

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

Mise en évidence d'un nouveau polysaccharide chez la bactérie *Myxococcus xanthus*

Par
Fares SAÏDI

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
en Microbiologie Appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Pr. Charles Dozois
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

Examineur externe

Pr. Nadia Mykytczuk
Université Laurentienne
École de l'environnement

Directeur de recherche

Pr. Salim Timo Islam
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

REMERCIEMENTS

Durant ma maîtrise, j'ai pu profiter des conseils et de discussions avec de multitudes de personnes qui ont enrichi ma pensée et permit de m'épanouir. Ce fut une expérience magnifique et un bonheur unique. Parmi ces rencontres, je remercie en premier lieu mon directeur de recherche, Pr. Salim Timo Islam. Je suis honoré d'être ton étudiant et fier d'être la première thèse de maîtrise du laboratoire. Merci de m'avoir offert cette chance inouïe. J'en garderai un souvenir à jamais gravé dans ma mémoire. Je te remercie pour toute ton aide, ton soutien, pour les conseils que tu m'as prodigués durant cette maîtrise. Tu m'as appris l'abnégation, car il en faut beaucoup dans le chemin de l'apprentissage. J'ai grandi scientifiquement à la lumière de nos échanges. Tu m'as enseigné ta science et il n'y a aucun don supérieur à celui du don de la science. Merci pour tout.

Je tiens aussi à remercier la Pr. Nadia Mykytczuk et le Pr. Charles Dozois d'avoir accepté d'être mon jury et de donner de leur temps pour mes travaux de maîtrise. Je remercie le Pr. Éric Déziel pour les discussions scientifiques qui m'ont grandement aidé dans mon projet.

Merci à mes collègues de laboratoire Eric, Nicolas, Rose, Omaima, Anthony et Alec pour tous ces moments partagés, toutes les discussions enrichissantes, pour votre soutien. Je suis très content d'avoir fait votre rencontre durant cette maîtrise.

Je remercie Slimane, Daniel, Aymeric, Emre que j'ai eu la chance de rencontrer durant le début de ma maîtrise. Merci à Hichem, Mustapha, Quétia, Rihab, Vahid, Sabrina, Réza, Émilie, Aurélie, Nour, Qamar et à toutes les personnes que j'ai côtoyées.

Mes derniers remerciements s'adressent à ceux sans qui rien n'est. Un merci à ma mère pour ses encouragements durant mes études. Je remercie mon père de m'avoir poussé à me dépasser. À Chams-eddine et Noha, merci pour votre présence. Et le plus important je remercie Géraldine, merci pour ta patience et ton soutien et aussi ma petite fille Roqaya pour le bonheur qu'elle m'apporte.

Sa'd bn 'Ubâdah رضي الله عنه :

"Ô Messenger d'Allâh, quelle est la meilleure aumône ?"

Il dit صلى الله عليه وسلم : "Donner à boire de l'eau (abreuver, éteindre la soif d'autrui...)."

À la mémoire de mon oncle Mohamed Yahyaoui décédé le 28 mai 2020.

RÉSUMÉ

La multicellularité — caractérisée par la différenciation des fonctions physiologiques à travers une population de cellules contiguës — est le point évolutif chez les organismes ayant permis l'apparition d'une grande complexité ainsi que la colonisation de la vie et son adaptation dans une multitude de conditions et de lieux. Très présent chez les Eucaryotes (omniprésent chez les métazoaires), la multicellularité est présente chez les procaryotes comme certaines bactéries ayant la capacité de former des corps complexes pour s'adapter à des conditions environnementales difficiles. Une bactérie modèle concernant la multicellularité bactérienne est *Myxococcus xanthus*, bactérie Gram-négatif appartenant à la famille des δ -proteobactéries. En plus d'un cycle de vie végétatif où une cellule donne deux cellules, en condition de carences nutritives, *M. xanthus* forme une structure multicellulaire complexe appelée corps fructifères pour résister à cette carence. Cette structure est formée de trois populations différenciées issues de la même population. Pour que cette multicellularité ait lieu, *M. xanthus* a besoin de différents polysaccharides intervenant dans divers processus physiologiques. Ces polysaccharides sont principalement produits par des voies Wzx/Wzy-dépendantes, qui sont multiples chez *M. xanthus*. La première produit le polysaccharide formant le manteau des spores. La seconde produit l'exopolysaccharide indispensable à la motilité dépendante du pilus de type IV (T4P). Je montre ici qu'une nouvelle et troisième voie Wzx/Wzy-dépendantes semble produire un nouveau polysaccharide de fonction inconnue, mais affectant le développement de *M. xanthus* différemment par rapport aux deux polymères déjà mentionnés. Ce nouveau polysaccharide putatif affecte l'organisation macroscopique des colonies de *M. xanthus*, la motilité de type « *gliding* », et celle dépendante du T4P. Il possède aussi un effet sur la surface des cellules. Finalement, ce nouveau polysaccharide putatif possède une propriété émulsifiante. Ces travaux ont permis de caractériser un nouveau polysaccharide putatif et de comprendre l'implication des divers polysaccharides sécrétés dans l'avènement de structures complexes chez les bactéries.

