studies is increasingly recognized to understand cellular biology processes in
89 general(Taylor *et al.*, 2011) and host pathogen interactions in particular(Ray *et al.*, 2010). The
90 present study was designed to decrypt how the multiple components involved in
91 meningococcus-induced cellular response are organized temporally with high resolution both in
92 time and space.We found that meningococci-triggered plasma membrane remodeling occurs
93 prior to actin reorganization and independently of ATP dependent intracellular pathways.

94 **Results**

95 ***High spatio-temporal resolution imaging of cellular components under meningococcus*** 96 ***aggregates***

97 To gain high temporal and spatial resolution we took advantage of spinning disc confocal
98 microscopy. This approach allowed multidimensional imaging with rapid acquisition of Z-stacks
99 at several wavelengths every 5 seconds over selected periods of time. Ezrin, a cytoplasmic
100 protein linking the actin cytoskeleton with the cytoplasmic tail of transmembranereceptors, was
101 chosen as a reporter protein using a GFP fusion protein. Ezrin has been frequently used as a
102 read-out of cortical plaque formation on fixed samples (Eugene *et al.*, 2002, Mikaty *et al.*, 2009).

103 Bacteria-induced cellular response occurs only after a number of bacterial divisions and is
104 visible only under aggregates containing over 10 bacteria (Movie S1). To avoid issues linked to
105 bacterial proliferation and to synchronize the infection process, bacterial aggregates that
106 spontaneously form in culture were used for the infection. Human umbilical vein endothelial
107 cells (HUVECs) were transfected with a construct expressing carboxy-terminally-tagged ezrin

108 fusion protein (Lamb *et al.*, 1997) and infected with bacterial aggregates expressing the mCherry
109 fluorescent protein.

110 Contact of bacterial aggregates with transfected cells led to the rapid formation of a typical
111 “honeycomb lattice” type of organization of ezrin under microcolonies (Fig. 1A, Movie S2). Ezrin
112 accumulation was detectable as early as 5 seconds after initial contact in certain cases. The effect
113 was robust as over 90% of bacterial aggregates triggered a visible response upon contact with
114 the cells.

115 To obtain quantitative evaluation of cellular protein accumulation under microcolonies we
116 designed a plug-in in the ICY image analysis software called *Intensity profiler* (de Chaumont *et al.*,
117 2012). Analysis is performed within a volume defined by a region of interest (Fig. 1A, ROI-1).
118 Another ROI is selected on the same cell in a similar area relative to the nucleus and cell border
119 to determine the background signal (Fig. 1A, ROI-2). *Intensity profiler* first determines the time
120 of contact between the bacterial aggregates and the cells using the mCherry channel (t_{ini}). To
121 ensure a three-dimensional quantification of the GFP fusion protein, an averaged projection over
122 the Z-axis was used. The raw fluorescence intensity in both ROI was quantified and plotted over
123 time (Fig. 1B). The raw fluorescence intensity was then corrected for background and bleaching,
124 to obtain the net fluorescence intensity (Fig. 1C). Next, the ratio between the corrected signal at
125 a given time relative to the time of contact was calculated (Fig. 1D). The same procedure was
126 repeated to accumulate 28 adhesion events and 10 representative curves are presented (Fig.
127 1E). The same approach based on averaging of curves was used for the remainder of the
128 study. Ezrin recruitment typically showed a strikingly rapid increase, on average 23 ± 16 s after
129 contact of the aggregate with the cell surface. Fluorescence continued to increase until a plateau
130 value of about 1.8 fold over the initial value after 5 minutes.

131 Spinning disc confocal microscopy combined with the *Intensity profiler* plug-in for the ICY
132 software thus provides an efficient way to quantitatively assess the recruitment of cellular

133 proteins under bacterial aggregates with high resolution in time and space. This approach
134 reveals a potent and rapid response following bacterial contact.

135 ***Bacterial factors involved in membrane remodeling***

136 Type IV pili are multicomponent machineries that are known to be involved in the crosstalk
137 with host cells but the exact mechanism by which tfp induce plasma membrane reorganization is
138 not known. We previously described the importance of the minor pilinPilV in this process
139 (Mikaty *et al.*, 2009). PilV is a protein with structural features common to the major pilin and is
140 thought to insert in the pilus structure and modify its properties. Other studies pointed to the
141 importance of pilus retraction, a process powered by the PilT ATPase (Higashi *et al.*, 2009, Merz
142 *et al.*, 1999).

143 To determine at which stage PilV is involved in the crosstalk with host cells, aggregates
144 formed by a mutant defective for PilV expression ($\Delta pilV$) were used for infection of ezrin-GFP
145 transfected cells. Cells challenged with the mutant strain failed to initiate the accumulation of
146 ezrin (Fig. 2A). The $\Delta pilT$ mutant displayed a strong heterogeneity, some aggregates triggered a
147 potent response and others no visible response (Fig. 2B). On average, ezrin recruitment under
148 $\Delta pilT$ aggregates was largely impaired but with a progressive increase in time at a low rate (Fig.
149 2C). These results suggested that the $\Delta pilT$ mutant might be altered in the time at which the
150 cellular components start to accumulate. To demonstrate this possibility the time at which the
151 response was initiated was determined and plotted as a function of time with longer times of
152 infection in intervals of 5 minutes. While wild type bacteria triggered the cellular response
153 within seconds after contact, the $\Delta pilT$ mutant was slow in triggering ezrin reorganization
154 (Movie S3). The time of response initiation was highly variable with an average of 40 minutes
155 (Fig. 2D). Interestingly, in certain instances $\Delta pilT$ aggregates initiated a response which then
156 disappeared, a phenomenon that was never observed in wild type bacteria. Pilus retraction is
157 thus necessary to determine the time of initiation and maintenance of the response.

158 Our observations indicate that the minor pilinPilV acts as a trigger on the host cell to induce
159 membrane remodeling and subsequent cellular components accumulation underneath
160 aggregates. The PilT-dependent retraction is not in itself necessary to trigger the response as
161 many aggregates eventually trigger this response but it provides the appropriate conditions for
162 the initiation and maintenance of the process.

163 ***Kinetics of accumulation of cellular components under N. meningitidis microcolonies***

164 A large number of proteins have been described to accumulate in the cortical plaque
165 formation under *N. meningitidis* microcolonies and as a first approach we chose to focus the
166 study on four representative cellular components: the actin cytoskeleton, the plasma membrane,
167 the cytoplasm and ezrin as described above. The LifeAct peptide fused to mCherry was used as a
168 probe for F-actin accumulation. A GFP targeted to the inner leaflet of the plasma membrane with
169 a farnesylation signal (CAAX box) was used to visualize membrane remodeling and
170 accumulation. Cytoplasm was visualized by expression of unmodified GFP. HUVECs cells were
171 transfected with these plasmids, infected with pre-formed aggregates and data were analyzed
172 using *Intensity profiler* as described before.

173 At first glance, accumulation of plasma membrane, F-actin and cytoplasm was similar to that
174 of ezrin both morphologically and kinetically (Fig. 3A). A typical “honeycomb” type of
175 morphology could be observed for all reporter proteins. In the case of F-actin, stress fibers were
176 frequently observed radiating from the site of adhesion. All markers accumulated rapidly after
177 bacterial contact and reached a maximum intensity after 2-4 minutes. To reduce the variation
178 between individual adhesion events and to enhance resolution, curves of protein accumulation
179 following 20-30 adhesion events were averaged (Fig. 3B). Ezrin recruitment was markedly more
180 intense than other markers. Whereas ezrin accumulation showed a 1.8-fold increase, actin only
181 exhibited a 1.4-fold rise. To compare the kinetics of recruitment of the different proteins, values
182 were normalized and an exponential regression was performed (Fig. 3C). A time at which
183 recruitment reaches 50% of maximum can be inferred from these curves ($t_{1/2}$). Membrane, ezrin,

184 actin and bulk cytoplasm showed a $t_{1/2}$ of ~86, ~96, ~145 and ~199 seconds respectively. This
185 analysis suggests a sequence of events with ezrin and membrane being recruited first, followed
186 by actin and finally bulk cytoplasm. To confirm these results, double transfections were
187 performed to follow the recruitment of two cellular components at the same time in a single
188 adhesion event. In these experiments bacteria expressing the blue fluorescence protein
189 mTagBFP2 were used (Subach *et al.*, 2011). For each adhesion event the time at which
190 recruitment of the membrane marker and actin could be detected were analyzed (Fig. 3D). For
191 every event analyzed the membrane marker was detected before actin with an average time
192 difference of 10s. The same strategy was used to compare actin and bulk cytoplasm
193 accumulation also confirming previous observations with actin reaching the microcolony 60
194 seconds before bulk cytoplasm (Fig. 3E).

195 Our results show that the accumulation of cellular components under the bacterial
196 microcolony is extremely rapid, starting nearly immediately after contact of the microcolony
197 with the host cell and rapidly reaching a maximum intensity. They further point to an
198 unexpected sequence of events with membrane and ezrin accumulating first under the bacterial
199 aggregates followed by F-actin and finally bulk cytoplasm.

200 ***Actin polymerization is not the triggering event for bacteria induced plasma membrane*** 201 ***reorganization***

202 The above results indicated that membrane accumulation precedes F-actin accumulation
203 and raised the question of a functional role of actin in this process. To address this, actin
204 cytoskeleton was disrupted by cytochalasin D (CD) treatment prior to infection. Treatment of
205 endothelial cells with 1 μ M CD for 20 minutes led to a complete disruption of actin filaments
206 (Movie S4). Surprisingly, on CD treated cells both membrane and ezrin started to accumulate
207 soon after contact between the aggregate and the cell surface (Fig. 4A). Strikingly, maximal
208 intensities for ezrin and membrane were higher than in untreated conditions with 2.2- and 1.7-
209 fold increases respectively (Fig. 4B). The accumulation only reached saturation 10 minutes after

210 contact. Similar results were obtained when bulk cytoplasm was measured in the presence of
211 the actin-disrupting drug.

212 These observations show that actin polymerization is not the leading event of the cellular
213 response, as polymerization inhibition does not affect membrane remodeling. On the contrary
214 actin cytoskeleton disruption favored plasma membrane accumulation possibly by releasing
215 cellular membrane tension.

216 ***Cholesterol depletion blocks the initiation of bacteria-induced plasma membrane*** 217 ***reorganization and actin cytoskeleton accumulation***

218 As the plasma membrane reorganization was the earliest event detectable following
219 bacterial contact we focused on the properties of the plasma membrane itself. Cholesterol
220 depletion from cell membranes with methyl- β -cyclodextrin (M β CD) was previously shown to
221 affect bacteria induced cellular response after 2 hours of infection (Mikaty *et al.*, 2009) and we
222 then evaluated the impact of this drug on the kinetics of the process. When M β CD-treated cells
223 were infected by meningococci, membrane remodeling, F-actin or ezrin accumulations were not
224 found underneath aggregates (Fig. 5A -D).

225 Cholesterol is known to be an important structuring component of the lipid bilayer,
226 allowing clustering of lipids and proteins in specific domains. The results presented above
227 demonstrate that plasma membrane properties are critical in the crosstalk between the bacteria
228 and host cells. These results are also in favor of a sequence of events where membrane
229 deformation is the initial event leading to actin cytoskeleton reorganization and accumulation of
230 associated proteins.

231 ***Membrane remodeling does not require intracellular ATP***

232 As the actin cytoskeleton does not appear to play a significant role in bacteria-induced
233 plasma membrane reorganization, intracellular pathways activated upon bacterial adhesion
234 were investigated. Recently, the β 2-adrenoceptor (β 2AR) was reported to participate in a

235 pathway leading to the recruitment of cellular components under adhering *N.*
236 *meningitidis*(Coureuil *et al.*, 2010, Lecuyer *et al.*, 2012). On fixed samples, induction of the β 2AR
237 endocytosis by the specific agonist isoproterenol (ISO) was shown to reduce the recruitment of
238 ezrin under microcolonies after 2 hours of infection.

239 Cells were treated for 2 hours prior to infection with 10 μ M ISO and accumulation of cellular
240 components was monitored. The accumulation of ezrin started as rapidly as on control cells
241 (Fig.6A), almost immediately after contact between the aggregates and the cell surface.
242 However, in isoproterenol treated cells ezrin reached a plateau earlier and at a lower ratio (1.5
243 compared to 1.8). Similar results were obtained for F-actin accumulation with normal initiation
244 and lower plateau values (Fig. 6B). Thus perturbation of β 2AR signaling does not affect the
245 initiation of ezrin and F-actin accumulation but rather the extent of the process. Accumulation of
246 the plasma membrane marker showed a strikingly different pattern with a higher rate of
247 accumulation at initial time points and a delayed time prior to reaching plateau at a higher value
248 (Fig. 6C). These observations indicate that the β 2AR is not involved in the induction of plasma
249 membrane remodeling but affects the extent of intracellular components accumulation.

250 Rather than testing individual signaling pathways, a strategy blocking intracellular signaling
251 in a global way was sought. Since many signaling cascades engage secondary messengers whose
252 production or activation require energy in the form of ATP, we assessed the effect of energy
253 depletion on the accumulation of cellular components underneath meningococcus aggregates.
254 Treatment of HUVECs with an energy-depleting medium (see *Experimental Procedures*) blocking
255 glycolysis and respiration led to inhibition of ATP production ($9\pm 5\%$ of normal ATP levels).
256 When energy-depleted cells were challenged with bacterial aggregates, ezrin and actin
257 accumulated slower compared to control cells (Fig.6D and E). Membrane, however, still
258 accumulated underneath aggregates on energy-depleted cells with a similar profile as on control
259 cells (Fig.6F) and even reaching higher values. To evaluate the functional impact of the ATP
260 depletion, this treatment was tested on the ability of the pathogenic bacterium *Shigella flexneri* to

261 induce the formation of entry foci upon invasion. In the same conditions, ATP depletion
262 decreased the ability of *S. flexneri* to form entry foci by over ten-fold, confirming the efficiency of
263 the depletion. Strikingly, energy in the form of ATP in host cells is thus not required for
264 meningococcus to induce plasma membrane remodeling indicating that common intracellular
265 pathways are not required for this process.

266

267 **Discussion**

268 In the past, our knowledge of the interaction of *Neisseria meningitidis* with host cells largely
269 relied on static immunofluorescence or electron microscopy images. The present study, based
270 on live cell imaging, provides a more complete view by taking into account the complex spatio-
271 temporal dimension of the process. This approach reveals a rapid sequence of events depicted in
272 Fig. 7 that starts a few seconds only after bacterial contact with cells.

273 Each individual bacterium expresses a large number of pili on its surface that interact with
274 pili from neighboring bacteria thus forming a meshwork that allow the formation of spherical
275 bacterial aggregates. Type IV pili are heterogeneous in length and can measure up to several
276 microns. The first contact between bacterial aggregates and host cells is most probably mediated
277 by the pili themselves, rapidly followed by the bacterial bodies. The first cellular event that could
278 be detected was the plasma membrane reorganization and accumulation under the bacterial
279 aggregates. A change in plasma membrane organization was detected on average 17 seconds
280 after contact. Ezrin accumulation followed the kinetics of the plasma membrane and about 15
281 seconds later reorganization of actin cytoskeleton could be detected. Finally, bulk cytoplasm
282 started to accumulate with an average value of 80 seconds.

283 On the bacterial side two pili-associated bacterial factors have been described as playing a
284 role in triggering the cellular response following bacterial adhesion, the minor pilin PilV and the
285 PilT ATPase. A strain deficient for PilV expression is unable to trigger plasma membrane

286 reorganization or the accumulation of any of the proteins tested in this study. These results show
287 that PilV is involved in the initial events that trigger the cellular response although the
288 mechanisms of action of this protein still remain unidentified. The PilT ATPase powers the pilus
289 retraction motor (Merz *et al.*, 2000). As this retraction generates intense force it was suggested
290 that retraction could be responsible for plasma membrane accumulation and actin cytoskeleton
291 reorganization (Higashi *et al.*, 2009). In contrast with the results presented here, we had shown in
292 a previous publication that the $\Delta pilT$ mutant triggered plasma membrane reorganization nearly
293 as efficiently as the wild type strain on fixed samples after 2 hours of infection (Mikaty *et al.*,
294 2009). The present dynamic study perhaps reconciles these studies by showing that the $\Delta pilT$
295 mutant is slower in initializing the response but once initiated the intensity of the response is
296 unaltered. Certain aggregates can stay in apparent contact with host cells for over an hour
297 without triggering plasma membrane reorganization. Interestingly, in certain cases we observed
298 intermittent accumulation of cellular components. Based on these results and the observation of
299 numerous interaction events we propose that pilus retraction, mediated by PilT, is necessary to
300 maintain intimate contact between the cells and the bacterial bodies rather than triggering the
301 response itself. In the absence of PilT, pili grow continuously and it can be envisioned that this
302 elongation pushes the bacterial bodies away from the cells rather than bringing them closer.

303 The use of pharmacological inhibitors allowed the dissection of cellular pathways involved.
304 The β 2-adrenergic-dependent signaling pathway described recently (Coureuil *et al.*, 2010) does
305 not seem to participate in the reorganization of the plasma membrane but rather on subsequent
306 events. Plasma membrane reorganization is independent of any ATP-dependent signaling
307 pathway. This rules out a large number of intracellular signal transduction pathways in
308 particular those involving protein or lipid kinases. In accordance with these results plasma
309 membrane reorganization occurs separately from the actin cytoskeleton as perturbation of actin
310 polymerization with cytochalasinD does not affect the process. In addition, analysis of the
311 kinetics of accumulation indicates that actin accumulates after the plasma membrane. On the
312 contrary, actin cytoskeleton disorganization in fact enhanced the amount of plasma membrane

313 accumulation under bacterial aggregates. This observation could be related to the implication of
314 the actin cytoskeleton in maintaining surface tension (Hochmuth *et al.*, 1996). In the absence of
315 actin cytoskeleton the surface tension is lower and bacteria would be able to accumulate more
316 plasma membrane. The absence of implication of common intracellular pathways and of the
317 actin cytoskeleton could be explained by a direct impact of bacteria on the plasma membrane
318 rather than an indirect effect via intracellular intermediates, although this point will require
319 further work. In line with this hypothesis proper plasma membrane composition is necessary for
320 the initiation of the process.

321 Although the actin cytoskeleton does not appear to play a role in the initial events F-actin is
322 nevertheless recruited under the bacterial aggregates in large amounts. The fact that alteration
323 of plasma membrane composition blocks F-actin accumulation suggests that actin
324 reorganization is a consequence of the initial membrane deformation. Several studies have
325 shown that mechanical membrane deformation leads to intracellular signal transduction and
326 actin cytoskeleton reorganization (Galbraith *et al.*, 2002). If bacteria trigger membrane
327 deformation from the outside, the actin cytoskeleton would thus be predicted to reorganize
328 under the microcolony. As previously described, perturbation of the β 2AR-dependent signaling
329 pathway led to a decrease in the amount of actin recruited under the microcolony. It is not clear
330 at this point how this signaling pathway comes into play, either directly by linking membrane
331 deformation to the actin cytoskeleton or indirectly by recruiting key components of the
332 cytoskeleton at other sites. The pattern of actin recruitment after isoproterenol treatment,
333 which is initiated normally and reaches a plateau earlier is in favor of the latter hypothesis.

334 The accumulation of ezrin under the microcolony follows a complex pattern, both related to
335 plasma membrane and actin reorganization. Ezrin accumulation is detected as early as the
336 plasma membrane and follows a similar pattern in untreated samples. When the actin
337 cytoskeleton is disrupted, large amounts of ezrin are still recruited indicating that a pool of ezrin
338 is associated with the membrane independently of the actin cytoskeleton. In certain instances
339 however ezrinlocalization can be separated from the membrane. Isoproterenol treatment and

340 cellular ATP depletion decrease ezrin recruitment but not membrane reorganization. This is
341 most striking when ATP is depleted from the cells: ezrin accumulation is strongly affected
342 although membrane accumulation is increased. This dissociation suggests that ezrin
343 accompanies membrane deformation rather than playing an active role in triggering this
344 process.

345 After the initiation of F-actin reorganization under the microcolony, bulk cytoplasm
346 accumulates. This accumulation likely reflects the content of the cellular projections in
347 cytoplasm. The fact that cytoplasm accumulation is delayed compared to plasma membrane
348 accumulation suggests that once projections are formed they undergo a change in morphology
349 enabling access of more cytoplasm. The precise nature of this potential morphological change is
350 unknown at this point. An alternative would be that the access of cytoplasmic content is initially
351 restricted and only after release of this restriction can the cytoplasm access the protrusion. Actin
352 cytoskeleton disruption did not perturb bulk cytoplasm accumulation indicating that the actin
353 cytoskeleton is not involved in this late event.

354 A key point of the experimental strategy used in this study was the use of preformed
355 aggregates rather than individual bacteria. Using aggregates permitted definition of a clear
356 starting point in the sequence of events. Another advantage was the dissociation of plasma
357 membrane reorganization, which occurs at the scale of seconds from bacterial division, which
358 takes about one hour. Nevertheless, it is difficult to assert whether our observations based on
359 preformed aggregates apply to individual bacteria growing on the cellular surface. A prediction
360 is that as the microcolony grows on the cellular surface the plasma membrane will immediately
361 reorganize around the newly divided bacteria. This can be observed in movie S1 for instance.
362 One implication is that growing bacteria are constantly wrapped in plasma membrane
363 projections. Furthermore, the precise events taking place *in vivo* are not clear at this point,
364 whether the initial adhesion event only involves a single bacterium or whether small aggregates
365 first interact with endothelial cells.

366 Studying the dynamics of the interaction of *N. meningitidis* with endothelial cells reveals
367 some unique features, in particular the speed at which this occurs as the process is initiated in
368 less than one minute. The other striking feature is the fact that the bacteria induce the formation
369 of membrane structures that are morphologically related to filopodia but form independently of
370 actin and of common intracellular signaling pathways. Rather, plasma membrane deformation
371 appears to trigger a cascade of events leading to intracellular signaling and actin reorganization.
372 Identifying the mechanisms that allow *Neisseria meningitidis* to trigger the plasma membrane
373 remodeling represents the main challenge for future studies.

374 **Experimental procedures**

375 ***Cell culture***

376 Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs, Promocell) were maintained in Endo-SFM
377 Glutamine 2mM (Gibco) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, PAA
378 Laboratories), and 10 µg/ml endothelial cells growth supplement (ECGS, Harbor Bioproducts).
379 For transfection experiments, cells were used between passage 3 and 9 and 5x10⁵ cells were
380 transfected with 4 µg plasmid DNA using the AmaxaNucleofector Kit for HUVECs
381 (AmaxaBiosystem, Lonza) according to the manufacturer protocol (<http://www.lonzabio.com>).
382 Plasmids encoding for ezrin-GFP (Lamb *et al.*, 1997), Farnesyl-GFP which contains a CAAX box
383 (Clontech, pEGFP-F) and cytoplasmic-expressed GFP (pMax-GFP, Lonza) were described
384 previously. The plasmid encoding LifeAct-mCherry was a kind gift from Guillaume Montagnac
385 (Institut Curie, Paris). Transfected cells were then cultivated at 37°C + 5% CO₂ in moist
386 atmosphere either in disposable µ-slides (µ-Slide VI^{0.4}ibitreat, IBIDI, Biovalley) for microcolony
387 proliferation experiments, or in disposable µ-dishes (µ-Dish^{35mm, low}, IBIDI) or in 96-well plates
388 (µ-clear®, Greiner BioOne) coated with 0.1% rat tail collagen I (Sigma-Aldrich).

389 Treatments with inhibitors were performed in Endo-SFM + 10% FBS for cytochalasinD (CD,
390 1 µM), isoproterenol (ISO, 10 µM, (Coureuil *et al.*, 2010)) and methyl-β-cyclodextrin (MβCD, 4
391 mM). For ATP depletion, treatment was performed in DMEM without glucose (Invitrogen) +

392 10% FBS containing 10 mM sodium azide (Sigma-Aldrich) and 10 mM 2-deoxy-D-glucose (2-DG,
393 Sigma-Aldrich). Control cells were incubated in DMEM without glucose supplemented with 5
394 mM glucose (Sigma-Aldrich, (Romer *et al.*, 2007)). Treatments were performed 2 hours prior to
395 infection for ISO and M β CD, 30 or 20 minutes prior to infection for ATP depletion and CD
396 respectively and maintained through the course of the experiment. ATP depletion efficiency was
397 assessed using the commercially available kit Adenosine 5'-triphosphate Bioluminescent Assay
398 (Sigma-Aldrich).

399 **Bacterial strains and culture**

400 *Neisseria meningitidis* strains were derived from the 8013 clone 12, a serogroup C clinical
401 isolate expressing capsule and class I SB piline, Opa⁻ and Opc⁻(Rusniok *et al.*, 2009, Nassif *et al.*,
402 1993). *N. meningitidis* is grown on solid GCB Agar (Difco) containing Kellogg's supplements
403 (Kellogg *et al.*, 1968) and antibiotics when required: kanamycin (100 μ l/ml), chloramphenicol (5
404 μ l/ml) or erythromycin (4 μ l/ml), at 37°C + 5% CO₂ under moist atmosphere. For infection
405 experiments, overnight cultures on solid plates were suspended in Endo-SFM + 10% FBS at an
406 OD_{600nm} = 0.05 and cultivated for 2 hours with shaking at 37°C + 5% CO₂. Formation of bacterial
407 aggregates after this period was assessed microscopically. $\Delta pilV$ and $\Delta pilT$ mutant strains are
408 described elsewhere (Mikaty *et al.*, 2009, Pujol *et al.*, 1999).

409 A series of plasmids were constructed to allow chromosomal expression of fluorescent
410 proteins under the control of the *pilE* promoter. Inducible genes were inserted between the *recC*
411 (NMV_0648) and *mrtF* (NMV_0649) genes. Two fragments on either side of the insertion site
412 were PCR amplified from *N. meningitidis* chromosomal DNA with the RecCF/R and MrtFF/R
413 primer pairs (see Table 1 for primer sequences), cloned in the Topo 2.1 and checked for
414 sequence. Both fragments were restricted with the enzymes indicated in bold and cloned in the
415 pBluescript vector (Stratagene) generating plasmid pMGC1. A chloramphenicol cassette
416 bordered by two BamHI sites from the pT1Cm1 vector (Klee *et al.*, 2000) was then inserted in
417 the BamHI site in between the two chromosomal regions in pMGC1 generating pMGC3. A 305

418 nucleotide long promoter region of *pilE* was amplified from genomic DNA with primers
419 PrPilEF/R, cloned in Topo2.1, sequenced, restricted by indicated enzymes and subcloned in the
420 pMGC3. The mCherry open reading frame was amplified from the pmCherry-N1 vector
421 (Clontech) with primers mCherryF/R, restricted and subcloned in obtained vector thus
422 generating pMGC5. The GFP open reading frame was amplified from the pAM239 plasmid
423 (Solomon *et al.*, 2003) with primers GFPF/R, restricted with indicated enzymes and subcloned in
424 pMGC5 thus generating pMGC7. The mTagBFP2 protein was amplified from the pBadmTagBFP2
425 plasmid (Addgene, (Subach *et al.*, 2011)) using the primer BFPP/R, restricted and cloned in
426 pMGC5 generating pMGC8.

427 ***Fluorescence microscopy***

428 All experiments were performed on an inverted microscope (Eclipse Ti, Nikon) through a
429 1.30 NA oil-immersion objective (CFI Plan Fluor 40x oil, Nikon). To perform spatial high-
430 resolution acquisition, a fast Z-piezo stage (Piezo Nano Z100) was adapted onto the XY platform
431 of the microscope and the set-up coupled to a laser-based spinning disk confocal microscopy
432 system (CSU-X1, Yokogawa), equipped with lasers at 405 nm, 491 nm and 561 nm. All
433 experiments were performed at 37°C in an incubation chamber adapted for the microscope (LIS
434 Microscope Temperature Control System). Focus was maintained with Perfect Focus System
435 (PFS, Nikon). A high-resolution digital camera (Evolve, Photometrics) was used for Image
436 acquisition. The set-up was controlled by the MetaMorph software (Universal Imaging,
437 Molecular Devices).

438 For infection, overnight culture medium was replaced by 100 µl of fresh or treatment
439 medium for the indicated times prior to infection. The plate was placed on the microscope stage
440 and 50 µl of medium removed and 50 µl of the bacterial culture ($OD_{600nm} \sim 0.3$) was added.
441 Acquisition was started when bacteria appeared in the observation field. Images were acquired
442 over 5 µm along the Z-axis with 1 µm steps for all experiments. Time-lapse parameters were set-
443 up for image acquisition every 5 seconds over a period of 10-20 minutes.

444 ***Image analysis***

445 A plug-in called *intensity profiler* described below was developed specifically to analyze the
446 images in the context of the ICY community platform for bioimage informatics ((de Chaumont *et*
447 *al.*, 2012), <http://icy.bioimageanalysis.org>).

448 *ROI selection*

449 Multi-dimensional files (5D hyperstacks) acquired with MetaMorph were processed with
450 ImageJ software ((Schneider *et al.*, 2012), <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) to generate stacks
451 corresponding to timelapse images acquired in the blue, green and red channel, with an
452 averaged projection along the Z-axis. The ICY software was used to select two regions of
453 interest, ROI-1, around a bacterial aggregate establishing a contact with a cell, and ROI-2, in an
454 uninfected part of the same cell to determine the background intensity. Each ROI is assigned a
455 “bacteria” and a “protein” channel.

456 *Time of initial contact of the aggregate, t_{ini}*

457 Time of initial of contact (t_{ini}) between the bacterial aggregate and the cell was determined
458 by identifying the first sharp increase (+ 20%) between two time points of the average
459 fluorescence intensity within ROI-1 on the “bacteria” channel.

460 *Net fluorescence intensity, $S(t)$*

461 The raw intensity $I(t)$ is equal to the sum of a nearly constant background intensity B_1 and
462 the fluorescence variation $S(t)$ triggered by the contact between the bacteria aggregate and the
463 cell membrane. In addition, thermal fluctuations can induce jumps $h(t)$ in fluorescence intensity
464 and the bleaching was modeled with a decreasing exponential function (Molski, 2001) leading to
465 the formula

466
$$I(t) = (B_1 + S(t))h(t)\exp(-t/\hat{\delta}),$$

467 where $\hat{\delta}$ is the time constant of the bleaching process. Similarly, variations of the averaged

468 intensity $B(t)$ in the background ROI-2 are mainly due to thermal fluctuations and bleaching,
469 leading to the relation

470
$$B(t) = B_2 h(t) \exp(-t/\delta),$$

471 where B_2 is the constant background intensity in ROI-2. Because we assumed that $S(t_{ini}) = 0$ and
472 $h(t_{ini}) = 0$, the background constants are equal to $B_1 = I(t_{ini})$ and $B_2 = B(t_{ini})$, leading to

473
$$I(t) = (I(t_{ini}) + S(t)) h(t) \exp(-t/\delta), \text{ and } B(t) = B(t_{ini}) h(t) \exp(-t/\delta).$$

474 Finally, combining equations above, we were able to extract the marginal fluorescence variation
475 $S(t)$ induced by the bacteria aggregate from the measurements of the raw intensities $I(t)$ and
476 $B(t)$:

477
$$S(t) = I(t) B(t_{ini}) / B(t) - I(t_{ini}).$$

478 *Ratio of fluorescence*

479 To access quantitative variations of fluorescence intensity, the relative net increase in
480 signal intensity $R(t)$ between signal intensity at t_{ini} $I(t_{ini})$, and corrected intensity at time t ,
481 $I(t_{ini}) + S(t)$, was computed and plotted over time.

482
$$R(t) = (I(t_{ini}) + S(t)) / I(t_{ini})$$

483

483

484 **Acknowledgements**

485 Authors would like to thank: Fabrice de Chaumont at the Pasteur Institute for initial help with
486 ICY Software; Keira Melican, Ana Maria Lennon-Dumenil and Jost Enninga for critical reading of
487 the manuscript; Guy Tran Van Nhieu for providing the M90T *Shigella flexneri* strain as well as for
488 fruitful discussions; and Patricia Bassereau for fruitful discussions. This work was supported by
489 Fondation pour la Recherche Médicale FRM and the French ministry for research and higher
490 education (MS); the Avenir INSERM Starting Grant; a CODDIM equipment grant (Région Ile de
491 France) and by a European Research Council starting grant.

492

493 **References**

- 494 Carbonnelle, E., Helaine, S., Nassif, X. and Pelicic, V. (2006). A systematic genetic analysis in
495 *Neisseria meningitidis* defines the Pil proteins required for assembly, functionality,
496 stabilization and export of type IV pili. *Mol Microbiol* **61**, 1510-1522.
- 497 Coureuil, M., Lecuyer, H., Scott, M.G., Boularan, C., Enslin, H., Soyer, M., *et al.* (2010).
498 Meningococcus Hijacks a beta2-adrenoceptor/beta-Arrestin pathway to cross brain
499 microvasculature endothelium. *Cell* **143**, 1149-1160.
- 500 Coureuil, M., Mikaty, G., Miller, F., Lecuyer, H., Bernard, C., Bourdoulous, S., *et al.* (2009).
501 Meningococcal type IV pili recruit the polarity complex to cross the brain endothelium.
502 *Science* **325**, 83-87.
- 503 de Chaumont, F., Dallongeville, S., Chenouard, N., Herve, N., Pop, S., Provoost, T., *et al.* (2012). Icy:
504 an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat Meth* **9**,
505 690-696.
- 506 Doulet, N., Donnadieu, E., Laran-Chich, M.P., Niedergang, F., Nassif, X., Couraud, P.O. and
507 Bourdoulous, S. (2006). *Neisseria meningitidis* infection of human endothelial cells

508 interferes with leukocyte transmigration by preventing the formation of endothelial
509 docking structures. *J Cell Biol***173**, 627-637.

510 Eugene, E., Hoffmann, I., Pujol, C., Couraud, P.O., Bourdoulous, S. and Nassif, X. (2002). Microvilli-
511 like structures are associated with the internalization of virulent capsulated *Neisseria*
512 meningitidis into vascular endothelial cells. *J Cell Sci***115**, 1231-1241.

513 Galbraith, C.G., Yamada, K.M. and Sheetz, M.P. (2002). The relationship between force and focal
514 complex development. *J Cell Biol***159**, 695-705.

515 Giltner, C.L., Nguyen, Y. and Burrows, L.L. (2012). Type IV pilin proteins: versatile molecular
516 modules. *Microbiol Mol Biol Rev***76**, 740-772.

517 Higashi, D.L., Zhang, G.H., Biais, N., Myers, L.R., Weyand, N.J., Elliott, D.A. and So, M. (2009).
518 Influence of type IV pilus retraction on the architecture of the *Neisseria gonorrhoeae*-
519 infected cell cortex. *Microbiology***155**, 4084-4092.

520 Hochmuth, F.M., Shao, J.Y., Dai, J. and Sheetz, M.P. (1996). Deformation and flow of membrane
521 into tethers extracted from neuronal growth cones. *Biophys J***70**, 358-369.

522 Hoffmann, I., Eugene, E., Nassif, X., Couraud, P.O. and Bourdoulous, S. (2001). Activation of ErbB2
523 receptor tyrosine kinase supports invasion of endothelial cells by *Neisseria meningitidis*.
524 *J Cell Biol***155**, 133-143.

525 Kellogg, D.S., Jr., Cohen, I.R., Norins, L.C., Schroeter, A.L. and Reising, G. (1968). *Neisseria*
526 gonorrhoeae. II. Colonial variation and pathogenicity during 35 months in vitro. *J*
527 *Bacteriol***96**, 596-605.

528 Klee, S.R., Nassif, X., Kusecek, B., Merker, P., Beretti, J.L., Achtman, M. and Tinsley, C.R. (2000).
529 Molecular and biological analysis of eight genetic islands that distinguish *Neisseria*
530 meningitidis from the closely related pathogen *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun***68**,
531 2082-2095.

532 Lamb, R.F., Ozanne, B.W., Roy, C., McGarry, L., Stipp, C., Mangeat, P. and Jay, D.G. (1997). Essential
533 functions of ezrin in maintenance of cell shape and lamellipodial extension in normal and
534 transformed fibroblasts. *Curr Biol***7**, 682-688.

535 Lambotin, M., Hoffmann, I., Laran-Chich, M.P., Nassif, X., Couraud, P.O. and Bourdoulous, S.
536 (2005). Invasion of endothelial cells by *Neisseria meningitidis* requires cortactin
537 recruitment by a phosphoinositide-3-kinase/Rac1 signalling pathway triggered by the
538 lipo-oligosaccharide. *J Cell Sci***118**, 3805-3816.

539 Lecuyer, H., Nassif, X. and Coureuil, M. (2012). Two strikingly different signaling pathways are
540 induced by meningococcal type IV pili on endothelial and epithelial cells. *Infect*
541 *Immun***80**, 175-186.

542 Mairey, E., Genovesio, A., Donnadieu, E., Bernard, C., Jaubert, F., Pinard, E., *et al.* (2006). Cerebral
543 microcirculation shear stress levels determine *Neisseria meningitidis* attachment sites
544 along the blood-brain barrier. *J Exp Med***203**, 1939-1950.

545 Melican, K. and Dumenil, G. (2012). Vascular colonization by *Neisseria meningitidis*. *Curr Opin*
546 *Microbiol***15**, 50-56.

547 Melican, K., Michea Veloso, P., Martin, T., Bruneval, P. and Dumenil, G. (2013). Adhesion of
548 *Neisseria meningitidis* to dermal vessels leads to local vascular damage and purpura in a
549 humanized mouse model. *PLoS Pathog***9**, e1003139.

550 Merz, A.J., Enns, C.A. and So, M. (1999). Type IV pili of pathogenic *Neisseriae* elicit cortical plaque
551 formation in epithelial cells. *Mol Microbiol***32**, 1316-1332.

552 Merz, A.J., So, M. and Sheetz, M.P. (2000). Pilus retraction powers bacterial twitching motility.
553 *Nature***407**, 98-102.

554 Mikaty, G., Soyer, M., Mairey, E., Henry, N., Dyer, D., Forest, K.T., *et al.* (2009). Extracellular
555 bacterial pathogen induces host cell surface reorganization to resist shear stress. *PLoS*
556 *Pathog***5**, e1000314.

557 Molski, A. (2001). Statistics of the bleaching number and the bleaching time in single-molecule
558 fluorescence spectroscopy. *The Journal of Chemical Physics***114**, 1142-1147.

559 Nassif, X., Bourdoulous, S., Eugene, E. and Couraud, P.O. (2002). How do extracellular pathogens
560 cross the blood-brain barrier? *Trends Microbiol***10**, 227-232.

561 Nassif, X., Lowy, J., Stenberg, P., O'Gaora, P., Ganji, A. and So, M. (1993). Antigenic variation of
562 pilin regulates adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells. *Mol*
563 *Microbiol***8**, 719-725.

564 Pron, B., Taha, M.K., Rambaud, C., Fournet, J.C., Pattey, N., Monnet, J.P., *et al.* (1997). Interaction of
565 *Neisseria meningitidis* with the components of the blood-brain barrier correlates with an
566 increased expression of PilC. *J Infect Dis***176**, 1285-1292.

567 Pujol, C., Eugene, E., Marceau, M. and Nassif, X. (1999). The meningococcal PilT protein is
568 required for induction of intimate attachment to epithelial cells following pilus-mediated
569 adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A***96**, 4017-4022.

570 Ray, K., Bobard, A., Danckaert, A., Paz-Haftel, I., Clair, C., Ehsani, S., *et al.* (2010). Tracking the
571 dynamic interplay between bacterial and host factors during pathogen-induced vacuole
572 rupture in real time. *Cell Microbiol***12**, 545-556.

573 Romer, W., Berland, L., Chambon, V., Gaus, K., Windschiegl, B., Tenza, D., *et al.* (2007). Shiga toxin
574 induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature***450**, 670-675.

575 Rusniok, C., Vallenet, D., Floquet, S., Ewles, H., Mouze-Soulama, C., Brown, D., *et al.* (2009).
576 NeMeSys: a biological resource for narrowing the gap between sequence and function in
577 the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Genome biology***10**, R110.

578 Schneider, C.A., Rasband, W.S. and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image
579 analysis. *Nat Meth***9**, 671-675.

580 Sokolova, O., Heppel, N., Jagerhuber, R., Kim, K.S., Frosch, M., Eigenthaler, M. and Schubert-
581 Unkmeir, A. (2004). Interaction of *Neisseria meningitidis* with human brain
582 microvascular endothelial cells: role of MAP- and tyrosine kinases in invasion and
583 inflammatory cytokine release. *Cell Microbiol***6**, 1153-1166.

584 Solomon, J.M., Leung, G.S. and Isberg, R.R. (2003). Intracellular replication of *Mycobacterium*
585 *marinum* within *Dictyostelium discoideum*: efficient replication in the absence of host
586 coronin. *Infect Immun***71**, 3578-3586.

587 Stephens, D.S., Hoffman, L.H. and McGee, Z.A. (1983). Interaction of *Neisseria meningitidis* with
588 human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. *J*
589 *Infect Dis***148**, 369-376.

590 Subach, O.M., Cranfill, P.J., Davidson, M.W. and Verkhusha, V.V. (2011). An enhanced monomeric
591 blue fluorescent protein with the high chemical stability of the chromophore. *PLoS One***6**,
592 e28674.

593 Taylor, M.J., Perrais, D. and Merrifield, C.J. (2011). A high precision survey of the molecular
594 dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol***9**, e1000604.

595 van Deuren, M., Brandtzaeg, P. and van der Meer, J.W. (2000). Update on meningococcal disease
596 with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev***13**, 144-166,
597 table of contents.

598

599

600

601 **Figure legends**

602 **Figure 1, Quantitative assessment of host cell protein accumulation under adhering *N.***
603 ***meningitidis* aggregates.** (A) Endothelial cells expressing ezrin-GFP (middle panels) were
604 infected with mCherry-expressing meningococcus aggregates (top panels). Bottom panels show
605 the merged images. Scale bars represent 20 μm . Region of interest 1 (ROI-1) was selected for
606 being a site of contact of an aggregate and ROI-2 arbitrarily chosen as a “background” area in a
607 similar area of the same cell. (B) The raw fluorescence intensity in the volume defined by the
608 two ROIs was plotted as a function of time. The time of contact of the bacterial aggregate with
609 the endothelial cell, t_{inj} , is determined automatically by the *Intensity profiler* plug-in. (C) The net
610 fluorescent intensity inside ROI-1 was calculated by correcting the raw intensity from bleaching,
611 thermal fluctuations and background as determined from ROI-2. (D) The ratio of the

612 fluorescence intensity at the different times points relative to the intensity at t_{ini} (fold induction)
613 was plotted as a function of time. (E) The ratio of fluorescence of 10 representative adhesion
614 events were plotted and the average of 28 events represented (red line).

615 **Figure 2, Bacterial factors involved in bacteria-induced plasma membrane remodeling.**

616 Endothelial cells transfected with ezrin-GFP were infected with aggregates formed by the *pilV*
617 and *pilT* deficient strains ($\Delta pilV$, $\Delta pilT$). (A) Snapshot from a *pilV* infected cell. (B) Snapshots
618 from two adhesion events with the *pilT* strain representing the two types of behaviors. (C)
619 Kinetics of ezrin accumulation in the $\Delta pilV$ (green curve) and $\Delta pilT$ (red curve) strains. (D) The
620 time at which ezrin accumulation is detectable was plotted as a function of time within intervals
621 of 5 minutes. Each dot corresponds to a single adhesion event. Stars indicate significance using a
622 Student t-test. Error bars are \pm SEM. Scale bars represent 20 μ m.

623

624 **Figure 3, Kinetics of accumulation of cellular components under bacterial aggregates.** (A)

625 Endothelial cells were transfected with fluorescent markers for ezrin (ezrin-GFP), plasma
626 membrane (Farnesyl-GFP), actin cytoskeleton (LifeAct-mCherry) or cytoplasm (GFP) and
627 infected for 10 minutes with preformed aggregates. Scale bars represent 20 μ m. (B) The ratio of
628 fluorescence intensity was determined and averaged for 25-30 events of aggregates contacting
629 endothelial cells transfected with the four fusion proteins. The dotted line represents time of
630 contact (t_{ini}). Errors bars indicate SEM. (C) Each average curve was normalized between 0 (t_{ini})
631 and 1 (t_{max}) and fitted to an exponential curve. Times corresponding to a 50% increase are
632 indicated in the table ($t_{1/2}$) in seconds. (D) Endothelial cells were co-transfected with constructs
633 allowing expression of Farnesyl-GFP and LifeAct-mCherry and infected with bacteria expressing
634 a blue fluorescent protein. Time at which accumulation of the two fusion-proteins is first
635 detected (starting time) was plotted for individual adhesion events (n=8). The line
636 corresponding to the average appears in red. (E) Endothelial cells were co-transfected with

637 constructs allowing expression of LifeAct-mCherry and unmodified GFP, infected and analyzed
638 as in E. Stars indicate significance according to a paired Student t-test.

639

640 **Figure 4, Membrane remodeling and ezrin accumulation do not require an active actin**
641 **cytoskeleton.** (A) Endothelial cells transfected with ezrin-GFP (top panels) or Farnesyl-GFP
642 (bottom panels) were treated with the actin-disrupting agent cytochalasin D (1 μ M) and infected
643 for a period of 10 minutes. Scale bars represent 20 μ m. (B) Ratio of fluorescence intensity for
644 ezrin-GFP. The red line corresponds to samples treated with cytochalasin D (n=20) while the
645 black line the untreated controls (n=28). (C) Ratio of fluorescence intensity for Farnesyl-GFP.
646 The red line corresponds to samples treated with cytochalasin D (n=20) while the black line the
647 untreated controls (n=28). Errors bars are \pm SEM.

648

649 **Figure 5, Cholesterol depletion from the plasma membrane blocks the initiation of**
650 **meningococcus-induced cellular response.** Endothelial cells transfected with ezrin-GFP,
651 LifeAct-mCherry and Farnesyl-GFP were treated with the cholesterol-depleting drug Methyl- β -
652 cyclodextrin (M β CD) and infected with pre-formed aggregates. (A) Snapshots after 10 minutes
653 of infections show ezrin (left), LifeAct (middle) and farnesyl (right) fusion proteins. Scale bars
654 represent 20 μ m. Kinetics of accumulation of the fusion proteins was determined (B, C and D).
655 Red curves represent the M β CD treated samples. (B) Ezrin-GFP. (C) LifeAct-mCherry. (D)
656 Farnesyl-GFP.

657

658 **Figure 6, Relationship between membrane remodeling and intracellular signaling**
659 **cascades.** Endothelial cells were transfected with ezrin-GFP (A and D), LifeAct-mCherry (B and
660 E), Farnesyl-GFP (C and F), and infected with pre-formed aggregates. Curves corresponding to

661 the ratio of fluorescence in cells pretreated with the β 2AR agonist isoproterenol (A, B and C) or
662 ATP-depletion medium (D, E and F) appear in red.

663

664 **Figure 7**, Schematic representation of the sequence of events triggered by the contact of
665 meningococcus with endothelial cells.

666

667 **Supplementary figures**

668 **Movie S1, Meningococcus growth as a microcolony is accompanied by ezrin accumulation.**

669 Ezrin-GFP transfected cells were infected by individual mCherry-expressing meningococci.
670 Following initial adhesion (white arrows), behavior of ezrin underneath the nascent
671 microcolony was monitored over a 4-hours period. As the microcolony reached a size of about
672 10 diplococci (30 minutes), ezrin started to accumulate and the cortical plaque size increased
673 with the size of the microcolony. The scale bar corresponds to 20 μ m.

674 **Movie S2, Ezrin accumulation underneath pre-formed meningococcus aggregates.**

675 Ezrin-GFP transfected cells (middle panel) were infected with pre-formed mCherry-expressing
676 meningococcus aggregates (left panel). Ezrin accumulation was monitored over 10 minutes and
677 started immediately after contact of the aggregate with the cell. Right panel shows the merged
678 images. Scale bar corresponds to 20 μ m.

679

680 **Movie S3, Delayed plasma membrane remodeling by the $\Delta pilT$ strain.**

681 Endothelial cells were transfected with ezrin-GFP and infected with the $\Delta pilT$ strain for a period of 4 hours. The arrow
682 points to a bacterial aggregate that triggers a detectable response only after 1 hour and 15
683 minutes. Bacteria (left), ezrin-GFP (middle) and merge (right) are shown on the movie. Scale bar
684 corresponds to 20 μ m.

685

686 **Movie S4, Treatment of endothelial cells with cytochalasin D leads to disruption of actin**
 687 **cytoskeleton.** Endothelial cells were co-transfected with LifeAct-mCherry, allowing direct
 688 visualization of the actin cytoskeleton, and with ezrin-GFP. Actin cytoskeleton behavior
 689 following cytochalasin D treatment was monitored over 20 minutes. Soon after drug addition,
 690 actin fibers started to depolymerize and led to a punctuate labeling of actin throughout the cell.
 691 Scale bar corresponds to 20 μ m.