ABSTRACT

Multicellularity — characterized by the differentiation of physiological functions across a contiguous cell population — is an evolutionary phenomenon that has contributed to the development of biological complexity, allowing for the establishment of life and its adaptation in a multitude of niches. Common in eukaryotes (ubiquitous in metazoans), multicellularity is also present in prokaryotes, such as in certain bacteria that have acquired the ability to form complex structures in order to adapt to less optimal environmental conditions. The model organism for studying bacterial multicellularity is Gram-negative *Myxococcus xanthus*, a member of the δ -proteobacterial family. In addition to a vegetative life cycle where one cell divides to yield two cells, after starvation, *M. xanthus* has the ability to form complex multicellular structures called fruiting bodies to resist this deficiency. This structure is composed of three differentiated populations originating from the same initial population. To mediate this multicellularity, *M. xanthus* produces various polysaccharides required for its complex physiology. These polysaccharides are produced by Wzx/Wzy-dependent pathways, of which there are several in *M. xanthus*. The first is responsible for synthesizing the spore coat, while the second produces an exopolysaccharide essential for type IV pilus-dependent motility of *M. xanthus* groups. Herein, I provide evidence for a new and third Wzx/Wzy-dependent pathway in *M. xanthus* that produces a new putative polysaccharide with an unknown function. This new putative polysaccharide affects the development of *M. xanthus* in a different way than the two sugar polymers already mentioned. This new putative polysaccharide affects the macroscopic organization of *M. xanthus* colonies as well as single-cell gliding and type IV pilus-dependent motilities. It also has an effect on the *M. xanthus* cell surface. Finally, this new putative polysaccharide displays an emulsifying property. This work has allowed me to characterize a new putative polysaccharide and to understand the involvement of various secreted polysaccharides in the development of complex structures in bacteria.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	III
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES TABLEAUX	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XV
1 INTRODUCTION.....	17
1.1 LA MULTICELLULARITÉ.....	17
1.1.1 Généralités.....	17
1.1.2 La multicellularité chez les bactéries.....	19
1.2 LA SYNTHÈSE ET L'EXPORT DES POLYSACCHARIDES SÉCRÉTÉS.....	21
1.2.1 Voie dépendante des transporteurs ABC	23
1.2.2 Voie synthase-dépendante	23
1.2.3 Voie Wzx/Wzy-dépendante.....	24
1.3 PROPRIÉTÉS DES POLYSACCHARIDES BACTÉRIENS.....	24
1.3.1 Propriétés bioémulsifiantes des polysaccharides sécrétés	25
1.3.2 Propriétés tensioactives des polysaccharides sécrétés	25
1.4 MYXOCOCCUS XANTHUS.....	26
1.4.1 Généralités.....	26
1.4.2 La motilité chez Myxococcus xanthus.....	28
1.4.3 Les polysaccharides sécrétés chez Myxococcus xanthus	30
1.5 PROBLÉMATIQUE	33
2 MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	35
2.1 LES SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES	35
2.2 CONDITIONS DE CULTURE	35
2.3 TESTS PHÉNOTYPIQUES	35
2.4 TEST D'AUTOAGRÉGATION	38
2.5 TEST MARQUAGE AU TRYPAN BLEU	38
2.6 ANALYSE DE LA MOTILITÉ DE TYPE « GLIDING ».....	41
2.6.1 Microscopie	41
2.6.2 Logiciel Image J.....	41
2.7 TEST ÉMULSIFIANT.....	41

2.8	TEST DE TENSION DE SURFACE.....	43
3	RÉSULTATS.....	44
3.1	ÉTUDE DE L'EFFET DE L'EPS ET DU NOUVEAU POLYSACCHARIDE SUR LA MACRO- ORGANISATION.....	44
3.2	ÉTUDE DE COMPLÉMENTATION DE L'EPS ET DU BPS.....	46
3.3	ÉTUDE DE LA MOTILITÉ DE TYPE « <i>GLIDING</i> » ET DE L'EFFET DU BPS SUR CELLE-CI	48
3.4	RÔLE DU BPS SUR LA SURFACE DES CELLULES BACTÉRIENNES	48
3.4.1	<i>Autoagrégation</i>	48
3.4.2	<i>Mesure la quantité d'EPS à la surface des cellules de M. xanthus</i>	52
3.5	PROPRIÉTÉ DU NOUVEAU BPS.....	52
4	DISCUSSION	56
4.1	EPS ET BPS, EFFETS DISTINCTS SUR L'ORGANISATION D'UNE COLONIE	57
4.2	ÉCHANGE DES DIVERS POLYSACCHARIDES AU SEIN D'UNE COMMUNAUTÉ.....	58
4.3	EFFET DU BPS SUR LA MOTILITÉ DE TYPE « <i>GLIDING</i> »	58
4.4	RÔLE DU BPS SUR LA SURFACE DES CELLULES BACTÉRIENNES	59
4.5	PROPRIÉTÉ DU BPS	59
5	PERSPECTIVES	61
6	BIBLIOGRAPHIE.....	64