692

693 **Table, primers use to generate plasmid constructs.**

<i>Name</i>	<i>Sequence*</i>	<i>Enzyme</i>
GFPF	TTAATTAATTTAAGAAGGAGATATACATATGAGTAAAG	PacI
GFPR	GTCGACTTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTG	Sall
PrPileF	AGTACTCCATGCCAATAGAGATACCCCACG	ScaI
PrPileR	TTAATTTAAAATTGGAAAGGAAATGCCTCAAGC	PacI
RecCF	GAG CTC GGA CGA ATT TAT CCG CTT CTG G	SacI
RecCR	CCG CGG CCC ACA TTC TAT CCC GCA CC	SacII
mrtFF	CTC GAG GCA TGC GTT TAA ACG CAG CGG AAA AAA AGG AAG AGG	XhoI
mrtFR	GGT ACC CAT TCG ACA TTC CAA TGA AAT CAC G	KpnI
mCherryF	TTAATTTAAAGGAGTAATTTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATG	PacI
mCherryR	GTCGACCCTCTACAAATGTGGTATGGCTG	XhoI
BFPF	TTAATTTAAAGGAGTAATTTTATGAGCGAGCTGATTAAGGAG	PacI
BFPR	CTCGAGTCAATTAAGCTTGTGCCCCAG	XhoI

694 *Sequences highlighted in bold represent restriction sites

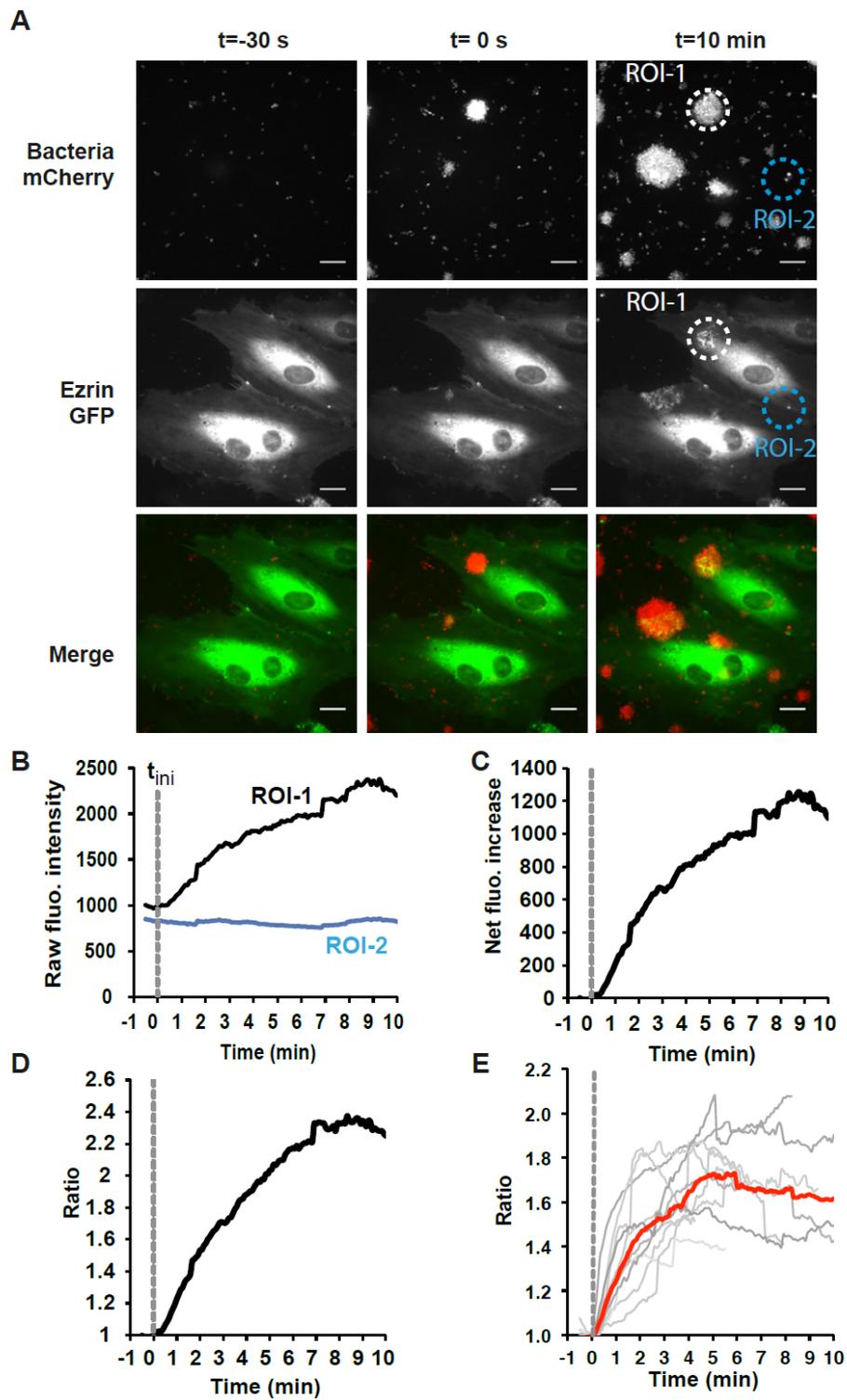


Figure 1

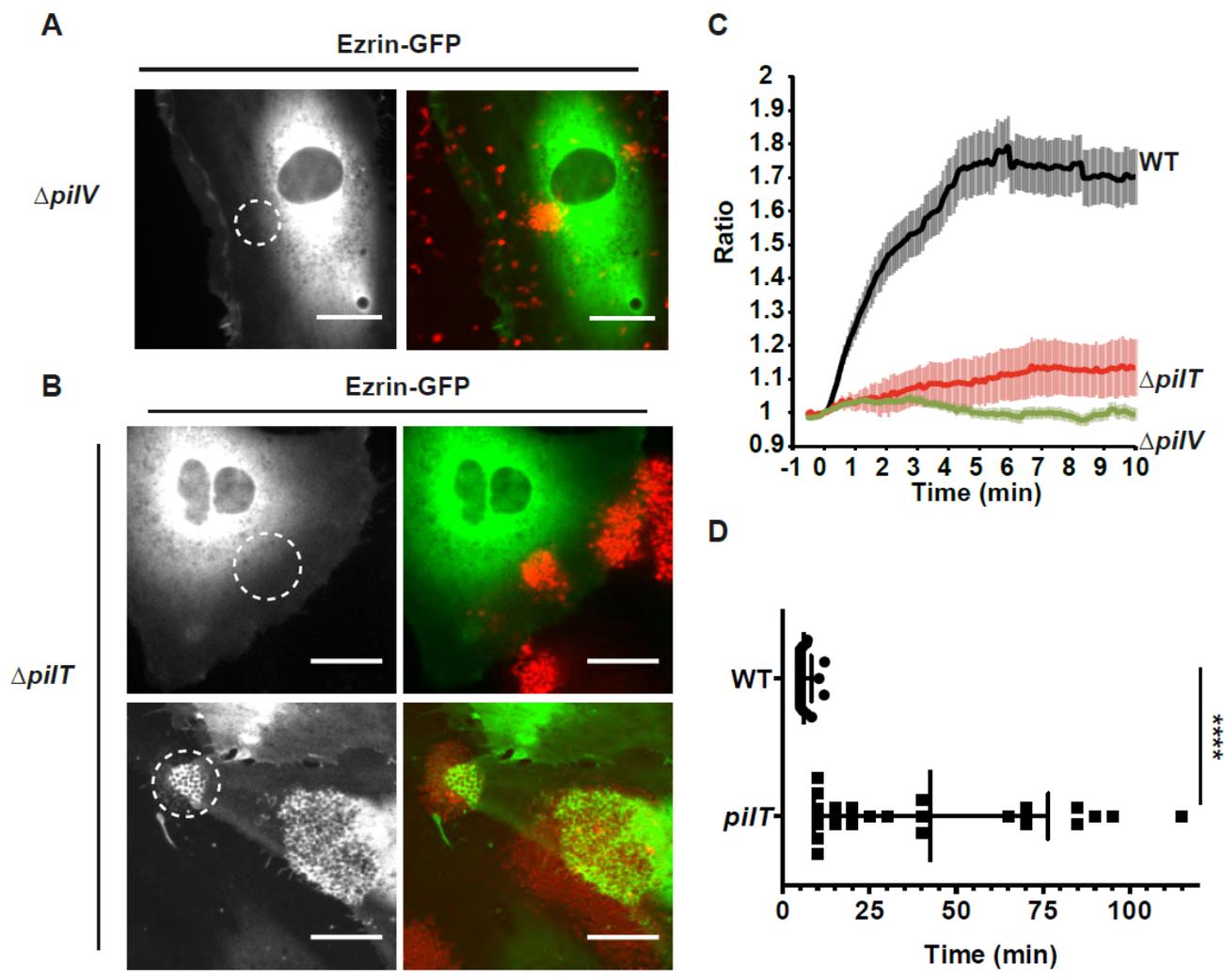


Figure 2

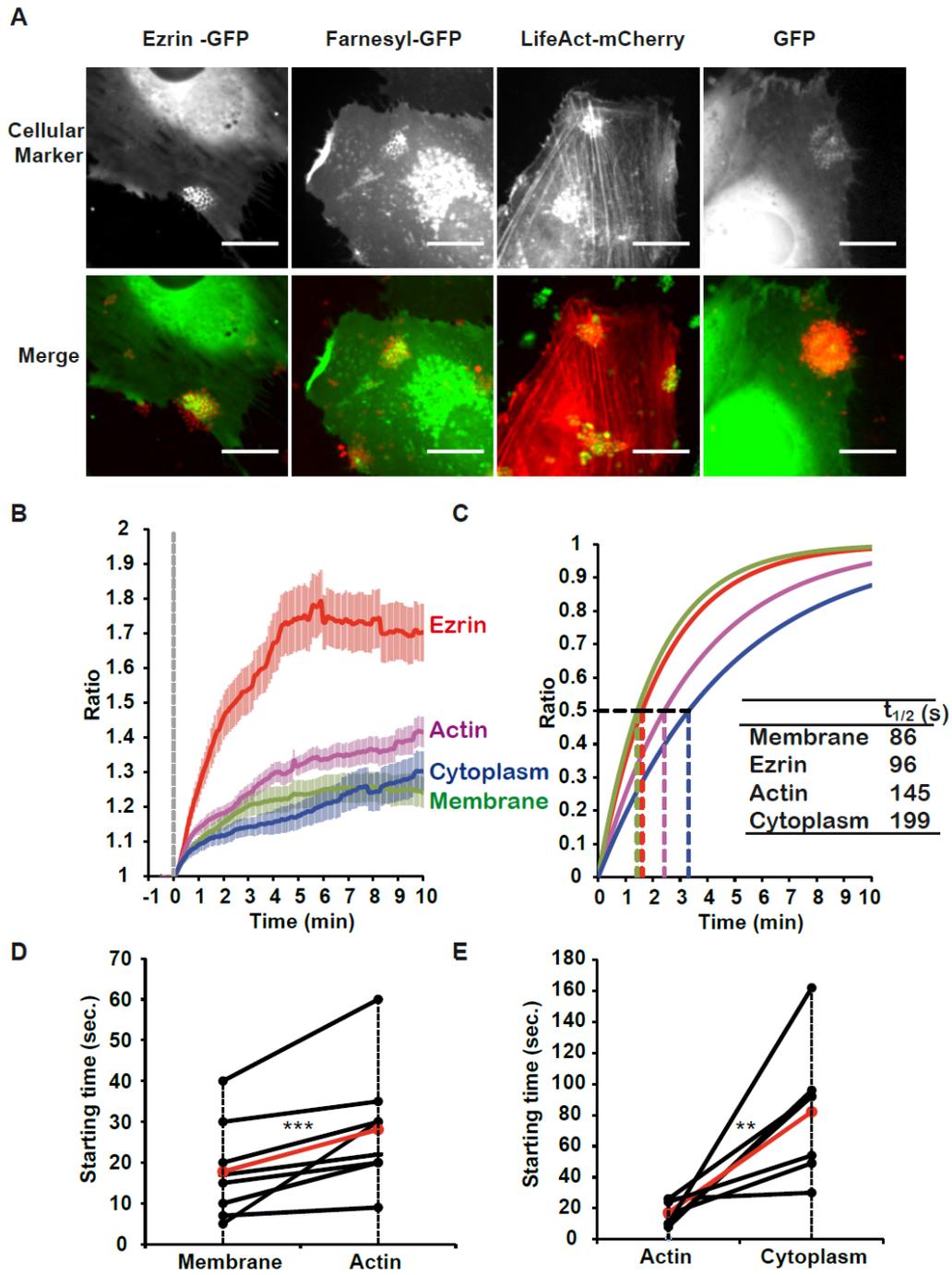


Figure 3

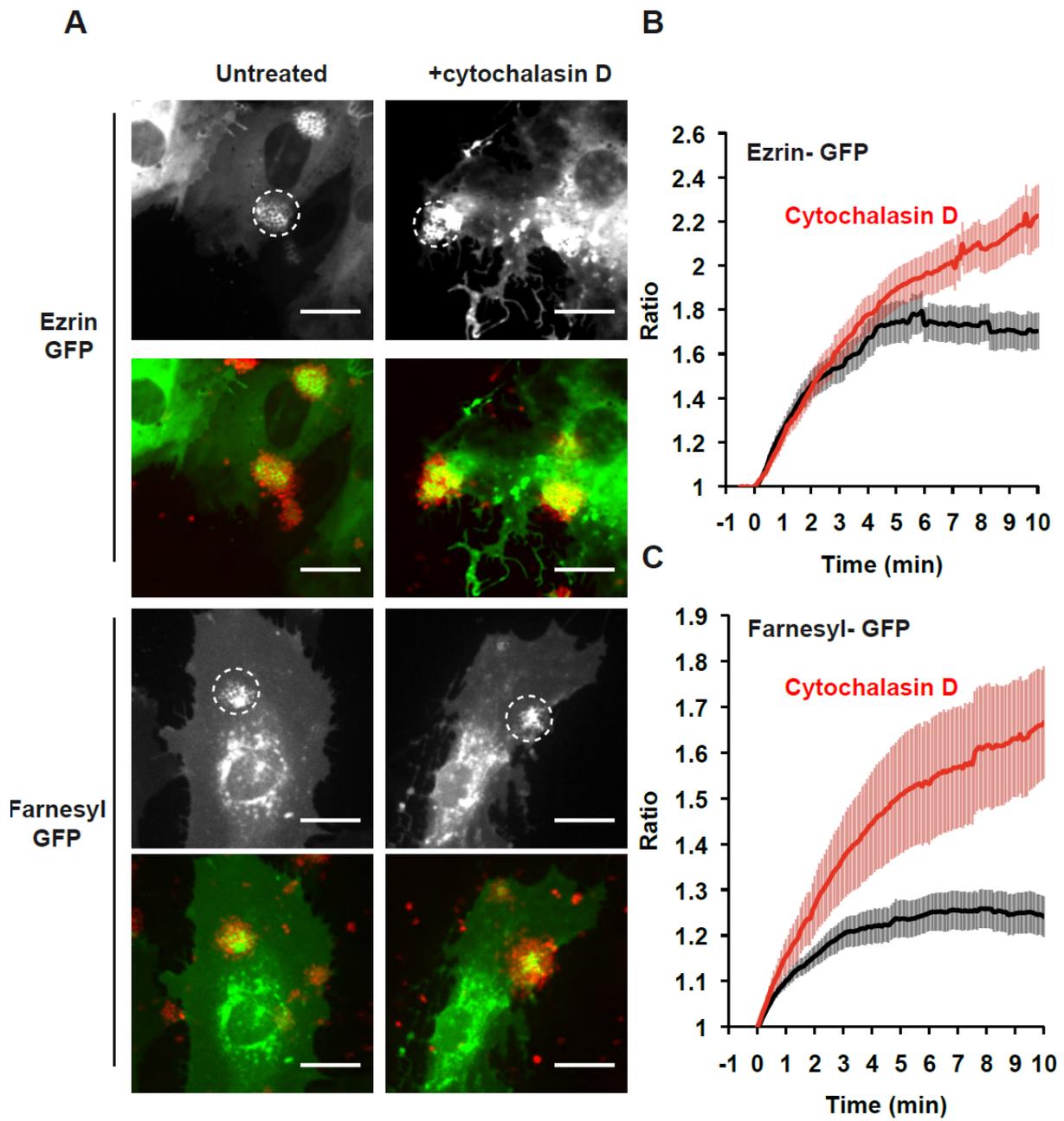


Figure 4

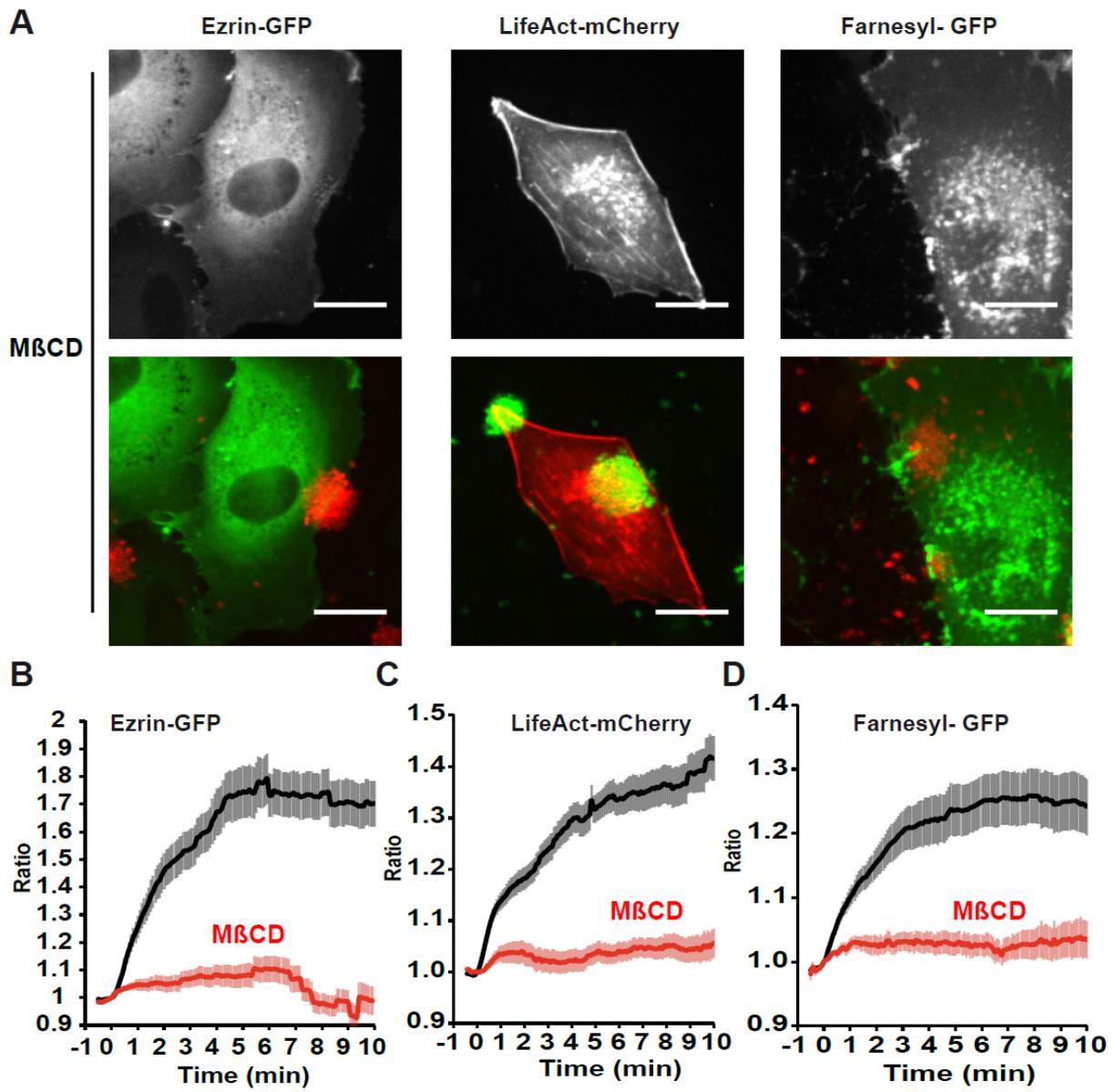


Figure 5

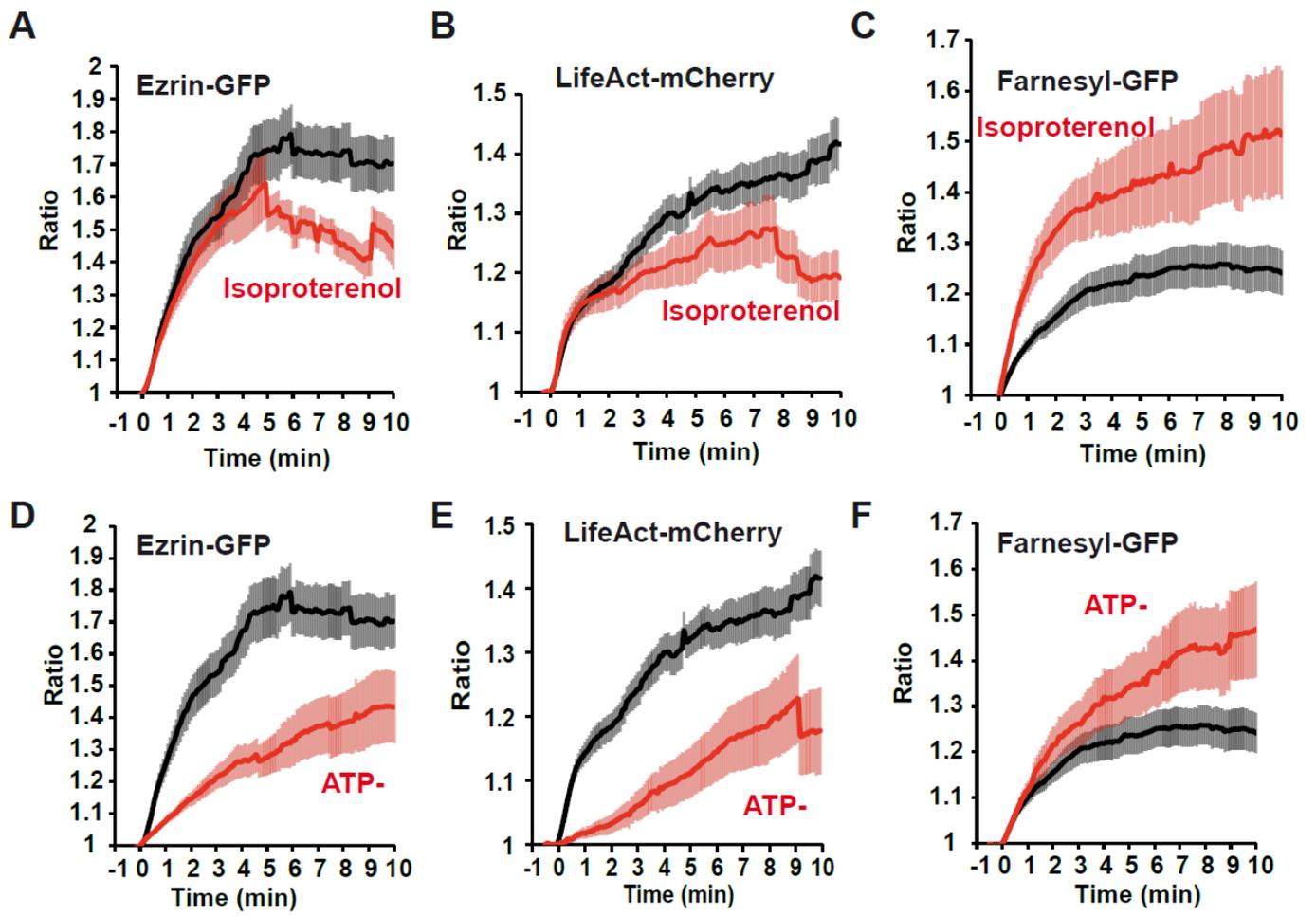


Figure 6

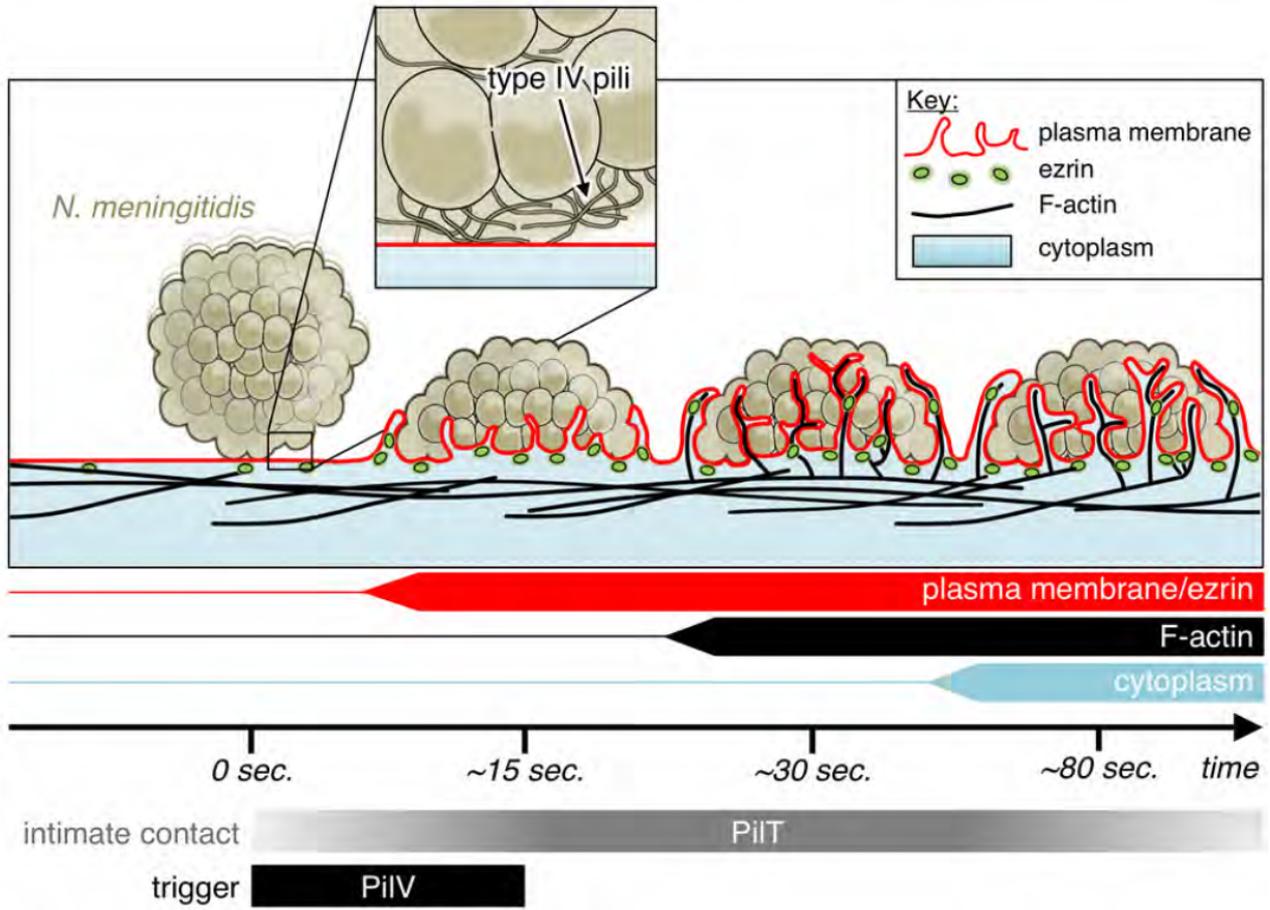


Figure 7

DISCUSSION

Au cours de cette thèse, nous nous sommes attachés à déterminer comment les PT4 pouvaient exercer tant de fonctions différentes telles que l'adhésion, l'agrégation et l'induction de voies de signalisation de la cellule hôte, qui sont toutes trois requises pour la colonisation efficace de l'hôte par *Neisseria meningitidis*. L'étude des pilines mineures PilV et PilX est particulièrement intéressante puisque les souches mutées pour ces protéines perdent certaines de ces fonctions alors qu'elles produisent toujours des pili à leur surface. En effet, la piline mineure PilV est requise pour l'induction des voies de signalisation de la cellule hôte alors que la piline mineure PilX est essentielle pour l'adhésion des bactéries sur les cellules épithéliales et endothéliales, la formation d'agrégats bactériens et le déclenchement des voies de signalisation. Bien que la fonction des pilines mineures a été déterminée, leur mode d'action n'est toujours pas élucidé.

Localisation et rôle périplasmique des pilines mineures PilX et PilV

Au vue des similarités avec la piline majeure, il a été proposé que ces pilines s'assemblent dans la fibre des PT4 de la même manière que PilE mais en quantité restreinte du fait de leur faible taux d'expression. Les pilines mineures ainsi présentes à la surface des bactéries pourraient exercer un rôle direct sur les cellules ou sur les autres bactéries.

Malgré la sensibilité des techniques de microscopie utilisées, nous n'avons pas pu visualiser les pilines mineures au sein des fibres des PT4. Cependant nous avons montré que la majorité des pilines mineures PilV et PilX est localisée dans le périplasme et que seule une proportion très faible de ces pilines est retrouvée dans la fraction des pili. Nous avons par la suite montré que les pilines mineures exercent leur fonction depuis le périplasme, puisque les pilines mineures fusionnées avec la protéine fluorescente mCherry en C-Terminal sont toujours fonctionnelles. Cette technique avait déjà été utilisée pour visualiser la pseudopiline majeure PulG du SST2 dans la membrane interne, puisque cette protéine fluorescente peut être correctement repliée dans le périplasme (Francetic et al., 2007) (Lewenza et al., 2006). Dans notre étude, nous avons tiré partie de ces protéines de fusions afin de visualiser les pilines mineures dans le périplasme et de bloquer leur passage éventuel à travers le pore PilQ. Cependant, nous avons montré dans *l'Introduction* que le passage du pilus au travers du pore PilQ nécessite une ouverture de la sécrétine puisqu'elle n'est pas assez large sur toute sa hauteur (entre 30 et 100 Å) pour permettre l'extrusion du pilus de 60Å (Collins et al., 2005). De plus, la protéine mCherry de 32 kDa présente une structure en tonneau β d'une largeur de 3Å sur une hauteur de 4Å (Day & Davidson, 2009). Par conséquent, l'ajout d'une protéine mCherry pourra

augmenter au mieux de 15% la largeur du pilus, pour atteindre une valeur de 68 Å de diamètre. Nous pouvons donc nous demander dans quelle mesure les fusions mCherry pourraient générer suffisamment de gêne stérique pour bloquer le passage des pilines à travers le pore. Pour nous assurer que les pilines sont effectivement bloquées dans le périplasma à l'issue de la fusion mCherry, nous avons montré que la souche exprimant une piline PilE-mCherry n'est pas piliée. Cependant, l'hypothèse selon laquelle les pilines mineures sont incorporées dans la fibre des PT4 présume d'une faible quantité de pilines insérées. Pour nous approcher d'une telle situation, nous avons testé l'effet de l'expression de la piline PilE-mCherry dans une souche parentale. Celle-ci a un effet dominant négatif sur l'expression des pili indiquant que peu de protéines PilE-mCherry sont suffisantes pour bloquer le passage de la fibre. Or les pilines mineures fusionnées à la mCherry n'ont pas d'effet sur la piliation et sont encore fonctionnelles, suggérant que les pilines mineures agissent depuis le périplasma des bactéries.

L'ensemble de ces résultats a permis de démontrer un rôle périplasmique des pilines mineures, néanmoins ils ne permettent pas d'exclure le fait que les pilines mineures soient parfois présentes le long des PT4, comme ceci a été observé par microscopie électronique pour la piline mineure PilX (Helaine et al., 2007). Toutefois, étant fonctionnelles lorsqu'elles sont bloquées dans le périplasma, il semble peu probable qu'elles exercent leur fonction une fois à l'extérieur de la bactérie, ce qui remet en cause l'hypothèse actuelle sur le mode d'action des pilines mineures. En effet, nos résultats ne sont pas en accord avec le modèle d'action de PilX selon lequel l'agrégation est permise par l'interaction entre deux pilines PilX toutes deux présentes dans la fibre des PT4 (Helaine et al., 2007). De plus, il remet en cause l'activité directe de PilV sur l'activation du récepteur β 2-adrénérique comme étant le seul rôle de PilV dans l'interaction des bactéries avec les cellules de l'hôte (Coureuil et al., 2010).

Si nos résultats remettent en cause certains des modèles proposés auparavant, d'autres travaux sont en faveur d'un mécanisme indirect des pilines mineures sur les fonctions des PT4. En effet, la piline PilX ne semble pas exercer de rôle direct dans le déclenchement des voies de signalisation, puisque la présentation de la piline PilX par des staphylocoques n'est pas suffisante pour induire le recrutement des composants cellulaires. Il semblerait plutôt que la piline PilX soit associée à un changement conformationnel de la structure quaternaire des PT4 nécessaire pour le déclenchement des voies de signalisation (Brissac et al., 2012). Ce changement de conformation des PT4, dû à un étirement des fibres, pourrait expliquer le défaut de cette souche pour la formation de la plaque corticale (Biais et al., 2010) (Brissac et al., 2012). Un autre argument en faveur d'un rôle périplasmique des pilines mineures repose sur le fait que l'ajout de différents anticorps dirigé contre des peptides de la piline mineure PilX ou PilV

n'affecte que très peu les phénotypes d'agrégation ou d'adhésion, alors que l'ajout d'un anticorps monoclonal dirigé contre la piline majeure PilE semble inhiber l'adhésion et la formation des projections membranaires (Cehovin et al., 2011), données non illustrées). De plus, ces anticorps dirigés contre les pilines mineures n'ont d'ailleurs prouvé aucun effet bactéricide sur les bactéries, suggérant l'absence de l'exposition de ces protéines (Cehovin et al., 2011).

Mode d'action des pilines mineures PilV et PilX

Rôle des pilines mineures sur la biogenèse des pili

Nous avons montré que les mutants *pilV* et *pilX* présentent respectivement une piliation de 61% et 27%. Ces défauts ne sont pas seulement restaurés par la complémentation de leur copie sauvage, puisque la surexpression des pilines mineures augmente même fortement la piliation. Les pilines mineures sont donc des protéines qui favorisent la piliation. Nous avons également montré la quasi-absence de pili dans un double mutant *pilV/pilX*. Il semble donc que ces protéines aient un rôle indispensable dans la formation ou la stabilité des PT4 et que le terme « accessoires » très souvent employé pour les désigner soit donc inadéquat.

Nous avons également montré que les pilines mineures PilV et PilX n'ont pas de fonctions redondantes, puisqu' aucune complémentation n'est observée au niveau de la piliation dans une souche *pilV/pilX_i* ou *pilX/pilV_i*. Si l'on considère de plus près le niveau de piliation des souches *pilV* et *pilX*, nous pouvons supposer que la piline mineure PilX est responsable de la biogenèse de 73% des pili et la piline PilV de 39%. Le total approchant des 100%, il est possible que les pilines mineures agissent indépendamment l'une de l'autre par deux voies parallèles. Or le fait qu'aucune complémentation ne soit observée entre PilX et PilV indique que ces protéines agissent plutôt sur deux étapes successives d'une même voie. En effet, les souches complémentées *pilX/pilX_i* et *pilV/pilV_i* présentent respectivement une piliation accrue d'un facteur 2,5 et 1,5 par rapport à la souche parentale.

Une autre hypothèse pourrait être la formation d'un complexe entre les pilines mineures PilV et PilX pour permettre la biogenèse des pili. Cependant la présence d'un tel complexe ne rend pas compte du niveau de piliation des souches *pilV* et *pilX* qui ne sont pas du même ordre. Un tel modèle n'est donc possible que s'il existe un troisième partenaire qui pourrait former un dimère soit avec PilV soit avec PilX pour permettre la formation des pili. Dans cette situation, ce

troisième partenaire aurait une affinité plus grande pour PilX, ce qui expliquerait pourquoi l'absence de PilV entraîne moins de défauts de piliation que l'absence de la piline mineure PilX.

Rôle dans l'initiation des pili : similarités avec les pseudopilines PilH, PilI, PilJ et PilK

Les pilines mineures PilV et PilX sont nécessaires pour une piliation complète mais elles ne sont pas indispensables en absence de rétraction. Alors qu'un mutant *pilT* est 7 fois plus pilié qu'une souche parentale, les souches *pilV/pilT* et *pilX/pilT* présentent 5.5 fois plus de pili et la souche *pilV/pilX/pilT* présente elle 3 fois plus de pili que la souche parentale. Ces résultats sont similaires aux résultats obtenus pour les pseudopilines PilH, PilI, PilJ et PilK (Carbonnelle et al., 2006). En effet, les pseudopilines favorisent l'initiation des PT4 mais elles ne sont pas indispensables à la piliation car les doubles mutants *pil/pilT* sont piliés. Il est donc possible que les pilines mineures PilV et PilX jouent ensemble un rôle similaire sur l'initiation des PT4 ou participent à l'initiation permise par les pseudopilines. En effet, les pseudopilines et les pilines mineures sont les seuls groupes des protéines *pil* partageant les caractéristiques des pilines de type IV et pourraient donc agir toutes ensemble pour initier l'assemblage des pili. Cependant, une différence existe puisque l'absence d'une seule pseudopiline est suffisante pour abolir la piliation alors que l'absence des deux pilines mineures PilV et PilX est nécessaire pour perdre l'expression des pili (Carbonnelle et al., 2006). Cependant, ceci n'est pas exactement observé dans le cas du SST2 dans lequel l'absence de GspH n'abolit ni l'expression des pseudopili ni la sécrétion (Cisneros et al., 2012a). Il serait alors intéressant de quantifier la piliation des doubles mutants *pilH/pilT*, *pilI/pilT*, *pilJ/pilT* et *pilK/pilT* pour ensuite comparer ces valeurs avec celles obtenues pour les souches *pilX/pilT*, *pilV/pilT* et *pilX/pilV/pilT*. De plus, il serait intéressant de pouvoir tester l'effet de l'absence des pilines mineures PilV et PilX et des pseudopilines sur la piliation en absence de rétraction.

Rôle dans l'équilibre assemblage-rétraction

Outre l'initiation des PT4, les pilines mineures pourraient exercer leur rôle sur la stabilité des PT4 en empêchant par exemple la rétraction des fibres et en les maintenant à la surface des bactéries. En effet, les souches *pilX/pilT* et *pilV/pilT* présentent une piliation proche de la souche *pilT*. Cependant, il est tout de même important d'observer que l'absence de rétraction par la mutation *pilT* ne restaure pas totalement le défaut de la souche *pilX/pilV* puisque le triple mutant *pilX/pilV/pilT* est deux fois moins pilié que la souche *pilT*. Il est possible que les pilines mineures empêchent la rétraction dépendante d'un autre moteur moléculaire. En effet, le gène *pilT* possède deux gènes homologues dans le génome de *Neisseria*, *pilU* et *pilT2*. A

l'heure actuelle peu d'éléments sont connus sur ces protéines et leur activité ATPase n'a pas encore été démontrée. Cependant chez *Pseudomonas*, *pilU* est capable de rétracter certains pili (Whitchurch & Mattick, 1994). L'étude de ces protéines PilU et PilT2 pourrait apporter des éléments de réponse sur le mécanisme d'action des pilines mineures. Il serait alors intéressant de tester la quantité de pili présents dans un double mutant *pilV/pilU* et *pilX/pilU* ou *pilV/pilT2* et *pilX/pilT2*.

Relation entre piliation et fonction

*Le défaut de piliation des mutants *pilV* et *pilX* expliquent leurs phénotypes*

Sachant dorénavant que les pilines mineures PilV et PilX sont nécessaires à la biogenèse des pili, nous nous sommes interrogés quant à l'effet de cette perte de piliation sur les fonctions des PT4, afin de vérifier si ce défaut quantitatif pouvait rendre compte des phénotypes des mutants *pilV* et *pilX*. A cette fin nous avons testé l'effet de la quantité de pili sur les fonctions d'adhésion, d'agrégation et du déclenchement des voies de signalisation de la cellule hôte en utilisant une souche *pilF/pilF_i* pouvant exprimer différentes quantités de pili à leur surface. En utilisant différentes concentrations d'IPTG, nous pouvons modifier la quantité de pili synthétisés et tester l'ensemble des phénotypes dépendants des pilines mineures PilV et PilX. Nous avons remarqué que toutes les fonctions associées aux PT4 requièrent de fortes densités de pili exprimés en surface des bactéries. Les fonctions d'agrégation et d'adhésion nécessitent une quantité de pili supérieure à 40%. En dessous de cette valeur seuil, les bactéries sont incapables d'agréger ou d'adhérer, ce qui permet d'expliquer la perte d'adhésion et d'agrégation d'un mutant *pilX*. Entre 40% et 100% la capacité des bactéries à agréger ou à adhérer augmente progressivement jusqu'à atteindre les valeurs de la souche parentale. En ce qui concerne le déclenchement des voies de signalisation, il semble qu'une quantité plus importante de pili soit requise puisque aucun recrutement d'ezrine n'est observé en dessous de 60% de pili. La piliation d'un mutant *pilV* n'est donc pas suffisante pour induire la réponse cellulaire. Cependant entre 70% et 100% de pili, la capacité de bactéries à induire la déformation de la membrane plasmique augmente rapidement. L'ensemble de ces résultats montre que les défauts phénotypiques observés pour les mutants *pilV* et *pilX* peuvent s'expliquer tout simplement par leur défaut de piliation.

Le fait que toutes les fonctions des PT4 s'expliquent par la quantité de pili à la surface des bactéries est cohérent avec de nombreux résultats obtenus auparavant. Ce résultat permet en effet d'expliquer pourquoi un mutant *pilX/pilT* est hyperagrégatif et pourquoi les mutants

pilX/pilT et *pilV/pilT* sont capables de déclencher une réponse cellulaire (Helaine et al., 2005 ; Brissac et al., 2012, données du laboratoire réalisées par G. Mikaty). En effet, même en absence de PilX ou de PilV, l'absence de rétraction et donc l'augmentation de la piliation suffisent pour restaurer les fonctions de ces mutants. Ceci renforce notre modèle d'une action indirecte des pilines mineures sur les fonctions des PT4. Cependant, si les doubles mutants sont capables d'induire la déformation de la membrane plasmique, ce n'est pas le cas pour le triple mutant *pilX/pilV/pilT* malgré une piliation trois fois plus importante qu'une souche parentale (données du laboratoire, réalisées par G. Mikaty). Ce résultat est difficile à comprendre puisque nous avons précédemment montré que le déclenchement des voies de signalisation requiert une quantité de pili supérieure à 60%. Une explication éventuelle nécessite que le seuil de piliation requis pour induire le déclenchement de la réponse cellulaire soit plus élevé en absence de rétraction, très certainement afin de compenser la perte de la dynamique des pili. L'étude phénotypique d'une souche *pilT/pilF/pilF_i* pourrait permettre de déterminer le seuil de piliation requis pour induire les fonctions associées aux PT4 en absence de rétraction.

Impact de la quantité de pili sur les fonctions des PT4

Outre le fait que ces résultats expliquent pourquoi le mutants *pilV* et *pilX* présentent certains défauts phénotypiques et pas d'autres, il est intéressant d'observer qu'il existe une quantité seuil de pili pour permettre ces fonctions. Dans la mesure où les bactéries présentent de nombreux pili à leur surface, il reste difficile de comprendre pourquoi 27% de pili ne sont pas suffisants pour induire l'agrégation ou l'adhésion et pourquoi 60% de pili sont suffisants pour adhérer sur les cellules mais ne permettent pas d'induire la déformation de la membrane plasmique. De plus, il est très surprenant de voir à quel point des modifications subtiles dans la quantité de pili peuvent autant influencer les fonctions associés aux PT4. En particulier, le déclenchement de la réponse cellulaire requiert une quantité de pili comprise entre 70 et 100%. Dans cette petite fenêtre de piliation, la fréquence de recrutement varie de façon importante entre 10 et 95%.

Pour comprendre les mécanismes des fonctions associés aux PT4, nous allons considérer que pour chaque pilus, il existe plusieurs sites placés tout au long de la fibre qui sont capables d'interagir soit avec un autre pilus soit avec la cellule. En effet, en ce qui concerne l'agrégation, l'observation en microscopie électronique montre que les pili sont en étroite association tout le long des fibres lors d'interaction à l'intérieur des faisceaux de pili et entre les pili anti-parallèles provenant de différentes bactéries. De plus, il semble peu probable que les pili interagissent avec les cellules uniquement grâce l'apex du pilus, comme cela a été proposé pour l'adhésion de *P.*

aeruginosa. Chez *P. aeruginosa*, il a été montré que la région D de la piline majeure PilA permet l'adhésion des bactéries aux récepteurs glycolipidiques Asialo GM-1 et GM-2 (Hazes et al., 2000). Du fait de l'empilement de la piline PilA dans la fibre des PT4, la région D de la piline ne serait accessible qu'à l'extrémité distale du pilus, suggérant en effet que l'adhésion n'est permise qu'au niveau de l'apex (Lee et al., 1994). Cependant, ce modèle considère que la structure de la fibre est figée dans un seul état et ne tient pas compte de la flexibilité des pili. Or les pili sont des structures dynamiques subissant des forces externes importantes et sont capables d'être étirés ce qui modifie leur structure quaternaire (Biais et al., 2010) (Brissac et al., 2012). De plus le fait que les pili adhèrent au niveau de leur extrémité présume que la taille de la fibre n'influence pas l'adhésion des bactéries. Or, il a été montré que certaines mutations dans la piline majeure Pile de *N. meningitidis* entraînent la formation de pili très courts qui permettent la compétence mais pas l'adhésion des bactéries sur les cellules hôtes (Aas et al., 2007). Si la taille des pili influence l'adhésivité des bactéries, alors l'adhésion serait favorisée par des interactions s'effectuant tout le long de la fibre.

Pourtant s'il existe des milliers de sites sur chaque fibre, comment pouvons nous expliquer qu'il faut une quantité de pili élevée pour induire l'ensemble des fonctions des PT4 ? De tels résultats peuvent refléter un comportement coopératif dans l'interaction des pili entre eux ou avec les cellules de l'hôte. Dans ce cas, la probabilité de contact entre deux pili ou entre un pili et la cellule hôte est faible, mais lorsque celui-ci se produit, il pourrait favoriser d'autres interactions par un effet homotrope positif et permettrait alors l'agrégation ou l'adhésion et le déclenchement de la réponse cellulaire. En effet, il est très probable que ces interactions créent un changement conformationnel de la fibre plus favorable à l'établissement de contacts. Un tel mécanisme correspond donc un comportement allostérique des PT4 dans lequel les pili se trouvent dans deux conformations possibles, une dite « fermée » qui ne permet pas les interactions et une dite « ouverte » propice aux contacts entre les pili ou avec les cellules. L'établissement des premiers contacts est alors peu fréquent, mais déclenche un changement conformationnel des fibres vers la forme dite « ouverte » augmentant la probabilité de la formation de ces contacts. Il a effectivement été montré que les pili pouvaient présenter différentes conformations correspondant à l'état d'étirement des fibres (Biais et al., 2010). Il est possible qu'une forte quantité de pili contribue à étirer les fibres, permettant de déplacer l'équilibre vers la forme dite « ouverte ». Lorsque les fibres des PT4 sont étirées, des épitopes masqués en temps normal à l'intérieur de la fibre se dévoilent. Ces épitopes peuvent favoriser l'agrégation entre les pili ou même interagir avec des composants cellulaires. Récemment, il a été montré qu'au contact des cellules, les pili du méningocoque sont étirés et les épitopes reconnus par l'anticorps SM1 sont détectés, ce qui n'est pas observé pour des bactéries en

suspension. Par contre, dans le cas du mutant *pilT*, souche hyperpiliée, les pili sont constamment étirés, ce qui suggère que la quantité de pili peut influencer la structure des fibres (Brissac et al., 2012). L'absence de rétraction et/ou l'hyperpiliation agirait alors comme un activateur allostérique permettant de renverser l'équilibre vers une structure principalement « ouverte » des PT4. Dans cette étude, il a été montré que les pili du mutant *pilX* ne sont pas étirés au contact des cellules, contrairement à la souche *pilX/pilT*. Ainsi la quantité de pili présents dans la souche *pilX* est insuffisante pour entraîner la transition vers une forme « ouverte » des PT4 et ne permet donc d'assurer les fonctions associées aux PT4. L'état d'étirement des pili n'a pas été caractérisé pour la souche *pilV*, mais il est très probable qu'ils soient moins étirés qu'une souche parentale au contact des cellules de l'hôte. De même, il est probable que l'étirement des pili de la souche *pilV/pilX/pilT* qui n'induit plus la réponse cellulaire soit moins important que les autres souches (données du laboratoire réalisées par G. Mikaty).

Interaction des pilines mineures avec la machinerie des PT4

Le blocage des pilines mineures dans la membrane interne abolit la piliation

Par la suite, nous avons essayé de comprendre comment ces pilines mineures exercent leur rôle dans la biogenèse des pili. Nous avons tout d'abord bloqué les pilines mineures dans la membrane interne en insérant une mutation en position -1 par rapport au site de clivage médiée par PilD. La mutation G-1→N chez PilE abolit la piliation. De manière intéressante, les mutants *pilX/X_{G-1N}* ou *pilV/V_{G-1N}* n'expriment plus de pili à leur surface. Pour comprendre l'effet des mutations G-1→N, nous avons montré que l'expression de PilE_{G-1N} dans une souche sauvage inhibe l'expression de pili en surface, ce qui suggère que même en absence de maturation la protéine PilE_{G-1N} interagit tout de même avec la machinerie des PT4, probablement à la base de la fibre. Cette interaction avec la fibre naissante empêcherait alors son élongation puisque la protéine PilE_{G-1N} est retenue dans la membrane interne. Il se pourrait donc que les pilines mineures favorisent l'assemblage des pili par une interaction avec PilE au niveau de la base de la fibre.

Il semble donc que le blocage d'une piline mineure dans la membrane interne ait un phénotype plus fort sur la piliation que son absence. De faibles quantités de pilines mineures PilV_{G-1N} ou PilX_{G-1N} sont capables de bloquer la piliation, suggérant que ces formes non clivées enrayent la machinerie des PT4. Plusieurs hypothèses permettent de comprendre ce résultat : soit (i) les pilines mineures interagissent avec la fibre des PT4 et bloquent son élongation comme la forme PilE_{G-1N}, soit (ii) soit les variants G-1→N interagissent avec d'autres composants

de la machinerie, soit (iii) ils bloquent la piline majeure dans la membrane interne ou soit (iv) la forme mutée PilV_{G-1N} bloque l'activité de PilX et inversement, conduisant au même défaut qu'un mutant *pilV/pilX*. Cette dernière hypothèse a pu être invalidé puisque la surexpression de la piline mineure PilX dans un contexte *pilV/V_{G-1N}* ne permet pas de restaurer la piliation ni même l'adhésion (données non illustrées).

Interaction des pilines mineures avec PilE par pontage disulfure

Pour tester l'hypothèse d'une interaction entre les pilines mineures avec les pili, nous avons réalisé des pontages disulfures entre la piline majoritaire PilE et une des pilines mineures PilV et PilX. Cette technique a été précédemment utilisée pour valider la modélisation du pseudopilus du SST2 et la formation du complexe de pseudopilines mineures PulI/PulJ/PulK (Campos et al., 2010) (Cisneros et al., 2012a). Nos résultats sont encore trop préliminaires, mais ils semblent démontrer une interaction entre les pilines mineures et PilE. Cette interaction se produit spécifiquement entre les résidus 3 et 27 des pilines. Cependant, nous n'avons pu obtenir la formation de multimères à partir d'une souche exprimant la piline PilE_{L3CT27C}. Cette souche présente peu de pili, il est alors possible que la présence de ces deux cystéines dans PilE soit néfaste pour la stabilité des pili (données non illustrées). Ainsi, nous ne pouvons pas certifier que l'interaction entre la piline majeure et les pilines mineures ait lieu dans la fibre des pili.

Cette interaction se produit également dans des mutants *pilF*, *pilD*, *pilM* n'exprimant plus de pili, suggérant que l'action des pilines mineures sur la biogenèse intervient au niveau de la membrane interne et en amont de l'assemblage des pili. Une telle observation suggère que les pilines mineures agissent sur la biogenèse des PT4 soit comme les pseudopilines PilH, PilI, PilJ et PilK pour induire l'initiation des pili ou soit comme des chaperonnes. De tels mécanismes sont observés pour les pili de la voie Chaperonne Usher ou même pour les pili Curli, où des protéines chaperonnes interagissent avec les pilines pour éviter leur agrégation prématurée. Il est donc possible que les pilines mineures PilV et PilX prennent en charge la piline majeure PilE soit pour éviter un assemblage désordonné soit pour conférer à PilE une conformation adéquate pour l'assemblage.

Les résultats obtenus par cette technique de pontage disulfure ont cependant besoin d'être confirmés par des contrôles supplémentaires. De plus, nous voulons tester d'autres couples de résidus comme les paires de résidus 9-16, 6-12 et 6-16 prédits en interaction dans le modèle des PT4 GC de *N. gonorrhoeae* (Campos et al., 2011).

Spécificité des pilines mineures et importance des régions D et α/β

La tête globulaire des pilines est un domaine fonctionnel

Pour approfondir le mécanisme d'action de ces pilines mineures, nous avons réalisé une étude structure/fonction. Une des premières observations faite sur les pilines mineures est leur similitude avec la piline majoritaire PilE. Nous avons donc voulu comprendre quels étaient les domaines fonctionnels et spécifiques aux pilines mineures leur permettant d'exercer leur rôle sur la piliation et les fonctions comme l'adhésion, l'agrégation et le déclenchement des voies de signalisation de la cellule hôte. Pour y parvenir, nous avons réalisé des protéines chimères entre PilE et les pilines mineures PilV et PilX. Grâce à cette stratégie, nous avons pu montrer que la région N-Terminale de vingt-deux acides aminés de l'hélice α était interchangeable entre la piline PilE et les pilines mineures et que la spécificité de ces protéines résidait donc dans leur domaine globulaire. Nous avons montré que si la région D semble nécessaire à la fonction des pilines mineures, elle n'est cependant pas suffisante pour induire leur fonction. De plus le domaine globulaire des pilines constitué de l'hélice $\alpha 1C$, de la boucle α/β , du feuillet β et de la région D forme un ensemble fonctionnel qui ne peut être dissocié sans perte de fonction. Ainsi les pilines mineures sont composées de deux domaines : l'hélice $\alpha 1N$ non spécifique et la tête globulaire responsable de leur spécificité et de leur fonction.

La boucle α/β et $\beta 2/\beta 3$ sont requises pour la fonction de PilX

Nous avons donc poursuivi notre étude sur le domaine globulaire de ces pilines en ne ciblant que les boucles comprises entre les brins β ainsi que la boucle α/β et la région D. En utilisant une stratégie de substitution avec un peptide FLAG de huit acides aminés, nous avons montré que seule la région D est nécessaire à la fonction de PilV, alors que la région α/β et la boucle $\beta 2/\beta 3$ sont nécessaires pour la fonction de PilX.

De manière intéressante, nous avons remarqué qu'il existe une corrélation entre chaque fonction dépendante de PilX. En effet, lorsque la protéine PilX3 ne permet pas d'induire l'agrégation bactérienne, elle ne permet pas non plus d'induire l'adhésion ni même le déclenchement des voies de signalisation, ce qui suggère qu'il n'existe pas de domaines spécifiques associés à l'une ou l'autre de ces fonctions. Ceci conforte donc nos précédents résultats montrant l'implication de la piline mineure PilX sur la biosynthèse des pili. De plus, nous avons montré que la substitution de la région D de PilX (PilX8) n'a pas d'effet drastique sur la fonction de cette protéine, contrairement à ce qui avait été proposé auparavant (Helaine et al.,

2007). En effet, dans cette étude, les auteurs montrent qu'une délétion de douze acides aminés de la région D de PilX abolit sa fonction. Cependant, dans cette étude, les tests phénotypiques sont réalisés en absence d'IPTG. Au cours de ma thèse, j'ai pu tester la fonctionnalité de cette protéine délétée en présence d'IPTG et j'ai pu constater que cette souche est agrégative dans ces conditions, ce qui montre que cette délétion a les mêmes effets que la substitution FLAG dans la protéine PilX8 et que cette protéine est moins efficace mais elle est toujours capable d'assurer sa fonction lorsqu'elle est surexprimée (données non illustrées).

La région D est nécessaire mais non suffisante pour assurer la fonction de PilV

Dans le cas de PilV, nous avons montré que la substitution de la partie N-Terminale de la région D abolit la fonction de cette protéine. Cette construction est faiblement exprimée, ce qui suggère un problème de stabilité. Cependant cette protéine est capable d'exercer un effet dominant lorsqu'elle est exprimée dans une souche parentale, suggérant une localisation et un repliement corrects. Nous avons ensuite montré que cette substitution pouvait supprimer l'effet de la mutation G-1N au niveau de l'adhésion et de la piliation des bactéries. Ceci suggère que la piline mineure PilV interagit avec la machinerie des PT4 via sa région D. Les substitutions de la partie N-Terminale de la région α/β affectent également la fonction de la piline PilV. Il est possible que cette substitution placée dans un repliement de type épingle à cheveux ait des effets importants sur le repliement et la stabilité de la protéine PilV1 et abolisse la fonction de PilV.

Notre analyse n'a révélé qu'une seule région, la région D, nécessaire à la fonction de PilV. Or l'étude des protéines chimériques a montré que la région D n'était pas suffisante pour induire les fonctions de PilV, puisque la construction PilE(V) n'est pas fonctionnelle. Ce résultat peut s'expliquer de trois manières : soit (i) le repliement de la région D dépend de l'ensemble du domaine globulaire, soit (ii) l'environnement de la région D détermine son exposition, ou soit (iii) d'autres régions sont nécessaires à la fonction de PilV. Dans notre étude, nous nous sommes limités aux boucles comprises entre les brins β , cependant, le feuillet β est également exposé et pourrait jouer un rôle important dans la fonction de PilV. A l'heure actuelle, nous ne disposons pas de la structure tridimensionnelle de PilV, cependant, l'apport de cette structure serait nécessaire pour étudier le rôle des résidus du feuillet β exposés à la surface de PilV.

Mode d'action de la piline mineure ComP

La troisième piline mineure ComP est nécessaire à la compétence pour la transformation d'ADN. Il a été montré récemment que cette protéine interagit directement avec l'ADN avec une spécificité de séquence pour les DUS nécessaires à une capture optimale du fragment d'ADN (Cehovin et al., 2013). De plus, cette même étude a montré que les PT4 purifiés d'une souche *comP* fixaient moins de molécules d'ADN que les PT4 d'une souche sauvage, suggérant que la piline mineure s'intègre dans la fibre des PT4 pour être exposée à la surface des bactéries et fixer les molécules d'ADN. Cependant ni la localisation ni le mode d'action ne sont connus pour la piline mineure ComP.

Localisation de la piline mineure ComP

Il n'existe aucune preuve directe de la localisation de la piline mineure ComP, excepté la présence de ComP dans les purifications de pili. Or nous avons précédemment montré qu'une fraction très faible, voire négligeable des pilines mineures PilV et PilX était retrouvée lors de ces préparations de pili, alors qu'elles exercent leur rôle au niveau du périplasma. De plus, il a été montré qu'une forme mutée ComP_{G-1S} non clivée et bloquée dans la membrane interne était co-purifiée avec les pili alors que cette piline n'est pas clivée par PilD, indiquant clairement une contamination lors des purifications de PT4 (Aas et al., 2002b). Par analogie avec nos résultats sur les pilines mineures PilV et PilX, il est fort probable que la piline mineure ComP joue son rôle dans le compartiment périplasmique. Plusieurs arguments sont en faveur de cette hypothèse. Tout d'abord, l'ajout d'anticorps dirigés contre ComP lors de tests de compétence n'affecte pas la fréquence de transformation, alors que l'ajout de l'anticorps dirigé contre PilE, le 20d9, diminue la fréquence de transformation par un facteur 100 (Cehovin et al., 2011). De plus, des études antérieures ont montré que la quantité de molécules d'ADN en association avec les bactéries ne dépend pas de la présence de ComP et que seul le passage de cet ADN dans le périplasma, qui rend l'ADN insensible à l'ajout de DNase, est affecté dans un mutant *comP* (Aas et al., 2002b). N'ayant pas de rôle dans la fixation de l'ADN par les bactéries, la piline mineure ComP pourrait exercer sa fonction au niveau du périplasma. Dans l'avenir, nous souhaitons aborder cette problématique de la localisation par l'étude de la fonctionnalité d'une protéine ComP-mCherry.

Rôle de la piline mineure ComP sur la biogenèse des PT4

Alors que la question de la localisation de la piline mineure ComP reste ouverte, qu'en est-il pour son mode d'action? En effet, la transformation d'ADN requiert différentes étapes dont

la rétraction des pili. Il est donc possible que ComP, nécessaire pour le transport de l'ADN dans le périplasme, soit impliquée dans la transition assemblage-rétraction des PT4. Si tel est le cas, l'absence de ComP pourrait moduler la quantité de pili exprimés à la surface des bactéries. Nous avons effectivement montré qu'un mutant *comP* est deux fois plus pilié que la souche parentale. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus auparavant. En effet, il a été montré que la piline mineure ComP pouvait moduler négativement la quantité de pili puisqu'un mutant *comP* est 1,5 fois plus pilié (Brown et al., 2010). Ainsi, comme les pilines mineures PilV et PilX, la piline mineure ComP module la piliation, mais contrairement aux autres pilines mineures cette régulation est négative.

Nous avons montré que le défaut de piliation d'une souche *pilX* pouvait être partiellement restauré par l'addition de la mutation *comP*, puisque le mutant *pilX/comP* présente 50% de pili par rapport à la souche parentale. Ce résultat indique d'une part que la piline PilV assure à elle seule 50% de la biogenèse des pili. D'autre part, ce résultat montre une fois de plus l'effet négatif de la piline ComP sur la biogenèse des pili, puisque le mutant *pilX*, où la biogenèse est régulée à la fois par PilV et par ComP, est moins pilié. Cependant, le rôle de ComP sur la biogenèse n'est pas si simple. En effet, nous avons montré que la souche *pilV/comP* n'est plus piliée. Ce résultat indique que la piline mineure ComP est nécessaire à la piliation. En effet, la surexpression de ComP dans un mutant *pilV* peut augmenter légèrement la piliation et le déclenchement de la réponse cellulaire, indiquant un rôle redondant entre les pilines mineures PilV et ComP. L'ensemble de ces résultats suggère que la piline mineure ComP présente un rôle similaire à celui de PilV pour l'assemblage des pili mais avec une efficacité beaucoup plus faible.

Le fait que les pilines PilV et ComP agissent au niveau d'une même étape permet de mieux comprendre la compétition qui existe entre les protéines PilV et ComP. En effet, en absence de PilV, la fréquence de transformation est augmentée par un facteur 40 dans le cas du gonocoque et par un facteur 2 dans le cas du méningocoque (Brown et al., 2010) (Aas et al., 2002a). La piline mineure PilV serait donc un inhibiteur de la compétence. De plus, une quantité plus grande de protéine ComP est retrouvée dans les purifications de pili dans une souche *pilV* (Aas et al., 2002a). Les deux pilines PilV et ComP pourraient alors agir sur la même étape de biogenèse des pili.

Effet de la quantité de pili sur la compétence

L'effet de la quantité de pili sur la compétence a déjà été testé auparavant. En utilisant une souche mutée dans *pilE* complétée par une copie sauvage de *PilE* sous le contrôle d'un

promoteur Lac régulable par IPTG. Cependant, comme dans nos expériences, ce système ne permet pas d'exprimer une quantité de PilE comparable à celle de la souche parentale mais permet tout de même d'exprimer jusqu'à 50% de pili. L'efficacité de transformation atteint très rapidement un maximum similaire à celui de la souche parentale, malgré une faible piliation (Long et al., 2001). Ces résultats indiquent qu'une très faible quantité de pili est suffisante pour permettre la transformation. Par la suite, il a été montré qu'en absence d'induction, la fréquence de transformation est augmentée d'un facteur 1000 comparée à un mutant *pilE* alors que seulement 1 pilus a pu être observé sur 6000 bactéries examinées en microscopie électronique. Ce résultat suggère que la présence de pili à la surface des bactéries n'est pas essentielle pour la transformation. Les auteurs proposent plutôt que l'interaction de la piline PilE avec la machinerie serait suffisante pour permettre le passage de l'ADN (Long et al., 2003).

Cependant, si peu de pili est requis pour la transformation, la forte piliation de la souche *comP* ne permet pas d'expliquer son défaut de compétence. Il est possible que les rôles de ComP sur la biogenèse des PT4 et sur la compétence grâce à son domaine de liaison avec l'ADN soient indépendants l'un de l'autre. Une telle bifonctionnalité a d'ailleurs été observée pour les pseudopilines PilW et PilX de *P. aeruginosa*. Ces protéines sont nécessaires pour l'assemblage des PT4 et pour la répression de la motilité par « swarming » dépendante du flagelle. Cette régulation est permise par l'action des pseudopilines au niveau de la membrane interne, alors que leur rôle dans la biogenèse des PT4 requiert leur insertion dans la fibre des PT4 (Kuchma et al., 2012). Pour explorer cette possibilité, nous pourrions étudier la fonctionnalité d'une protéine ComP_{G-1N} sur la compétence et la piliation.

Modèle du mode d'action des pilines mineures pour la biogenèse des pili

L'ensemble de nos résultats nous permet de proposer un modèle pour le mode d'action des pilines mineures dans la biogenèse des PT4. En effet, nous avons montré que chaque mutant présente soit une perte de piliation, soit une hyperpiliation. Nous avons également montré que les pilines mineures PilV et ComP portent des fonctions partiellement redondantes et nous faisons l'hypothèse que ces deux protéines sont nécessaires dans la même étape de biogenèse des pili. Cependant, la piline ComP serait beaucoup moins efficace car le double mutant *pilV/pilX* produit seulement quelques pili non détectables par ELISA alors que le mutant *pilX/comP* produit 50% de pili comparé à la souche sauvage. Nous avons montré que les pilines PilX et PilV sont toutes deux nécessaires pour la biogenèse des pili mais que leurs fonctions ne sont pas

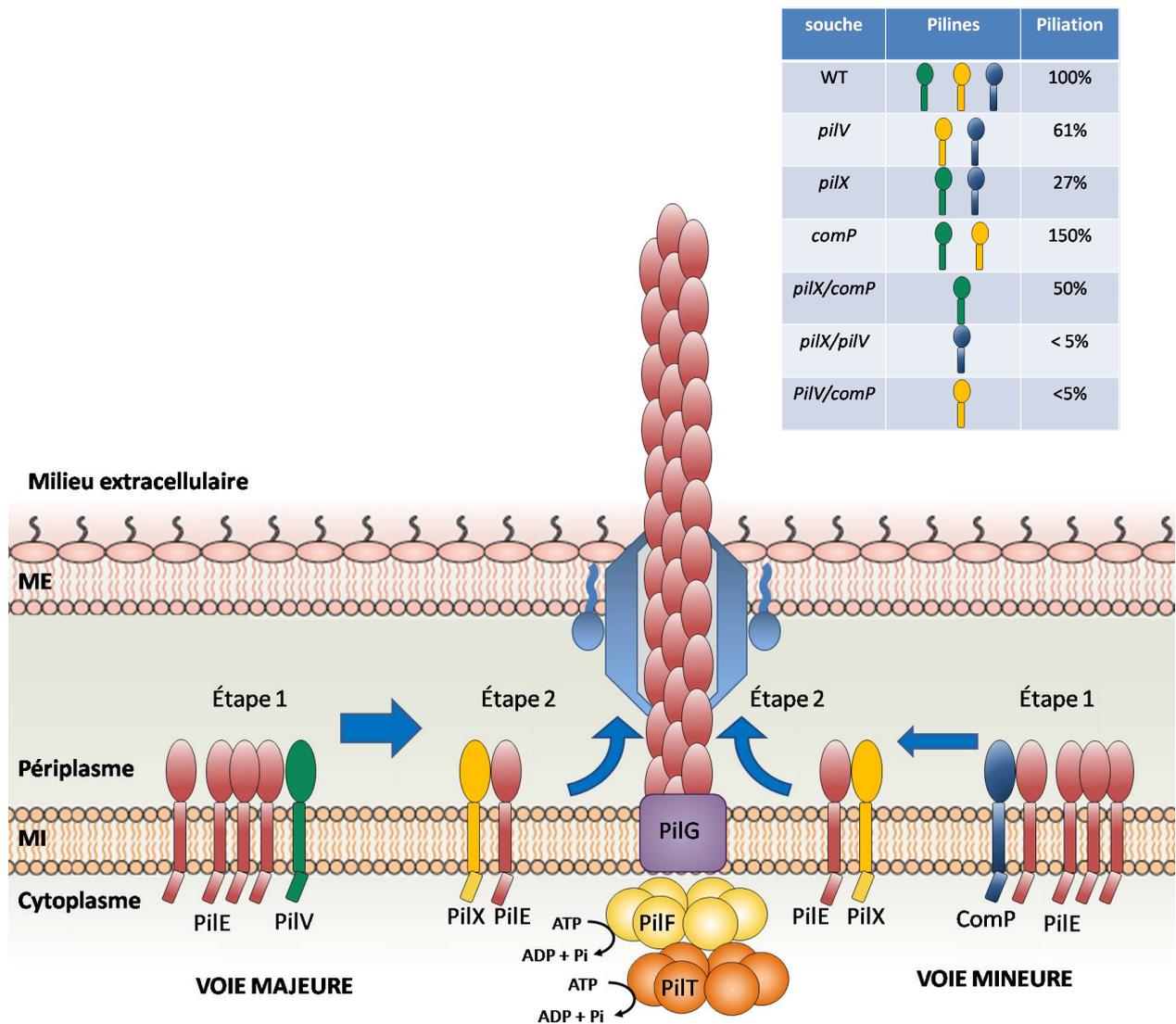


Figure 42: Modèle du mode d'action des pilines mineures sur la biogenèse des pili
 Tableau résumant l'effet des mutations dans les gènes codant les pilines mineures sur la piliation.

La biogenèse des pili nécessitent la présence des pilines mineures PilV, PilX et ComP. Les pilines mineures PilV et PilX interagissent avec la piline majeure PilE au niveau de la membrane interne, cependant leur action n'est pas encore comprise. Les pilines mineures PilV et ComP interviennent au niveau de la même étape, l'étape 1. Cependant, la piline ComP a une efficacité plus faible que PilV, expliquant la forte piliation d'un mutant *comP*. L'étape 2 dépendante de PilX n'est pas indispensable, mais elle optimise l'efficacité d'assemblage. Deux voies co-existent: une dite « majeure » permise par l'action des pilines PilV et PilX, l'autre dite « mineure » permise par l'action des pilines ComP et PilX.

redondantes. Ces pilines jouent donc des fonctions différentes et agissent sur deux étapes différentes.

Il semble donc que la biogenèse des pili soit dépendante de deux voies parallèles, une voie que nous pouvons qualifier de « majeure » dans laquelle PilV et PilX agissent successivement et permettent de former la majorité des pili et une deuxième voie « mineure » moins efficace dans laquelle la piline PilV est remplacée par ComP. L'étape de maturation dépendante de PilV ou de ComP semble fonctionnellement plus importante que celle dépendante de PilX. En effet, l'analyse de la piliation des doubles mutants montre que la piline PilV permet à elle seule d'assurer la formation de 50% des pili, alors que la piline mineure PilX n'est pas suffisante pour permettre la biogenèse de pili, puisque le double mutant *pilV/comP* n'est plus pilié. Cependant, la surexpression de la piline PilX permet d'augmenter d'un facteur 2,5 la quantité de pili exprimés par la bactérie. Il est possible que l'étape de maturation dépendante de PilX ne soit pas suffisante mais potentialise l'effet de PilV et ComP sur la biogenèse des pili. Dans ce modèle, les pilines mineures PilV et ComP interviennent dans la même étape, mais avec une efficacité différente. De ce fait, la piliation d'une souche sauvage ne serait donc pas maximale, mais plutôt optimale pour porter l'ensemble des fonctions associées aux PT4.

Nos résultats suggèrent également que les pilines mineures PilV et PilX agissent de manière similaire aux pseudopilines PilH, PilI, PilJ et PilK sur la biogenèse des pili. Par l'étude du pontage disulfure entre PilE/PilX et PilE/PilV, nous avons montré que les pilines mineures sont capables d'interagir avec la piline majeure en amont de l'assemblage dans la membrane interne. Il est alors possible que les pilines mineures forment des complexes avec PilE pour permettre soit d'initier la formation des pili, à l'instar des pseudopilines, soit de réguler la conformation ou la quantité de la piline majeure accessible à la machinerie des PT4, comme des chaperonnes. Au vu du rôle de la piline ComP sur la biogenèse des pili, il est possible qu'elle agisse de manière semblable.

La piline majeure au centre des interactions avec la cellule

Le fait que les pilines mineures jouent leur rôle dans le compartiment périplasmique indique que les fibres des PT4 sont composées uniquement de la piline majeure PilE. Cette protéine joue donc un rôle central dans la modulation des fonctions des PT4.

Impact de la séquence de PilE

De nombreux résultats soutiennent cette hypothèse. Tout d'abord, l'ensemble des fonctions des PT4 peut être directement modulé par la nature de la piline PilE. En effet, le gène *pilE* est soumis à variation antigénique, ce qui permet à la bactérie d'exprimer différents variants de PilE. Les variants qui se distinguent au niveau des régions les plus exposées de la fibre des PT4, n'ont pas les mêmes propriétés au niveau de l'adhésivité et la surface électrostatique de la fibre. L'expression différentielle de ces variants peut donc moduler l'adhésion et l'agrégation des bactéries. Ainsi les souches exprimant certains variants de piline (les pilines SA et SC) présentent une adhésion diminuée par rapport à une souche exprimant le variant SB (Nassif et al., 1993, Marceau et al., 1995). De même, les souches exprimant un variant de piline SA perdent leur capacité à agréger (Marceau et al., 1995).

Impact des modifications post-traductionnelles portées par PilE

Les variations de séquence de PilE ne sont pas les seuls facteurs pouvant moduler les fonctions des PT4. En effet, PilE est sujette à des modifications post-traductionnelles par l'ajout de glycosylations ou d'autres groupements. Au cours de cette thèse, j'ai participé à la caractérisation d'une modification ajoutée par la phosphotransférase PptB. Le gène *pptB* codant pour cette transférase est surexprimé après contact avec les cellules épithéliales, ce qui induit l'ajout d'un phosphoglycérol sur la sérine 93 de la piline PilE. Nous avons testé l'effet de cette modification sur les phénotypes comme l'adhésion et l'agrégation et montré que l'ajout d'un phosphoglycérol sur la piline PilE inhibe la formation d'agrégats alors qu'elle n'a aucune conséquence sur l'adhésion. L'observation des fibres des PT4 au microscope électronique a révélé que les fibres restent individuelles et ne forment plus de faisceaux comme cela est observé dans une souche parentale. L'ajout d'un phosphoglycérol modifie donc la surface électrostatique de la fibre, abolissant ainsi les interactions entre les PT4 nécessaires à l'agrégation. Cette modification entraîne par conséquent la dissociation des bactéries qui peuvent alors se détacher de la microcolonie. Cette modification n'ayant pas d'effet sur l'adhésion, cette bactérie sera capable alors de coloniser d'autres sites ou même d'autres individus (Chamot-Rooke et al., 2011).

Activité directe de PilE sur les cellules

De plus, un rôle direct de PilE dans l'induction des voies de signalisation de la cellule hôte a pu être démontré par l'utilisation de staphylocoque couplé à des anticorps anti-MBP en

interaction avec la protéine MBP-PilE purifiée. L'infection des cellules humaines par ce système montre clairement la formation d'une plaque corticale sous la microcolonie formée des staphylocoques couplés à la protéine PilE, ce qui n'est pas observé lorsque les cellules sont infectées par des staphylocoques couplés à la piline mineure ComP (Coureuil et al., 2010). Enfin, si l'ajout d'anticorps dirigés contre les pilines mineures n'affecte pas les fonctions des PT4, des anticorps dirigés contre PilE semblent inhiber l'adhésion d'un facteur 100 (Cehovin et al., 2011). De plus, le déclenchement de la réponse cellulaire peut être localement inhibé par l'ajout de l'anticorps monoclonal dirigé contre PilE lors de l'infection (données non publiées). L'interaction directe entre les pilines majeures et les cellules de l'hôte a déjà été observée chez de nombreuses bactéries : la piline PilA de *P. aeruginosa* permet l'adhésion sur les cellules via les récepteurs glycolipidiques Asialo GM1-1 et GM-2 (Hazes et al., 2000), la piline BfpA des EPEC agit comme une lectine sur les groupements N-acetyllactosamine des cellules de l'hôte (Hyland et al., 2008) et la piline PilS de *S. typhi* est capable d'interagir avec les régulateurs de conductance transmembranaire de fibrose kystique (CFTR) des cellules épithéliales (Tsui et al., 2003). Ainsi la nature de la piline majeure détermine la spécificité d'interaction avec les cellules. En effet, l'expression de la piline PilA2 de *Clostridium perfringens* dans une souche mutée dans le gène *pilE* de *N. gonorrhoeae* permet de restaurer la piliation et permet aux gonocoques d'adhérer sur les cellules de myoblastes mais plus sur les cellules épithéliales (Rodgers et al., 2011). Ceci prouve de façon remarquable que les caractéristiques des pilines majeures définissent les propriétés générales des PT4.

Les variations que subit la piline majeure PilE, par la variation antigénique ou par l'ajout de modifications post-traductionnelles, peuvent moduler la surface électrostatique de la fibre, la présentation d'épitopes « déclencheur » des fonctions des PT4, ou modifier la structure quaternaire des PT4. En effet, la nature de PilE n'est pas le seul facteur responsable des fonctions des PT4 puisque la dynamique semble jouer un rôle tout aussi important. Chez *N. meningitidis*, il a récemment été suggéré que la réponse cellulaire est dépendante d'un changement de la structure quaternaire des PT4 (Brissac et al., 2012). Ce changement de conformation est observable par l'utilisation de l'anticorps anti-PilE SM1 qui reconnaît un épitope de la piline masqué lors de l'assemblage de PilE et qui ne détecte les pili que lorsque ces derniers sont étirés par peignage moléculaire (Biais et al., 2010). Il a été montré que cet épitope devient accessible au niveau des microcolonies qui induisent une réponse cellulaire, reflétant ainsi un changement de conformation des pili au cours de l'infection (Brissac et al., 2012). Il est possible que ce changement conformationnel des pili soit dépendant des moteurs moléculaires des PT4, PilT, PilT2 et PilU. Il a effectivement été montré chez *N. gonorrhoeae* que la rétraction des PT4 dépendante de PilT participe à la réorganisation du cytosquelette d'actine, puisque le

recrutement est moins important et moins fréquent chez un mutant *pilT* (Lee et al., 2005) (Higashi et al., 2007). L'observation par microscopie électronique à transmission des cellules infectées par un mutant *pilT* révèle que le nombre et la taille des projections membranaires sont diminués de moitié (Higashi et al., 2009). En ce qui concerne PilT2, aucune étude n'a décrit de défaut d'une souche *pilT2* dans l'interaction avec les cellules à l'heure actuelle. Cependant, la protéine PilU semble participer à la formation des microcolonies, puisque les microcolonies formées par une souche *pilU* sont plus petites (Eriksson et al., 2012). Une régulation fine de la dynamique des pili semble donc elle aussi être un facteur important dans le déclenchement des fonctions des PT4.

Impact sur les stratégies thérapeutiques

Les PT4 sont des cibles thérapeutiques intéressantes puisque ce sont des fibres extrudées à la surface des bactéries et de leur capsule. Les pilines mineures auraient pu être des cibles potentielles intéressantes, car les séquences des pilines mineures sont relativement bien conservées entre les souches de *Neisseria* (Cehovin et al., 2010). Cependant il a été montré que les fonctions des PT4 sont très peu affectées par la compétition avec des anticorps dirigés contre les pilines mineures, alors que l'ensemble des fonctions d'adhésion, d'agrégation et de compétence sont affectées par l'ajout de l'anticorps 20d9, dirigé contre la piline PilE. De plus, cette même étude montre finalement que ces différents anticorps dirigés contre les pilines mineures ne sont pas bactéricides (Cehovin et al., 2011).

La piline PilE semble jouer un rôle direct dans l'ensemble des fonctions associée aux PT4 nécessaires à la colonisation par le méningocoque et à sa virulence. Représentées en grand nombre et suffisamment exposées, les protéines PilE pourraient être des cibles vaccinables. En effet, la piline est immunogénique puisque des anticorps dirigés contre cette protéine ont été retrouvés chez des patients infectés par *N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis* (Lammel et al., 1985, Poolman et al., 1983). Cependant, la piline PilE présente une grande variabilité entre les différentes souches de méningocoque (Cehovin et al., 2010). De plus, la piline est soumise à variation antigénique. Les bactéries portent l'information génétique pour au moins six copies de pilines différentes et peuvent exprimer rapidement un allèle différent, ce qui empêche les stratégies vaccinales dirigées contre la piline de protéger efficacement et durablement (Boslego et al., 1991). Cependant, les régions hypervariables sont localisées au niveau de la région α/β et de la région D. Ces régions sont exposées à la surface de la fibre des PT4, mais elles ne sont pas les seules puisqu'il a été montré que l'étirement des pili peut dévoiler des régions autrement enfouies dans la fibre (Craig et al., 2006) (Li et al., 2008) (Biais et al., 2010). Ces étirements ont

lieu naturellement dans les microcolonies lors de la colonisation (Brissac et al., 2012). Ces régions transitoirement accessibles correspondent aux régions constantes de PilE et pourraient alors être une cible vaccinable. L'utilisation de piline comme cible vaccinable a déjà fait l'objet d'une étude chez *Vibrio cholerae*. En effet, l'ajout d'anticorps dirigés contre la piline TcpA inhibe l'adhésion des bactéries sur les cellules épithéliales et la formation des microcolonies (Kirn et al., 2000). De plus, ces anticorps semblent jouer un rôle protecteur dans les modèles *in vivo* (Sun et al., 1990). Dans notre étude, nous avons montré que la perte de 30% de pili est suffisante pour abolir le déclenchement de la réponse cellulaire, étape clé pour la pathogenèse de *N. meningitidis*. La mise au point de stratégies visant des sites plus conservés et exposés de manière transitoire pourrait par conséquent être efficace pour lutter contre les infections provoquées par *N. meningitidis*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aas, F.E., W. Egge-Jacobsen, H.C. Winther-Larsen, C. Lovold, P.G. Hitchen, A. Dell & M. Koomey, (2006) Neisseria gonorrhoeae type IV pili undergo multisite, hierarchical modifications with phosphoethanolamine and phosphocholine requiring an enzyme structurally related to lipopolysaccharide phosphoethanolamine transferases. *J Biol Chem* **281**: 27712-27723.
- Aas, F.E., C. Lovold & M. Koomey, (2002a) An inhibitor of DNA binding and uptake events dictates the proficiency of genetic transformation in Neisseria gonorrhoeae: mechanism of action and links to Type IV pilus expression. *Mol Microbiol* **46**: 1441-1450.
- Aas, F.E., H.C. Winther-Larsen, M. Wolfgang, S. Frye, C. Lovold, N. Roos, J.P. van Putten & M. Koomey, (2007) Substitutions in the N-terminal alpha helical spine of Neisseria gonorrhoeae pilin affect Type IV pilus assembly, dynamics and associated functions. *Mol Microbiol* **63**: 69-85.
- Aas, F.E., M. Wolfgang, S. Frye, S. Dunham, C. Lovold & M. Koomey, (2002b) Competence for natural transformation in Neisseria gonorrhoeae: components of DNA binding and uptake linked to type IV pilus expression. *Mol Microbiol* **46**: 749-760.
- Ajon, M., S. Frols, M. van Wolferen, K. Stoecker, D. Teichmann, A.J. Driessen, D.W. Grogan, S.V. Albers & C. Schleper, (2011) UV-inducible DNA exchange in hyperthermophilic archaea mediated by type IV pili. *Mol Microbiol* **82**: 807-817.
- Alarcon, I., D.J. Evans & S.M. Fleiszig, (2009) The role of twitching motility in Pseudomonas aeruginosa exit from and translocation of corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**: 2237-2244.
- Albers, S.V. & M. Pohlschroder, (2009) Diversity of archaeal type IV pilin-like structures. *Extremophiles* **13**: 403-410.
- Alm, R.A., A.J. Boderer, P.D. Free & J.S. Mattick, (1996a) Identification of a novel gene, pilZ, essential for type 4 fimbrial biogenesis in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* **178**: 46-53.
- Alm, R.A., J.P. Hallinan, A.A. Watson & J.S. Mattick, (1996b) Fimbrial biogenesis genes of Pseudomonas aeruginosa: pilW and pilX increase the similarity of type 4 fimbriae to the GSP protein-secretion systems and pilY1 encodes a gonococcal PilC homologue. *Mol Microbiol* **22**: 161-173.
- Alm, R.A. & J.S. Mattick, (1995) Identification of a gene, pilV, required for type 4 fimbrial biogenesis in Pseudomonas aeruginosa, whose product possesses a pre-pilin-like leader sequence. *Mol Microbiol* **16**: 485-496.
- Alm, R.A. & J.S. Mattick, (1996) Identification of two genes with prepilin-like leader sequences involved in type 4 fimbrial biogenesis in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* **178**: 3809-3817.
- Ambur, O.H., S.A. Frye, M. Nilsen, E. Hovland & T. Tonjum, (2012) Restriction and sequence alterations affect DNA uptake sequence-dependent transformation in Neisseria meningitidis. *PLoS One* **7**: e39742.
- Audette, G.F., R.T. Irvin & B. Hazes, (2004) Crystallographic analysis of the Pseudomonas aeruginosa strain K122-4 monomeric pilin reveals a conserved receptor-binding architecture. *Biochemistry* **43**: 11427-11435.
- Aukema, K.G., E.M. Kron, T.J. Herdendorf & K.T. Forest, (2005) Functional dissection of a conserved motif within the pilus retraction protein PilT. *J Bacteriol* **187**: 611-618.
- Avery, O.T., C.M. Macleod & M. McCarty, (1944) Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. *J Exp Med* **79**: 137-158.
- Ayers, M., L.M. Sampaleanu, S. Tammam, J. Koo, H. Harvey, P.L. Howell & L.L. Burrows, (2009) PilM/N/O/P proteins form an inner membrane complex that affects the stability of the Pseudomonas aeruginosa type IV pilus secretin. *J Mol Biol* **394**: 128-142.
- Balasingham, S.V., R.F. Collins, R. Assalkhou, H. Homberset, S.A. Frye, J.P. Derrick & T. Tonjum, (2007) Interactions between the lipoprotein PilP and the secretin PilQ in Neisseria meningitidis. *J Bacteriol* **189**: 5716-5727.

- Bally, M., A. Filloux, M. Akrim, G. Ball, A. Lazdunski & J. Tommassen, (1992) Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of seven xcp genes and processing of secretory apparatus components by prepilin peptidase. *Mol Microbiol* **6**: 1121-1131.
- Biais, N., D.L. Higashi, J. Brujic, M. So & M.P. Sheetz, (2010) Force-dependent polymorphism in type IV pili reveals hidden epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 11358-11363.
- Biais, N., B. Ladoux, D. Higashi, M. So & M. Sheetz, (2008) Cooperative retraction of bundled type IV pili enables nanonewton force generation. *PLoS Biol* **6**: e87.
- Bille, E., J.R. Zahar, A. Perrin, S. Morelle, P. Kriz, K.A. Jolley, M.C. Maiden, C. Dervin, X. Nassif & C.R. Tinsley, (2005) A chromosomally integrated bacteriophage in invasive meningococci. *J Exp Med* **201**: 1905-1913.
- Bitter, W., (2003) Secretins of *Pseudomonas aeruginosa*: large holes in the outer membrane. *Arch Microbiol* **179**: 307-314.
- Boslego, J.W., E.C. Tramont, R.C. Chung, D.G. McChesney, J. Ciak, J.C. Sadoff, M.V. Piziak, J.D. Brown, C.C. Brinton, Jr., S.W. Wood & et al., (1991) Efficacy trial of a parenteral gonococcal pilus vaccine in men. *Vaccine* **9**: 154-162.
- Bradley, D.E., (1980) A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. *Can J Microbiol* **26**: 146-154.
- Brandtzaeg, P. & M. van Deuren, (2012) Classification and pathogenesis of meningococcal infections. *Methods Mol Biol* **799**: 21-35.
- Brissac, T., G. Mikaty, G. Dumenil, M. Coureuil & X. Nassif, (2012) The meningococcal minor pilin PilX is responsible for type IV pilus conformational changes associated with signaling to endothelial cells. *Infect Immun* **80**: 3297-3306.
- Broomes, E.L., (1975) Gonorrhoea's Trojan horse: the asymptomatic female carrier. *J Natl Med Assoc* **67**: 468-470, 494.
- Brossay, L., G. Paradis, R. Fox, M. Koomey & J. Hebert, (1994) Identification, localization, and distribution of the PilT protein in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **62**: 2302-2308.
- Brown, D.R., S. Helaine, E. Carbonnelle & V. Pelicic, (2010) Systematic functional analysis reveals that a set of seven genes is involved in fine-tuning of the multiple functions mediated by type IV pili in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **78**: 3053-3063.
- Budroni, S., E. Siena, J.C. Dunning Hotopp, K.L. Seib, D. Serruto, C. Nofroni, M. Comanducci, D.R. Riley, S.C. Daugherty, S.V. Angiuoli, A. Covacci, M. Pizza, R. Rappuoli, E.R. Moxon, H. Tettelin & D. Medini, (2011) *Neisseria meningitidis* is structured in clades associated with restriction modification systems that modulate homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 4494-4499.
- Burrows, L.L., (2005) Weapons of mass retraction. *Mol Microbiol* **57**: 878-888.
- Campbell, A.P., W.Y. Wong, M. Houston, Jr., F. Schweizer, P.J. Cachia, R.T. Irvin, O. Hindsgaul, R.S. Hodges & B.D. Sykes, (1997) Interaction of the receptor binding domains of *Pseudomonas aeruginosa* pili strains PAK, PAO, KB7 and P1 to a cross-reactive antibody and receptor analog: implications for synthetic vaccine design. *J Mol Biol* **267**: 382-402.
- Campos, M., O. Francetic & M. Nilges, (2011) Modeling pilus structures from sparse data. *J Struct Biol* **173**: 436-444.
- Campos, M., M. Nilges, D.A. Cisneros & O. Francetic, (2010) Detailed structural and assembly model of the type II secretion pilus from sparse data. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 13081-13086.
- Carbonnelle, E., S. Helaine, X. Nassif & V. Pelicic, (2006) A systematic genetic analysis in *Neisseria meningitidis* defines the Pil proteins required for assembly, functionality, stabilization and export of type IV pili. *Mol Microbiol* **61**: 1510-1522.
- Carbonnelle, E., S. Helaine, L. Prouvensier, X. Nassif & V. Pelicic, (2005) Type IV pilus biogenesis in *Neisseria meningitidis*: PilW is involved in a step occurring after pilus assembly, essential for fibre stability and function. *Mol Microbiol* **55**: 54-64.
- Cardenosa, N., A. Dominguez, A. Orcau, H. Panella, P. Godoy, S. Minguell, N. Camps & J.A. Vazquez, (2001) Carriers of *Neisseria meningitidis* in household contacts of meningococcal disease cases in Catalonia (Spain). *Eur J Epidemiol* **17**: 877-884.

- Cartwright, K.A., D.M. Jones, A.J. Smith, J.M. Stuart, E.B. Kaczmarek & S.R. Palmer, (1991a) Influenza A and meningococcal disease. *Lancet* **338**: 554-557.
- Cartwright, K.A., J.M. Stuart, D.M. Jones & N.D. Noah, (1987) The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidemiol Infect* **99**: 591-601.
- Cartwright, K.A., J.M. Stuart & P.M. Robinson, (1991b) Meningococcal carriage in close contacts of cases. *Epidemiol Infect* **106**: 133-141.
- Caugant, D.A., E.A. Hoiby, P. Magnus, O. Scheel, T. Hoel, G. Bjune, E. Wedege, J. Eng & L.O. Froholm, (1994) Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. *J Clin Microbiol* **32**: 323-330.
- Caugant, D.A. & M.C. Maiden, (2009) Meningococcal carriage and disease--population biology and evolution. *Vaccine* **27 Suppl 2**: B64-70.
- Cehovin, A., J.S. Kroll & V. Pelicic, (2011) Testing the vaccine potential of PilV, PilX and ComP, minor subunits of *Neisseria meningitidis* type IV pili. *Vaccine* **29**: 6858-6865.
- Cehovin, A., P.J. Simpson, M.A. McDowell, D.R. Brown, R. Noschese, M. Pallett, J. Brady, G.S. Baldwin, S.M. Lea, S.J. Matthews & V. Pelicic, (2013) Specific DNA recognition mediated by a type IV pilin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 3065-3070.
- Cehovin, A., M. Winterbotham, J. Lucidarme, R. Borrow, C.M. Tang, R.M. Exley & V. Pelicic, (2010) Sequence conservation of pilus subunits in *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* **28**: 4817-4826.
- Chamot-Rooke, J., G. Mikaty, C. Malosse, M. Soyer, A. Dumont, J. Gault, A.F. Imhaus, P. Martin, M. Trellet, G. Clary, P. Chafey, L. Camoin, M. Nilges, X. Nassif & G. Dumenil, (2011) Posttranslational modification of pili upon cell contact triggers *N. meningitidis* dissemination. *Science* **331**: 778-782.
- Chamot-Rooke, J., B. Rousseau, F. Lanternier, G. Mikaty, E. Mairey, C. Malosse, G. Bouchoux, V. Pelicic, L. Camoin, X. Nassif & G. Dumenil, (2007) Alternative *Neisseria* spp. type IV pilin glycosylation with a glyceramido acetamido trideoxyhexose residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 14783-14788.
- Chapman, M.R., L.S. Robinson, J.S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, M. Hammar, S. Normark & S.J. Hultgren, (2002) Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* **295**: 851-855.
- Chaussee, M.S. & S.A. Hill, (1998) Formation of single-stranded DNA during DNA transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* **180**: 5117-5122.
- Chen, I. & E.C. Gotschlich, (2001) ComE, a competence protein from *Neisseria gonorrhoeae* with DNA-binding activity. *J Bacteriol* **183**: 3160-3168.
- Chen, I., R. Provedel & D. Dubnau, (2006) A macromolecular complex formed by a pilin-like protein in competent *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **281**: 21720-21727.
- Chiang, P., M. Habash & L.L. Burrows, (2005) Disparate subcellular localization patterns of *Pseudomonas aeruginosa* Type IV pilus ATPases involved in twitching motility. *J Bacteriol* **187**: 829-839.
- Chiang, P., L.M. Sampaleanu, M. Ayers, M. Pahuta, P.L. Howell & L.L. Burrows, (2008) Functional role of conserved residues in the characteristic secretion NTPase motifs of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus motor proteins PilB, PilT and PilU. *Microbiology* **154**: 114-126.
- Chiang, S.L., R.K. Taylor, M. Koomey & J.J. Mekalanos, (1995) Single amino acid substitutions in the N-terminus of *Vibrio cholerae* TcpA affect colonization, autoagglutination, and serum resistance. *Mol Microbiol* **17**: 1133-1142.
- Chung, Y.S., F. Breidt & D. Dubnau, (1998) Cell surface localization and processing of the ComG proteins, required for DNA binding during transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **29**: 905-913.
- Chung, Y.S. & D. Dubnau, (1998) All seven comG open reading frames are required for DNA binding during transformation of competent *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **180**: 41-45.
- Cisneros, D.A., P.J. Bond, A.P. Pugsley, M. Campos & O. Francetic, (2012a) Minor pseudopilin self-assembly primes type II secretion pseudopilus elongation. *EMBO J* **31**: 1041-1053.

- Cisneros, D.A., G. Pehau-Arnaudet & O. Francetic, (2012b) Heterologous assembly of type IV pili by a type II secretion system reveals the role of minor pilins in assembly initiation. *Mol Microbiol* **86**: 805-818.
- Clavijo, A.P., J. Bai & O.G. Gomez-Duarte, (2010) The Longus type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) mediates bacterial self-aggregation and protection from antimicrobial agents. *Microb Pathog* **48**: 230-238.
- Collins, R.F., L. Davidsen, J.P. Derrick, R.C. Ford & T. Tonjum, (2001) Analysis of the PilQ secretin from *Neisseria meningitidis* by transmission electron microscopy reveals a dodecameric quaternary structure. *J Bacteriol* **183**: 3825-3832.
- Collins, R.F., R.C. Ford, A. Kitmitto, R.O. Olsen, T. Tonjum & J.P. Derrick, (2003) Three-dimensional structure of the *Neisseria meningitidis* secretin PilQ determined from negative-stain transmission electron microscopy. *J Bacteriol* **185**: 2611-2617.
- Collins, R.F., S.A. Frye, S. Balasingham, R.C. Ford, T. Tonjum & J.P. Derrick, (2005) Interaction with type IV pili induces structural changes in the bacterial outer membrane secretin PilQ. *J Biol Chem* **280**: 18923-18930.
- Collins, R.F., M. Saleem & J.P. Derrick, (2007) Purification and three-dimensional electron microscopy structure of the *Neisseria meningitidis* type IV pilus biogenesis protein PilG. *J Bacteriol* **189**: 6389-6396.
- Comolli, J.C., A.R. Hauser, L. Waite, C.B. Whitchurch, J.S. Mattick & J.N. Engel, (1999) *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect Immun* **67**: 3625-3630.
- Coureuil, M., H. Lecuyer, M.G. Scott, C. Boullaran, H. Enslin, M. Soyer, G. Mikaty, S. Bourdoulous, X. Nassif & S. Marullo, (2010) Meningococcus Hijacks a beta2-adrenoceptor/beta-Arrestin pathway to cross brain microvasculature endothelium. *Cell* **143**: 1149-1160.
- Coureuil, M., G. Mikaty, F. Miller, H. Lecuyer, C. Bernard, S. Bourdoulous, G. Dumenil, R.M. Mege, B.B. Weksler, I.A. Romero, P.O. Couraud & X. Nassif, (2009) Meningococcal type IV pili recruit the polarity complex to cross the brain endothelium. *Science* **325**: 83-87.
- Craig, L., M.E. Pique & J.A. Tainer, (2004) Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **2**: 363-378.
- Craig, L., R.K. Taylor, M.E. Pique, B.D. Adair, A.S. Arvai, M. Singh, S.J. Lloyd, D.S. Shin, E.D. Getzoff, M. Yeager, K.T. Forest & J.A. Tainer, (2003) Type IV pilin structure and assembly: X-ray and EM analyses of *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus and *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin. *Mol Cell* **11**: 1139-1150.
- Craig, L., N. Volkman, A.S. Arvai, M.E. Pique, M. Yeager, E.H. Egelman & J.A. Tainer, (2006) Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions. *Mol Cell* **23**: 651-662.
- Crowther, L.J., A. Yamagata, L. Craig, J.A. Tainer & M.S. Donnenberg, (2005) The ATPase activity of BfpD is greatly enhanced by zinc and allosteric interactions with other Bfp proteins. *J Biol Chem* **280**: 24839-24848.
- Davidsen, T., E.A. Rodland, K. Lagesen, E. Seeberg, T. Rognes & T. Tonjum, (2004) Biased distribution of DNA uptake sequences towards genome maintenance genes. *Nucleic Acids Res* **32**: 1050-1058.
- Davidsen, T. & T. Tonjum, (2006) Meningococcal genome dynamics. *Nat Rev Microbiol* **4**: 11-22.
- Davies, A.L., D. O'Flanagan, R.L. Salmon & T.J. Coleman, (1996) Risk factors for *Neisseria meningitidis* carriage in a school during a community outbreak of meningococcal infection. *Epidemiol Infect* **117**: 259-266.
- Day, R.N. & M.W. Davidson, (2009) The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem Soc Rev* **38**: 2887-2921.
- de Bentzmann, S., M. Aurouze, G. Ball & A. Filloux, (2006) FppA, a novel *Pseudomonas aeruginosa* prepilin peptidase involved in assembly of type IVb pili. *J Bacteriol* **188**: 4851-4860.
- DeVoe, I.W. & J.E. Gilchrist, (1975) Pili on meningococci from primary cultures of nasopharyngeal carriers and cerebrospinal fluid of patients with acute disease. *J Exp Med* **141**: 297-305.

- Donnenberg, M.S., J.A. Giron, J.P. Nataro & J.B. Kaper, (1992) A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol Microbiol* **6**: 3427-3437.
- Doulet, N., E. Donnadieu, M.P. Laran-Chich, F. Niedergang, X. Nassif, P.O. Couraud & S. Bourdoulous, (2006) *Neisseria meningitidis* infection of human endothelial cells interferes with leukocyte transmigration by preventing the formation of endothelial docking structures. *J Cell Biol* **173**: 627-637.
- Douzi, B., E. Durand, C. Bernard, S. Alphonse, C. Cambillau, A. Filloux, M. Tegoni & R. Voulhoux, (2009) The XcpV/GspI pseudopilin has a central role in the assembly of a quaternary complex within the T2SS pseudopilus. *J Biol Chem* **284**: 34580-34589.
- Drake, S.L. & M. Koomey, (1995) The product of the pilQ gene is essential for the biogenesis of type IV pili in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* **18**: 975-986.
- Drake, S.L., S.A. Sandstedt & M. Koomey, (1997) PilP, a pilus biogenesis lipoprotein in *Neisseria gonorrhoeae*, affects expression of PilQ as a high-molecular-mass multimer. *Mol Microbiol* **23**: 657-668.
- Dupin, N., H. Lecuyer, A. Carlotti, C. Poyart, M. Coureuil, J. Chanal, A. Schmitt, M.C. Vacher-Lavenu, M.K. Taha, X. Nassif & P.C. Morand, (2012) Chronic meningococemia cutaneous lesions involve meningococcal perivascular invasion through the remodeling of endothelial barriers. *Clin Infect Dis* **54**: 1162-1165.
- Durand, E., A. Bernadac, G. Ball, A. Lazdunski, J.N. Sturgis & A. Filloux, (2003) Type II protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the pseudopilus is a multifibrillar and adhesive structure. *J Bacteriol* **185**: 2749-2758.
- Ellen, A.F., B. Zolghadr, A.M. Driessen & S.V. Albers, (2010) Shaping the archaeal cell envelope. *Archaea* **2010**: 608243.
- Epstein, E.A. & M.R. Chapman, (2008) Polymerizing the fibre between bacteria and host cells: the biogenesis of functional amyloid fibres. *Cell Microbiol* **10**: 1413-1420.
- Eriksson, J., O.S. Eriksson & A.B. Jonsson, (2012) Loss of meningococcal PilU delays microcolony formation and attenuates virulence in vivo. *Infect Immun* **80**: 2538-2547.
- Eugene, E., I. Hoffmann, C. Pujol, P.O. Couraud, S. Bourdoulous & X. Nassif, (2002) Microvilli-like structures are associated with the internalization of virulent capsulated *Neisseria meningitidis* into vascular endothelial cells. *J Cell Sci* **115**: 1231-1241.
- Faast, R., M.A. Ogierman, U.H. Stroehrer & P.A. Manning, (1989) Nucleotide sequence of the structural gene, tcpA, for a major pilin subunit of *Vibrio cholerae*. *Gene* **85**: 227-231.
- Faust, S.N., M. Levin, O.B. Harrison, R.D. Goldin, M.S. Lockhart, S. Kondaveeti, Z. Laszik, C.T. Esmon & R.S. Heyderman, (2001) Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N Engl J Med* **345**: 408-416.
- Forest, K.T., (2008) The type II secretion arrowhead: the structure of GspI-GspJ-GspK. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 428-430.
- Forest, K.T., S.L. Bernstein, E.D. Getzoff, M. So, G. Tribbick, H.M. Geysen, C.D. Deal & J.A. Tainer, (1996) Assembly and antigenicity of the *Neisseria gonorrhoeae* pilus mapped with antibodies. *Infect Immun* **64**: 644-652.
- Forest, K.T., S.A. Dunham, M. Koomey & J.A. Tainer, (1999) Crystallographic structure reveals phosphorylated pilin from *Neisseria*: phosphoserine sites modify type IV pilus surface chemistry and fibre morphology. *Mol Microbiol* **31**: 743-752.
- Forest, K.T., K.A. Satyshur, G.A. Worzalla, J.K. Hansen & T.J. Herdendorf, (2004) The pilus-retraction protein PilT: ultrastructure of the biological assembly. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 978-982.
- Forest, K.T. & J.A. Tainer, (1997) Type-4 pilus-structure: outside to inside and top to bottom--a minireview. *Gene* **192**: 165-169.
- Forsberg, A. & T. Guina, (2007) Type II secretion and type IV pili of *Francisella*. *Ann N Y Acad Sci* **1105**: 187-201.

- Francetic, O., N. Buddelmeijer, S. Lewenza, C.A. Kumamoto & A.P. Pugsley, (2007) Signal recognition particle-dependent inner membrane targeting of the PulG Pseudopilin component of a type II secretion system. *J Bacteriol* **189**: 1783-1793.
- Freitag, N.E., H.S. Seifert & M. Koomey, (1995) Characterization of the pilF-pilD pilus-assembly locus of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* **16**: 575-586.
- Frols, S., M. Ajon, M. Wagner, D. Teichmann, B. Zolghadr, M. Folea, E.J. Boekema, A.J. Driessen, C. Schleper & S.V. Albers, (2008) UV-inducible cellular aggregation of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by pili formation. *Mol Microbiol* **70**: 938-952.
- Frols, S., P.M. Gordon, M.A. Panlilio, I.G. Duggin, S.D. Bell, C.W. Sensen & C. Schleper, (2007) Response of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* to UV damage. *J Bacteriol* **189**: 8708-8718.
- Fronzes, R., H. Remaut & G. Waksman, (2008) Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *EMBO J* **27**: 2271-2280.
- Geoffroy, M.C., S. Floquet, A. Metais, X. Nassif & V. Pelicic, (2003) Large-scale analysis of the meningococcus genome by gene disruption: resistance to complement-mediated lysis. *Genome Res* **13**: 391-398.
- Georgiadou, M., M. Castagnini, G. Karimova, D. Ladant & V. Pelicic, (2012) Large-scale study of the interactions between proteins involved in type IV pilus biology in *Neisseria meningitidis*: characterization of a subcomplex involved in pilus assembly. *Mol Microbiol* **84**: 857-873.
- Giltner, C.L., M. Habash & L.L. Burrows, (2010) *Pseudomonas aeruginosa* minor pilins are incorporated into type IV pili. *J Mol Biol* **398**: 444-461.
- Giltner, C.L., Y. Nguyen & L.L. Burrows, (2012) Type IV pilin proteins: versatile molecular modules. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**: 740-772.
- Girardin, E., G.E. Grau, J.M. Dayer, P. Roux-Lombard & P.H. Lambert, (1988) Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the serum of children with severe infectious purpura. *N Engl J Med* **319**: 397-400.
- Giron, J.A., O.G. Gomez-Duarte, K.G. Jarvis & J.B. Kaper, (1997) Longus pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli* and its relatedness to other type-4 pili--a minireview. *Gene* **192**: 39-43.
- Giron, J.A., A.S. Ho & G.K. Schoolnik, (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**: 710-713.
- Giron, J.A., M.M. Levine & J.B. Kaper, (1994) Longus: a long pilus ultrastructure produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **12**: 71-82.
- Griffiss, J.M. & M.S. Artenstein, (1976) The ecology of the genus *Neisseria*. *Mt Sinai J Med* **43**: 746-761.
- Guarner, J., P.W. Greer, A. Whitney, W.J. Shieh, M. Fischer, E.H. White, G.M. Carlone, D.S. Stephens, T. Popovic & S.R. Zaki, (2004) Pathogenesis and diagnosis of human meningococcal disease using immunohistochemical and PCR assays. *Am J Clin Pathol* **122**: 754-764.
- Guzzo, C.R., R.K. Salinas, M.O. Andrade & C.S. Farah, (2009) PILZ protein structure and interactions with PILB and the FIMX EAL domain: implications for control of type IV pilus biogenesis. *J Mol Biol* **393**: 848-866.
- Haas, R. & T.F. Meyer, (1986) The repertoire of silent pilus genes in *Neisseria gonorrhoeae*: evidence for gene conversion. *Cell* **44**: 107-115.
- Haghi, F., S.N. Peerayeh, S.D. Siadat & H. Zeighami, (2012) Recombinant outer membrane secretin PilQ(406-770) as a vaccine candidate for serogroup B *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* **30**: 1710-1714.
- Hakkarainen, J., M. Toivanen, A. Leinonen, L. Frangsmyr, N. Stromberg, S. Lapinjoki, X. Nassif & C. Tikkanen-Kaukanen, (2005) Human and bovine milk oligosaccharides inhibit *Neisseria meningitidis* pili attachment in vitro. *J Nutr* **135**: 2445-2448.
- Hamilton, H.L. & J.P. Dillard, (2006) Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. *Mol Microbiol* **59**: 376-385.
- Hammar, M., Z. Bian & S. Normark, (1996) Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6562-6566.

- Hansen, J.K. & K.T. Forest, (2006) Type IV pilin structures: insights on shared architecture, fiber assembly, receptor binding and type II secretion. *J Mol Microbiol Biotechnol* **11**: 192-207.
- Hardy, S.J., M. Christodoulides, R.O. Weller & J.E. Heckels, (2000) Interactions of *Neisseria meningitidis* with cells of the human meninges. *Mol Microbiol* **36**: 817-829.
- Harrison, O.B., B.D. Robertson, S.N. Faust, M.A. Jepson, R.D. Goldin, M. Levin & R.S. Heyderman, (2002) Analysis of pathogen-host cell interactions in purpura fulminans: expression of capsule, type IV pili, and PorA by *Neisseria meningitidis* in vivo. *Infect Immun* **70**: 5193-5201.
- Hazes, B., P.A. Sastry, K. Hayakawa, R.J. Read & R.T. Irvin, (2000) Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin suggests a main-chain-dominated mode of receptor binding. *J Mol Biol* **299**: 1005-1017.
- Hegge, F.T., P.G. Hitchen, F.E. Aas, H. Kristiansen, C. Lovold, W. Egge-Jacobsen, M. Panico, W.Y. Leong, V. Bull, M. Virji, H.R. Morris, A. Dell & M. Koomey, (2004) Unique modifications with phosphocholine and phosphoethanolamine define alternate antigenic forms of *Neisseria gonorrhoeae* type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10798-10803.
- Helaine, S., E. Carbonnelle, L. Prouvensier, J.L. Beretti, X. Nassif & V. Pelicic, (2005) PilX, a pilus-associated protein essential for bacterial aggregation, is a key to pilus-facilitated attachment of *Neisseria meningitidis* to human cells. *Mol Microbiol* **55**: 65-77.
- Helaine, S., D.H. Dyer, X. Nassif, V. Pelicic & K.T. Forest, (2007) 3D structure/function analysis of PilX reveals how minor pilins can modulate the virulence properties of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 15888-15893.
- Helm, R.A., M.M. Barnhart & H.S. Seifert, (2007) pilQ Missense mutations have diverse effects on PilQ multimer formation, piliation, and pilus function in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* **189**: 3198-3207.
- Henche, A.L., A. Ghosh, X. Yu, T. Jeske, E. Egelman & S.V. Albers, (2012) Structure and function of the adhesive type IV pilus of *Sulfolobus acidocaldarius*. *Environ Microbiol* **14**: 3188-3202.
- Henrichsen, J., (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* **36**: 478-503.
- Henriksen, S.D. & J. Henriksen, (1975) Twitching motility and possession of polar fimbriae in spreading *Streptococcus sanguis* isolates from the human throat. *Acta Pathol Microbiol Scand B* **83**: 133-140.
- Herdendorf, T.J., D.R. McCaslin & K.T. Forest, (2002) Aquifex aeolicus PilT, homologue of a surface motility protein, is a thermostable oligomeric NTPase. *J Bacteriol* **184**: 6465-6471.
- Higashi, D.L., S.W. Lee, A. Snyder, N.J. Weyand, A. Bakke & M. So, (2007) Dynamics of *Neisseria gonorrhoeae* attachment: microcolony development, cortical plaque formation, and cytoprotection. *Infect Immun* **75**: 4743-4753.
- Higashi, D.L., G.H. Zhang, N. Biais, L.R. Myers, N.J. Weyand, D.A. Elliott & M. So, (2009) Influence of type IV pilus retraction on the architecture of the *Neisseria gonorrhoeae*-infected cell cortex. *Microbiology* **155**: 4084-4092.
- Hill, W.R. & T.D. Kinney, (1947) The cutaneous lesions in acute meningococemia; a clinical and pathologic study. *J Am Med Assoc* **134**: 513-518.
- Hobbs, M. & J.S. Mattick, (1993) Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. *Mol Microbiol* **10**: 233-243.
- Hoffmann, I., E. Eugene, X. Nassif, P.O. Couraud & S. Bourdoulous, (2001) Activation of ErbB2 receptor tyrosine kinase supports invasion of endothelial cells by *Neisseria meningitidis*. *J Cell Biol* **155**: 133-143.
- Hubert, B., L. Watier, P. Garnerin & S. Richardson, (1992) Meningococcal disease and influenza-like syndrome: a new approach to an old question. *J Infect Dis* **166**: 542-545.
- Humphries, R.M., M.S. Donnenberg, J. Strecker, E. Kitova, J.S. Klassen, L. Cui, T.P. Griener, G.L. Mulvey & G.D. Armstrong, (2009) From alpha to beta: identification of amino acids required for the N-acetyllactosamine-specific lectin-like activity of bundlin. *Mol Microbiol* **72**: 859-868.

- Hyland, R.M., J. Sun, T.P. Griener, G.L. Mulvey, J.S. Klassen, M.S. Donnenberg & G.D. Armstrong, (2008) The bundlin pilin protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is an N-acetyllactosamine-specific lectin. *Cell Microbiol* **10**: 177-187.
- Jain, S., K.B. Moscicka, M.P. Bos, E. Pachulec, M.C. Stuart, W. Keegstra, E.J. Boekema & C. van der Does, (2011) Structural characterization of outer membrane components of the type IV pili system in pathogenic *Neisseria*. *PLoS One* **6**: e16624.
- Jakovljevic, V., S. Leonardy, M. Hoppert & L. Sogaard-Andersen, (2008) PilB and PilT are ATPases acting antagonistically in type IV pilus function in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **190**: 2411-2421.
- Johansson, L., A. Rytönen, P. Bergman, B. Albiger, H. Kallstrom, T. Hokfelt, B. Agerberth, R. Cattaneo & A.B. Jonsson, (2003) CD46 in meningococcal disease. *Science* **301**: 373-375.
- Jonsson, A.B., G. Nyberg & S. Normark, (1991) Phase variation of gonococcal pili by frameshift mutation in pilC, a novel gene for pilus assembly. *EMBO J* **10**: 477-488.
- Jonsson, A.B., M. Rahman & S. Normark, (1995) Pilus biogenesis gene, pilC, of *Neisseria gonorrhoeae*: pilC1 and pilC2 are each part of a larger duplication of the gonococcal genome and share upstream and downstream homologous sequences with opa and pil loci. *Microbiology* **141** (Pt 10): 2367-2377.
- Jude, B.A. & R.K. Taylor, (2011) The physical basis of type 4 pilus-mediated microcolony formation by *Vibrio cholerae* O1. *J Struct Biol* **175**: 1-9.
- Kallstrom, H., D. Blackmer Gill, B. Albiger, M.K. Liszewski, J.P. Atkinson & A.B. Jonsson, (2001) Attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to the cellular pilus receptor CD46: identification of domains important for bacterial adherence. *Cell Microbiol* **3**: 133-143.
- Kallstrom, H., M.K. Liszewski, J.P. Atkinson & A.B. Jonsson, (1997) Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* **25**: 639-647.
- Karuppiah, V. & J.P. Derrick, (2011) Structure of the PilM-PilN inner membrane type IV pilus biogenesis complex from *Thermus thermophilus*. *J Biol Chem* **286**: 24434-24442.
- Ke, S.H. & E.L. Madison, (1997) Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube 'megaprimer' PCR method. *Nucleic Acids Res* **25**: 3371-3372.
- Keizer, D.W., C.M. Slupsky, M. Kalisiak, A.P. Campbell, M.P. Crump, P.A. Sastry, B. Hazes, R.T. Irvin & B.D. Sykes, (2001) Structure of a pilin monomer from *Pseudomonas aeruginosa*: implications for the assembly of pili. *J Biol Chem* **276**: 24186-24193.
- Kellogg, D.S., Jr., I.R. Cohen, L.C. Norins, A.L. Schroeter & G. Reising, (1968) *Neisseria gonorrhoeae*. II. Colonial variation and pathogenicity during 35 months in vitro. *J Bacteriol* **96**: 596-605.
- Kennan, R.M., O.P. Dhungyel, R.J. Whittington, J.R. Egerton & J.I. Rood, (2001) The type IV fimbrial subunit gene (fimA) of *Dichelobacter nodosus* is essential for virulence, protease secretion, and natural competence. *J Bacteriol* **183**: 4451-4458.
- Kim, K., J. Oh, D. Han, E.E. Kim, B. Lee & Y. Kim, (2006) Crystal structure of PilF: functional implication in the type 4 pilus biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* **340**: 1028-1038.
- Kirchner, M., D. Heuer & T.F. Meyer, (2005) CD46-independent binding of neisserial type IV pili and the major pilus adhesin, PilC, to human epithelial cells. *Infect Immun* **73**: 3072-3082.
- Kirn, T.J., N. Bose & R.K. Taylor, (2003) Secretion of a soluble colonization factor by the TCP type 4 pilus biogenesis pathway in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **49**: 81-92.
- Kirn, T.J., M.J. Lafferty, C.M. Sandoe & R.K. Taylor, (2000) Delineation of pilin domains required for bacterial association into microcolonies and intestinal colonization by *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **35**: 896-910.
- Knight, S.D., J. Berglund & D. Choudhury, (2000) Bacterial adhesins: structural studies reveal chaperone function and pilus biogenesis. *Curr Opin Chem Biol* **4**: 653-660.
- Koomey, M., (2001) Implications of molecular contacts and signaling initiated by *Neisseria gonorrhoeae*. *Curr Opin Microbiol* **4**: 53-57.

- Koomey, M., E.C. Gotschlich, K. Robbins, S. Bergstrom & J. Swanson, (1987) Effects of recA mutations on pilus antigenic variation and phase transitions in *Neisseria gonorrhoeae*. *Genetics* **117**: 391-398.
- Korotkov, K.V., M.D. Gray, A. Kreger, S. Turley, M. Sandkvist & W.G. Hol, (2009a) Calcium is essential for the major pseudopilin in the type 2 secretion system. *J Biol Chem* **284**: 25466-25470.
- Korotkov, K.V. & W.G. Hol, (2008) Structure of the GspK-GspI-GspJ complex from the enterotoxigenic *Escherichia coli* type 2 secretion system. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 462-468.
- Korotkov, K.V., E. Pardon, J. Steyaert & W.G. Hol, (2009b) Crystal structure of the N-terminal domain of the secretin GspD from ETEC determined with the assistance of a nanobody. *Structure* **17**: 255-265.
- Krivan, H.C., V. Ginsburg & D.D. Roberts, (1988) *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* isolated from cystic fibrosis patients bind specifically to gangliotetraosylceramide (asialo GM1) and gangliotriaosylceramide (asialo GM2). *Arch Biochem Biophys* **260**: 493-496.
- Kuchma, S.L., E.F. Griffin & G.A. O'Toole, (2012) Minor pilins of the type IV pilus system participate in the negative regulation of swarming motility. *J Bacteriol* **194**: 5388-5403.
- Kuo, W.W., H.W. Kuo, C.C. Cheng, H.L. Lai & L.Y. Chen, (2005) Roles of the minor pseudopilins, XpsH, XpsI and XpsJ, in the formation of XpsG-containing pseudopilus in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Biomed Sci* **12**: 587-599.
- Kurre, R., A. Hone, M. Clausen, C. Meel & B. Maier, (2012) PilT2 enhances the speed of gonococcal type IV pilus retraction and of twitching motility. *Mol Microbiol* **86**: 857-865.
- Lambden, P.R., J.N. Robertson & P.J. Watt, (1980) Biological properties of two distinct pilus types produced by isogenic variants of *Neisseria gonorrhoeae* P9. *J Bacteriol* **141**: 393-396.
- Lambotin, M., I. Hoffmann, M.P. Laran-Chich, X. Nassif, P.O. Couraud & S. Bourdoulous, (2005) Invasion of endothelial cells by *Neisseria meningitidis* requires cortactin recruitment by a phosphoinositide-3-kinase/Rac1 signalling pathway triggered by the lipo-oligosaccharide. *J Cell Sci* **118**: 3805-3816.
- Lammel, C.J., R.L. Sweet, P.A. Rice, J.S. Knapp, G.K. Schoolnik, D.C. Heilbron & G.F. Brooks, (1985) Antibody-antigen specificity in the immune response to infection with *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Dis* **152**: 990-1001.
- Lee, K.K., H.B. Sheth, W.Y. Wong, R. Sherburne, W. Paranchych, R.S. Hodges, C.A. Lingwood, H. Krivan & R.T. Irvin, (1994) The binding of *Pseudomonas aeruginosa* pili to glycosphingolipids is a tip-associated event involving the C-terminal region of the structural pilin subunit. *Mol Microbiol* **11**: 705-713.
- Lee, S.W., D.L. Higashi, A. Snyder, A.J. Merz, L. Potter & M. So, (2005) PilT is required for PI(3,4,5)P₃-mediated crosstalk between *Neisseria gonorrhoeae* and epithelial cells. *Cell Microbiol* **7**: 1271-1284.
- Lewenza, S., D. Vidal-Ingigliardi & A.P. Pugsley, (2006) Direct visualization of red fluorescent lipoproteins indicates conservation of the membrane sorting rules in the family Enterobacteriaceae. *J Bacteriol* **188**: 3516-3524.
- Li, J., E.H. Egelman & L. Craig, (2012) Structure of the *Vibrio cholerae* Type IVb Pilus and stability comparison with the *Neisseria gonorrhoeae* type IVa pilus. *J Mol Biol* **418**: 47-64.
- Li, J., M.S. Lim, S. Li, M. Brock, M.E. Pique, V.L. Woods, Jr. & L. Craig, (2008) *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus structure analyzed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Structure* **16**: 137-148.
- Long, C.D., S.F. Hayes, J.P. van Putten, H.A. Harvey, M.A. Apicella & H.S. Seifert, (2001) Modulation of gonococcal piliation by regulatable transcription of pilE. *J Bacteriol* **183**: 1600-1609.
- Long, C.D., D.M. Tobiason, M.P. Lazio, K.A. Kline & H.S. Seifert, (2003) Low-level pilin expression allows for substantial DNA transformation competence in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **71**: 6279-6291.
- Lory, S. & M.S. Strom, (1997) Structure-function relationship of type-IV prepilin peptidase of *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Gene* **192**: 117-121.

- Lybarger, S.R., T.L. Johnson, M.D. Gray, A.E. Sikora & M. Sandkvist, (2009) Docking and assembly of the type II secretion complex of *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **191**: 3149-3161.
- Maier, B., I. Chen, D. Dubnau & M.P. Sheetz, (2004) DNA transport into *Bacillus subtilis* requires proton motive force to generate large molecular forces. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 643-649.
- Maier, B., L. Potter, M. So, C.D. Long, H.S. Seifert & M.P. Sheetz, (2002) Single pilus motor forces exceed 100 pN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16012-16017.
- Mairey, E., A. Genovesio, E. Donnadieu, C. Bernard, F. Jaubert, E. Pinard, J. Seylaz, J.C. Olivo-Marin, X. Nassif & G. Dumenil, (2006) Cerebral microcirculation shear stress levels determine *Neisseria meningitidis* attachment sites along the blood-brain barrier. *J Exp Med* **203**: 1939-1950.
- Mandlik, A., A. Swierczynski, A. Das & H. Ton-That, (2007) *Corynebacterium diphtheriae* employs specific minor pilins to target human pharyngeal epithelial cells. *Mol Microbiol* **64**: 111-124.
- Mandlik, A., A. Swierczynski, A. Das & H. Ton-That, (2008) Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol* **16**: 33-40.
- Marceau, M., J.L. Beretti & X. Nassif, (1995) High adhesiveness of encapsulated *Neisseria meningitidis* to epithelial cells is associated with the formation of bundles of pili. *Mol Microbiol* **17**: 855-863.
- Marceau, M. & X. Nassif, (1999) Role of glycosylation at Ser63 in production of soluble pilin in pathogenic *Neisseria*. *J Bacteriol* **181**: 656-661.
- Martinez, J.J., M.A. Mulvey, J.D. Schilling, J.S. Pinkner & S.J. Hultgren, (2000) Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J* **19**: 2803-2812.
- Mattick, J.S., (2002) Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **56**: 289-314.
- McNeil, G., M. Virji & E.R. Moxon, (1994) Interactions of *Neisseria meningitidis* with human monocytes. *Microb Pathog* **16**: 153-163.
- Mehr, I.J., C.D. Long, C.D. Serkin & H.S. Seifert, (2000) A homologue of the recombination-dependent growth gene, *rdgC*, is involved in gonococcal pilin antigenic variation. *Genetics* **154**: 523-532.
- Melican, K. & G. Dumenil, (2013) A humanized model of microvascular infection. *Future Microbiol* **8**: 567-569.
- Melican, K., P. Michea Veloso, T. Martin, P. Bruneval & G. Dumenil, (2013) Adhesion of *Neisseria meningitidis* to dermal vessels leads to local vascular damage and purpura in a humanized mouse model. *PLoS Pathog* **9**: e1003139.
- Merz, A.J., C.A. Enns & M. So, (1999) Type IV pili of pathogenic *Neisseriae* elicit cortical plaque formation in epithelial cells. *Mol Microbiol* **32**: 1316-1332.
- Merz, A.J. & M. So, (1997) Attachment of piliated, Opa- and Opc- gonococci and meningococci to epithelial cells elicits cortical actin rearrangements and clustering of tyrosine-phosphorylated proteins. *Infect Immun* **65**: 4341-4349.
- Merz, A.J., M. So & M.P. Sheetz, (2000) Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* **407**: 98-102.
- Mikaty, G., M. Soyer, E. Mairey, N. Henry, D. Dyer, K.T. Forest, P. Morand, S. Guadagnini, M.C. Prevost, X. Nassif & G. Dumenil, (2009) Extracellular bacterial pathogen induces host cell surface reorganization to resist shear stress. *PLoS Pathog* **5**: e1000314.
- Misic, A.M., K.A. Satyshur & K.T. Forest, (2010) *P. aeruginosa* PiliT structures with and without nucleotide reveal a dynamic type IV pilus retraction motor. *J Mol Biol* **400**: 1011-1021.
- Morand, P.C., M. Drab, K. Rajalingam, X. Nassif & T.F. Meyer, (2009) *Neisseria meningitidis* differentially controls host cell motility through PilC1 and PilC2 components of type IV Pili. *PLoS One* **4**: e6834.
- Morand, P.C., P. Tattevin, E. Eugene, J.L. Beretti & X. Nassif, (2001) The adhesive property of the type IV pilus-associated component PilC1 of pathogenic *Neisseria* is supported by the conformational structure of the N-terminal part of the molecule. *Mol Microbiol* **40**: 846-856.
- Morelle, S., E. Carbonnelle & X. Nassif, (2003) The REP2 repeats of the genome of *Neisseria meningitidis* are associated with genes coordinately regulated during bacterial cell interaction. *J Bacteriol* **185**: 2618-2627.

- Mulvey, M.A., Y.S. Lopez-Boado, C.L. Wilson, R. Roth, W.C. Parks, J. Heuser & S.J. Hultgren, (1998) Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **282**: 1494-1497.
- Murray, R.L., J. Britton & J. Leonardi-Bee, (2012) Second hand smoke exposure and the risk of invasive meningococcal disease in children: systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* **12**: 1062.
- Nassif, X., J.L. Beretti, J. Lowy, P. Stenberg, P. O'Gaora, J. Pfeifer, S. Normark & M. So, (1994) Roles of pilin and PilC in adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 3769-3773.
- Nassif, X., S. Bourdoulous, E. Eugene & P.O. Couraud, (2002) How do extracellular pathogens cross the blood-brain barrier? *Trends Microbiol* **10**: 227-232.
- Nassif, X., J. Lowy, P. Stenberg, P. O'Gaora, A. Ganji & M. So, (1993) Antigenic variation of pilin regulates adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells. *Mol Microbiol* **8**: 719-725.
- Nassif, X., M. Marceau, C. Pujol, B. Pron, J.L. Beretti & M.K. Taha, (1997) Type-4 pili and meningococcal adhesiveness. *Gene* **192**: 149-153.
- Navarre, W.W. & O. Schneewind, (1994) Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **14**: 115-121.
- Neal, K.R., J.S. Nguyen-Van-Tam, N. Jeffrey, R.C. Slack, R.J. Madeley, K. Ait-Tahar, K. Job, M.C. Wale & D.A. Ala'Aldeen, (2000) Changing carriage rate of *Neisseria meningitidis* among university students during the first week of term: cross sectional study. *BMJ* **320**: 846-849.
- Nelson, R., M.R. Sawaya, M. Balbirnie, A.O. Madsen, C. Riek, R. Grothe & D. Eisenberg, (2005) Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* **435**: 773-778.
- Newhall, W.J., C.E. Wilde, 3rd, W.D. Sawyer & R.A. Haak, (1980) High-molecular-weight antigenic protein complex in the outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **27**: 475-482.
- Ng, S.Y., B. Zolghadr, A.J. Driessen, S.V. Albers & K.F. Jarrell, (2008) Cell surface structures of archaea. *J Bacteriol* **190**: 6039-6047.
- Niggli, V. & J. Rossy, (2008) Ezrin/radixin/moesin: versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton. *Int J Biochem Cell Biol* **40**: 344-349.
- Nouwen, N., N. Ranson, H. Saibil, B. Wolpensinger, A. Engel, A. Ghazi & A.P. Pugsley, (1999) Secretin PulD: association with pilot PulS, structure, and ion-conducting channel formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8173-8177.
- Nudleman, E. & D. Kaiser, (2004) Pulling together with type IV pili. *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**: 52-62.
- Nunn, D.N. & S. Lory, (1991) Product of the *Pseudomonas aeruginosa* gene pilD is a prepilin leader peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 3281-3285.
- Nunn, D.N. & S. Lory, (1992) Components of the protein-excretion apparatus of *Pseudomonas aeruginosa* are processed by the type IV prepilin peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 47-51.
- O'Toole, G.A. & R. Kolter, (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**: 295-304.
- Ochman, H., J.G. Lawrence & E.A. Groisman, (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**: 299-304.
- Parent du Chatelet, I., M.K. Taha, C. Sesboue, P. Rouaud, A. Perrocheau & D. Levy-Bruhl, (2007) [Increased incidence of invasive meningococcal disease in Seine-Maritime. The evolving epidemiology due to the B:14:P1.7,16 strain]. *Arch Pediatr* **14**: 537-540.
- Parge, H.E., K.T. Forest, M.J. Hickey, D.A. Christensen, E.D. Getzoff & J.A. Tainer, (1995) Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution. *Nature* **378**: 32-38.
- Park, H.S., M. Wolfgang & M. Koomey, (2002) Modification of type IV pilus-associated epithelial cell adherence and multicellular behavior by the PilU protein of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **70**: 3891-3903.

- Park, H.S., M. Wolfgang, J.P. van Putten, D. Dorward, S.F. Hayes & M. Koomey, (2001) Structural alterations in a type IV pilus subunit protein result in concurrent defects in multicellular behaviour and adherence to host tissue. *Mol Microbiol* **42**: 293-307.
- Peabody, C.R., Y.J. Chung, M.R. Yen, D. Vidal-Ingigliardi, A.P. Pugsley & M.H. Saier, Jr., (2003) Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology* **149**: 3051-3072.
- Pelicic, V., (2008) Type IV pili: e pluribus unum? *Mol Microbiol* **68**: 827-837.
- Pepe, J.C. & S. Lory, (1998) Amino acid substitutions in PilD, a bifunctional enzyme of *Pseudomonas aeruginosa*. Effect on leader peptidase and N-methyltransferase activities in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **273**: 19120-19129.
- Planet, P.J., S.C. Kachlany, R. DeSalle & D.H. Figurski, (2001) 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* **98**: 2503-2508.
- Poolman, J.T., C.T. Hopman & H.C. Zanen, (1983) Immunogenicity of meningococcal antigens as detected in patient sera. *Infect Immun* **40**: 398-406.
- Power, P.M., L.F. Roddam, K. Rutter, S.Z. Fitzpatrick, Y.N. Srikhanta & M.P. Jennings, (2003) Genetic characterization of pilin glycosylation and phase variation in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **49**: 833-847.
- Pron, B., M.K. Taha, C. Rambaud, J.C. Fournet, N. Pattey, J.P. Monnet, M. Musilek, J.L. Beretti & X. Nassif, (1997) Interaction of *Neisseria meningitidis* with the components of the blood-brain barrier correlates with an increased expression of PilC. *J Infect Dis* **176**: 1285-1292.
- Pugsley, A.P., (1992) Translocation of a folded protein across the outer membrane in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 12058-12062.
- Pugsley, A.P., (1996) Multimers of the precursor of a type IV pilin-like component of the general secretory pathway are unrelated to pili. *Mol Microbiol* **20**: 1235-1245.
- Pugsley, A.P. & B. Dupuy, (1992) An enzyme with type IV prepilin peptidase activity is required to process components of the general extracellular protein secretion pathway of *Klebsiella oxytoca*. *Mol Microbiol* **6**: 751-760.
- Pujol, C., E. Eugene, L. de Saint Martin & X. Nassif, (1997) Interaction of *Neisseria meningitidis* with a polarized monolayer of epithelial cells. *Infect Immun* **65**: 4836-4842.
- Pujol, C., E. Eugene, M. Marceau & X. Nassif, (1999) The meningococcal PilT protein is required for induction of intimate attachment to epithelial cells following pilus-mediated adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4017-4022.
- Rahman, M., H. Kallstrom, S. Normark & A.B. Jonsson, (1997) PilC of pathogenic *Neisseria* is associated with the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* **25**: 11-25.
- Reichow, S.L., K.V. Korotkov, W.G. Hol & T. Gonen, (2010) Structure of the cholera toxin secretion channel in its closed state. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 1226-1232.
- Robert, V., A. Filloux & G.P. Michel, (2005) Subcomplexes from the Xcp secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **252**: 43-50.
- Roberts, L., (2008) Infectious disease. An ill wind, bringing meningitis. *Science* **320**: 1710-1715.
- Robien, M.A., B.E. Krumm, M. Sandkvist & W.G. Hol, (2003) Crystal structure of the extracellular protein secretion NTPase EpsE of *Vibrio cholerae*. *J Mol Biol* **333**: 657-674.
- Robinson, L.S., E.M. Ashman, S.J. Hultgren & M.R. Chapman, (2006) Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein. *Mol Microbiol* **59**: 870-881.
- Rodgers, K., C.G. Arvidson & S. Melville, (2011) Expression of a *Clostridium perfringens* type IV pilin by *Neisseria gonorrhoeae* mediates adherence to muscle cells. *Infect Immun* **79**: 3096-3105.
- Rudel, T., I. Scheurerpflug & T.F. Meyer, (1995) *Neisseria* PilC protein identified as type-4 pilus tip-located adhesin. *Nature* **373**: 357-359.
- Russell, M.A. & A. Darzins, (1994) The pilE gene product of *Pseudomonas aeruginosa*, required for pilus biogenesis, shares amino acid sequence identity with the N-termini of type 4 prepilin proteins. *Mol Microbiol* **13**: 973-985.

- Sampaleanu, L.M., J.B. Bonanno, M. Ayers, J. Koo, S. Tammam, S.K. Burley, S.C. Almo, L.L. Burrows & P.L. Howell, (2009) Periplasmic domains of *Pseudomonas aeruginosa* PilN and PilO form a stable heterodimeric complex. *J Mol Biol* **394**: 143-159.
- Satyshur, K.A., G.A. Worzalla, L.S. Meyer, E.K. Heiniger, K.G. Aukema, A.M. Misic & K.T. Forest, (2007) Crystal structures of the pilus retraction motor PilT suggest large domain movements and subunit cooperation drive motility. *Structure* **15**: 363-376.
- Sauer, F.G., H. Remaut, S.J. Hultgren & G. Waksman, (2004) Fiber assembly by the chaperone-usher pathway. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 259-267.
- Saunders, N.J., A.C. Jeffries, J.F. Peden, D.W. Hood, H. Tettelin, R. Rappuoli & E.R. Moxon, (2000) Repeat-associated phase variable genes in the complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* strain MC58. *Mol Microbiol* **37**: 207-215.
- Sauvonnnet, N., P. Gounon & A.P. Pugsley, (2000) PpdD type IV pilin of *Escherichia coli* K-12 can be assembled into pili in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**: 848-854.
- Shaw, C.E. & R.K. Taylor, (1990) *Vibrio cholerae* O395 tcpA pilin gene sequence and comparison of predicted protein structural features to those of type 4 pilins. *Infect Immun* **58**: 3042-3049.
- Shevchik, V.E., J. Robert-Baudouy & G. Condemine, (1997) Specific interaction between OutD, an *Erwinia chrysanthemi* outer membrane protein of the general secretory pathway, and secreted proteins. *EMBO J* **16**: 3007-3016.
- Sim, R.J., M.M. Harrison, E.R. Moxon & C.M. Tang, (2000) Underestimation of meningococci in tonsillar tissue by nasopharyngeal swabbing. *Lancet* **356**: 1653-1654.
- Singh, P.K., A.L. Schaefer, M.R. Parsek, T.O. Moninger, M.J. Welsh & E.P. Greenberg, (2000) Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* **407**: 762-764.
- Skerker, J.M. & H.C. Berg, (2001) Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6901-6904.
- Sotto, M.N., B. Langer, S. Hoshino-Shimizu & T. de Brito, (1976) Pathogenesis of cutaneous lesions in acute meningococemia in humans: light, immunofluorescent, and electron microscopic studies of skin biopsy specimens. *J Infect Dis* **133**: 506-514.
- Stephens, D.S., (2007) Conquering the meningococcus. *FEMS Microbiol Rev* **31**: 3-14.
- Stephens, D.S., K.M. Edwards, F. Morris & Z.A. McGee, (1982) Pili and outer membrane appendages on *Neisseria meningitidis* in the cerebrospinal fluid of an infant. *J Infect Dis* **146**: 568.
- Stephens, D.S., L.H. Hoffman & Z.A. McGee, (1983) Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. *J Infect Dis* **148**: 369-376.
- Stephens, D.S., P.A. Spellman & J.S. Swartley, (1993) Effect of the (α 2 \rightarrow 8)-linked polysialic acid capsule on adherence of *Neisseria meningitidis* to human mucosal cells. *J Infect Dis* **167**: 475-479.
- Stimson, E., M. Virji, K. Makepeace, A. Dell, H.R. Morris, G. Payne, J.R. Saunders, M.P. Jennings, S. Barker, M. Panico & et al., (1995) Meningococcal pilin: a glycoprotein substituted with digalactosyl 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose. *Mol Microbiol* **17**: 1201-1214.
- Strom, M.S., P. Bergman & S. Lory, (1993a) Identification of active-site cysteines in the conserved domain of PilD, the bifunctional type IV pilin leader peptidase/N-methyltransferase of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **268**: 15788-15794.
- Strom, M.S. & S. Lory, (1991) Amino acid substitutions in pilin of *Pseudomonas aeruginosa*. Effect on leader peptide cleavage, amino-terminal methylation, and pilus assembly. *J Biol Chem* **266**: 1656-1664.
- Strom, M.S., D. Nunn & S. Lory, (1991) Multiple roles of the pilus biogenesis protein pilD: involvement of pilD in excretion of enzymes from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **173**: 1175-1180.
- Strom, M.S., D.N. Nunn & S. Lory, (1993b) A single bifunctional enzyme, PilD, catalyzes cleavage and N-methylation of proteins belonging to the type IV pilin family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 2404-2408.

- Sultan, B., K. Labadi, J.F. Guegan & S. Janicot, (2005) Climate drives the meningitis epidemics onset in west Africa. *PLoS Med* **2**: e6.
- Sun, D.X., J.J. Mekalanos & R.K. Taylor, (1990) Antibodies directed against the toxin-coregulated pilus isolated from *Vibrio cholerae* provide protection in the infant mouse experimental cholera model. *J Infect Dis* **161**: 1231-1236.
- Swanson, J., S. Bergstrom, K. Robbins, O. Barrera, D. Corwin & J.M. Koomey, (1986) Gene conversion involving the pilin structural gene correlates with pilus+ in equilibrium with pilus- changes in *Neisseria gonorrhoeae*. *Cell* **47**: 267-276.
- Szeto, T.H., A. Dessen & V. Pelicic, (2011) Structure/function analysis of *Neisseria meningitidis* PilW, a conserved protein that plays multiple roles in type IV pilus biology. *Infect Immun* **79**: 3028-3035.
- Takhar, H.K., K. Kemp, M. Kim, P.L. Howell & L.L. Burrows, (2013) The platform protein is essential for type IV pilus biogenesis. *J Biol Chem* **288**: 9721-9728.
- Tammam, S., L.M. Sampaleanu, J. Koo, P. Sundaram, M. Ayers, P.A. Chong, J.D. Forman-Kay, L.L. Burrows & P.L. Howell, (2011) Characterization of the PilN, PilO and PilP type IVa pilus subcomplex. *Mol Microbiol* **82**: 1496-1514.
- Taniguchi, T., Y. Fujino, K. Yamamoto, T. Miwatani & T. Honda, (1995) Sequencing of the gene encoding the major pilin of pilus colonization factor antigen III (CFA/III) of human enterotoxigenic *Escherichia coli* and evidence that CFA/III is related to type IV pili. *Infect Immun* **63**: 724-728.
- Taylor, R.K., V.L. Miller, D.B. Furlong & J.J. Mekalanos, (1987) Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 2833-2837.
- Telford, J.L., M.A. Barocchi, I. Margarit, R. Rappuoli & G. Grandi, (2006) Pili in gram-positive pathogens. *Nat Rev Microbiol* **4**: 509-519.
- Ton-That, H., L.A. Marraffini & O. Schneewind, (2004) Sortases and pilin elements involved in pilus assembly of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Microbiol* **53**: 251-261.
- Ton-That, H. & O. Schneewind, (2003) Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Microbiol* **50**: 1429-1438.
- Treangen, T.J., O.H. Ambur, T. Tonjum & E.P. Rocha, (2008) The impact of the neisserial DNA uptake sequences on genome evolution and stability. *Genome Biol* **9**: R60.
- Trindade, M.B., V. Job, C. Contreras-Martel, V. Pelicic & A. Dessen, (2008) Structure of a widely conserved type IV pilus biogenesis factor that affects the stability of secretin multimers. *J Mol Biol* **378**: 1031-1039.
- Tsui, I.S., C.M. Yip, J. Hackett & C. Morris, (2003) The type IVB pili of *Salmonella enterica* serovar Typhi bind to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Infect Immun* **71**: 6049-6050.
- Turner, L.R., J.C. Lara, D.N. Nunn & S. Lory, (1993) Mutations in the consensus ATP-binding sites of XcpR and PilB eliminate extracellular protein secretion and pilus biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **175**: 4962-4969.
- Vale, R.D., (2000) AAA proteins. Lords of the ring. *J Cell Biol* **150**: F13-19.
- van Deuren, M., J. van der Ven-Jongekrijg, A.K. Bartelink, R. van Dalen, R.W. Sauerwein & J.W. van der Meer, (1995) Correlation between proinflammatory cytokines and antiinflammatory mediators and the severity of disease in meningococcal infections. *J Infect Dis* **172**: 433-439.
- Van Gerven, N., G. Waksman & H. Remaut, (2011) Pili and flagella biology, structure, and biotechnological applications. *Prog Mol Biol Transl Sci* **103**: 21-72.
- Verger, D., E. Miller, H. Remaut, G. Waksman & S. Hultgren, (2006) Molecular mechanism of P pilus termination in uropathogenic *Escherichia coli*. *EMBO Rep* **7**: 1228-1232.
- Vignon, G., R. Kohler, E. Larquet, S. Giroux, M.C. Prevost, P. Roux & A.P. Pugsley, (2003) Type IV-like pili formed by the type II secretin: specificity, composition, bundling, polar localization, and surface presentation of peptides. *J Bacteriol* **185**: 3416-3428.

- Virji, M., (1997) Post-translational modifications of meningococcal pili. Identification of common substituents: glycans and alpha-glycerophosphate--a review. *Gene* **192**: 141-147.
- Virji, M., (2009) Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control. *Nat Rev Microbiol* **7**: 274-286.
- Virji, M., C. Alexandrescu, D.J. Ferguson, J.R. Saunders & E.R. Moxon, (1992) Variations in the expression of pili: the effect on adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol* **6**: 1271-1279.
- Virji, M., H. Kayhty, D.J. Ferguson, C. Alexandrescu, J.E. Heckels & E.R. Moxon, (1991) The role of pili in the interactions of pathogenic *Neisseria* with cultured human endothelial cells. *Mol Microbiol* **5**: 1831-1841.
- Virji, M., K. Makepeace, D.J. Ferguson, M. Achtman & E.R. Moxon, (1993a) Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol* **10**: 499-510.
- Virji, M., J.R. Saunders, G. Sims, K. Makepeace, D. Maskell & D.J. Ferguson, (1993b) Pilus-facilitated adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells: modulation of adherence phenotype occurs concurrently with changes in primary amino acid sequence and the glycosylation status of pilin. *Mol Microbiol* **10**: 1013-1028.
- Waage, A., P. Brandtzaeg, A. Halstensen, P. Kierulf & T. Espevik, (1989) The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med* **169**: 333-338.
- Waksman, G. & S.J. Hultgren, (2009) Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Microbiol* **7**: 765-774.
- Walker, J.E., M. Saraste, M.J. Runswick & N.J. Gay, (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**: 945-951.
- Wall, D. & D. Kaiser, (1999) Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol* **32**: 1-10.
- Wang, Y.A., X. Yu, S.Y. Ng, K.F. Jarrell & E.H. Egelman, (2008) The structure of an archaeal pilus. *J Mol Biol* **381**: 456-466.
- Warren, M.J. & M.P. Jennings, (2003) Identification and characterization of pptA: a gene involved in the phase-variable expression of phosphorylcholine on pili of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **71**: 6892-6898.
- Weyand, N.J., S.W. Lee, D.L. Higashi, D. Cawley, P. Yoshihara & M. So, (2006) Monoclonal antibody detection of CD46 clustering beneath *Neisseria gonorrhoeae* microcolonies. *Infect Immun* **74**: 2428-2435.
- Whitchurch, C.B., M. Hobbs, S.P. Livingston, V. Krishnapillai & J.S. Mattick, (1991) Characterisation of a *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility gene and evidence for a specialised protein export system widespread in eubacteria. *Gene* **101**: 33-44.
- Whitchurch, C.B. & J.S. Mattick, (1994) Characterization of a gene, pilU, required for twitching motility but not phage sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **13**: 1079-1091.
- Winther-Larsen, H.C., F.T. Hegge, M. Wolfgang, S.F. Hayes, J.P. van Putten & M. Koomey, (2001) *Neisseria gonorrhoeae* PilV, a type IV pilus-associated protein essential to human epithelial cell adherence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 15276-15281.
- Winther-Larsen, H.C., M. Wolfgang, S. Dunham, J.P. van Putten, D. Dorward, C. Lovold, F.E. Aas & M. Koomey, (2005) A conserved set of pilin-like molecules controls type IV pilus dynamics and organelle-associated functions in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* **56**: 903-917.
- Winther-Larsen, H.C., M.C. Wolfgang, J.P. van Putten, N. Roos, F.E. Aas, W.M. Egge-Jacobsen, B. Maier & M. Koomey, (2007) *Pseudomonas aeruginosa* Type IV pilus expression in *Neisseria gonorrhoeae*: effects of pilin subunit composition on function and organelle dynamics. *J Bacteriol* **189**: 6676-6685.
- Wolfgang, M., P. Lauer, H.S. Park, L. Brossay, J. Hebert & M. Koomey, (1998) PilT mutations lead to simultaneous defects in competence for natural transformation and twitching motility in pilated *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* **29**: 321-330.

- Wolfgang, M., J.P. van Putten, S.F. Hayes, D. Dorward & M. Koomey, (2000) Components and dynamics of fiber formation define a ubiquitous biogenesis pathway for bacterial pili. *EMBO J* **19**: 6408-6418.
- Wolfgang, M., J.P. van Putten, S.F. Hayes & M. Koomey, (1999) The compP locus of *Neisseria gonorrhoeae* encodes a type IV prepilin that is dispensable for pilus biogenesis but essential for natural transformation. *Mol Microbiol* **31**: 1345-1357.
- Xu, X.F., Y.W. Tan, L. Lam, J. Hackett, M. Zhang & Y.K. Mok, (2004) NMR structure of a type IVb pilin from *Salmonella typhi* and its assembly into pilus. *J Biol Chem* **279**: 31599-31605.
- Yaka, P., B. Sultan, H. Broutin, S. Janicot, S. Philippon & N. Fourquet, (2008) Relationships between climate and year-to-year variability in meningitis outbreaks: a case study in Burkina Faso and Niger. *Int J Health Geogr* **7**: 34.
- Yanez, M.E., K.V. Korotkov, J. Abendroth & W.G. Hol, (2008a) The crystal structure of a binary complex of two pseudopilins: EpsI and EpsJ from the type 2 secretion system of *Vibrio vulnificus*. *J Mol Biol* **375**: 471-486.
- Yanez, M.E., K.V. Korotkov, J. Abendroth & W.G. Hol, (2008b) Structure of the minor pseudopilin EpsH from the Type 2 secretion system of *Vibrio cholerae*. *J Mol Biol* **377**: 91-103.
- Yazdankhah, S.P. & D.A. Caugant, (2004) *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. *J Med Microbiol* **53**: 821-832.
- Zhang, X.L., I.S. Tsui, C.M. Yip, A.W. Fung, D.K. Wong, X. Dai, Y. Yang, J. Hackett & C. Morris, (2000) *Salmonella enterica* serovar typhi uses type IVB pili to enter human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **68**: 3067-3073.
- Zhao, S., D.M. Tobiason, M. Hu, H.S. Seifert & R.A. Nicholas, (2005) The penC mutation conferring antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* arises from a mutation in the PilQ secretin that interferes with multimer stability. *Mol Microbiol* **57**: 1238-1251.
- Zolfaghar, I., D.J. Evans & S.M. Fleiszig, (2003) Twitching motility contributes to the role of pili in corneal infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **71**: 5389-5393.
- Zolghadr, B., A. Klingl, A. Koerdt, A.J. Driessen, R. Rachel & S.V. Albers, (2010) Appendage-mediated surface adherence of *Sulfolobus solfataricus*. *J Bacteriol* **192**: 104-110.