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1 : DISTRIBUTION DE LA MULTICELLULARITÉ CHEZ LES EUCARYOTES	18
FIGURE 1.2 : MULTICELLULARITÉ CHEZ LES PROCARYOTES	20
FIGURE 1.3 : LES DIFFÉRENTES MACHINERIES DE PRODUCTION DES POLYSACCHARIDES BACTÉRIENNE	22
FIGURE 1.4 : SCHÉMA DU CYCLE DÉVELOPPEMENTAL CHEZ <i>MYXOCOCCUS XANTHUS</i>	27
FIGURE 1.5 : REPRÉSENTATION DU SYSTÈME DE TYPE « <i>GLIDING</i> » CHEZ <i>M. XANTHUS</i>	29
FIGURE 1.6 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA MOTILITÉ T4P-DÉPENDANTE	31
FIGURE 1.7 : SCHÉMA DES DIFFÉRENTES MACHINERIES Wzx/Wzy-DÉPENDANTE CHEZ <i>M. XANTHUS</i>	34
FIGURE 2.1 : PRINCIPE DU NÉPHÉLOMÈTRE	40
FIGURE 3.1 : TEST PHÉNOTYPIQUE DE LA MOTILITÉ DÉPENDANTE DU T4P ET DE LA FORMATION DES CORPS FRUCTIFÈRES	45
FIGURE 3.2: COMPLÉMENTATION DE LA MOTILITÉ DÉPENDANTE DU T4P ENTRE LA SOUCHE EPS ⁻ ET BPS ⁻ 47	47
FIGURE 3.3 : ANALYSE DE LA MOTILITÉ DE TYPE « <i>GLIDING</i> ».....	50
FIGURE 3.4 : OBSERVATION DE L'AUTOAGRÉGATION DANS LE TEMPS VIA NÉPHÉLOMÉTRIE	51
FIGURE 3.5 : MESURE DE LA PRODUCTION DE L'EPS CHEZ LA SOUCHE WT, BPS ⁻ , EPS ⁻ ET MASC ⁻	53
FIGURE 3.6 : TEST DE LA PROPRIÉTÉ ÉMULSIFIANTE	54
FIGURE 3.7 : MESURE DE LA TENSION DE SURFACE DES SOUCHES SAUVAGE, EPS ⁻ ET BPS ⁻	56

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 2.1 : SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES DANS CETTE ÉTUDE.....	36
TABLEAU 2.2 : COMPOSITION DES MILIEUX ET DES TAMPONS.....	37
TABLEAU 2.3 : PARAMÈTRES DE RÉGLAGES DU MODULE D'EXTENSION MICROBEJ	42

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C : degrés Celsius

BPS : *bioemulsifier polysaccharide*

CYE : *casitone–yeast extract*

Dif : *defect in fruiting body*

DO : densité optique

EPS : exopolysaccharide

LPS : lipopolysaccharide

min : minute

mL : millilitre

OPX : *outer-membrane polysaccharide export*

PCP : polysaccharide-copolymérase

rpm : rotations par minute

T4P : pilus de type IV

TPM : Tris phosphate magnésium

WT : *wild type*

1 INTRODUCTION

1.1 La multicellularité

1.1.1 Généralités

La multicellularité est définie comme la capacité chez un organisme de posséder plusieurs fonctions physiologiques différentes en ayant diverses populations cellulaires différenciées (Grosberg and Strathmann, 2007; Shapiro, 1998). Pour que cela ait lieu, les cellules doivent être capables de proliférer, communiquer, se mouvoir et se spécialiser (Grosberg and Strathmann, 2007). Possédant ces caractéristiques, les cellules sont capables de s'amasser et s'organiser pour former des structures complexes (Grosberg and Strathmann, 2007; Herron et al., 2019). La matrice extracellulaire, composée de multitudes de molécules différentes produites par les cellules eucaryotes est aussi très importante pour l'avènement de la multicellularité comme le collagène, la laminine, ou les proteoglycanes (Bosman and Stamenkovic, 2003). Cette matrice permet aux cellules de communiquer, de se mouvoir en servant pour l'adhésion et aussi de se différencier (Bosman and Stamenkovic, 2003).

La multicellularité est très présente et connue chez les plantes, amibes et métazoaires (**Fig. 1.1**) (Grosberg and Strathmann, 2007). Elle existe aussi chez les procaryotes où son apparition est corrélée à un stimulus environnemental comme une carence nutritive. Ici aussi, la matrice extracellulaire joue un rôle primordial. Chez les bactéries, des molécules très importantes au sein de la matrice extracellulaire sont les polysaccharides.

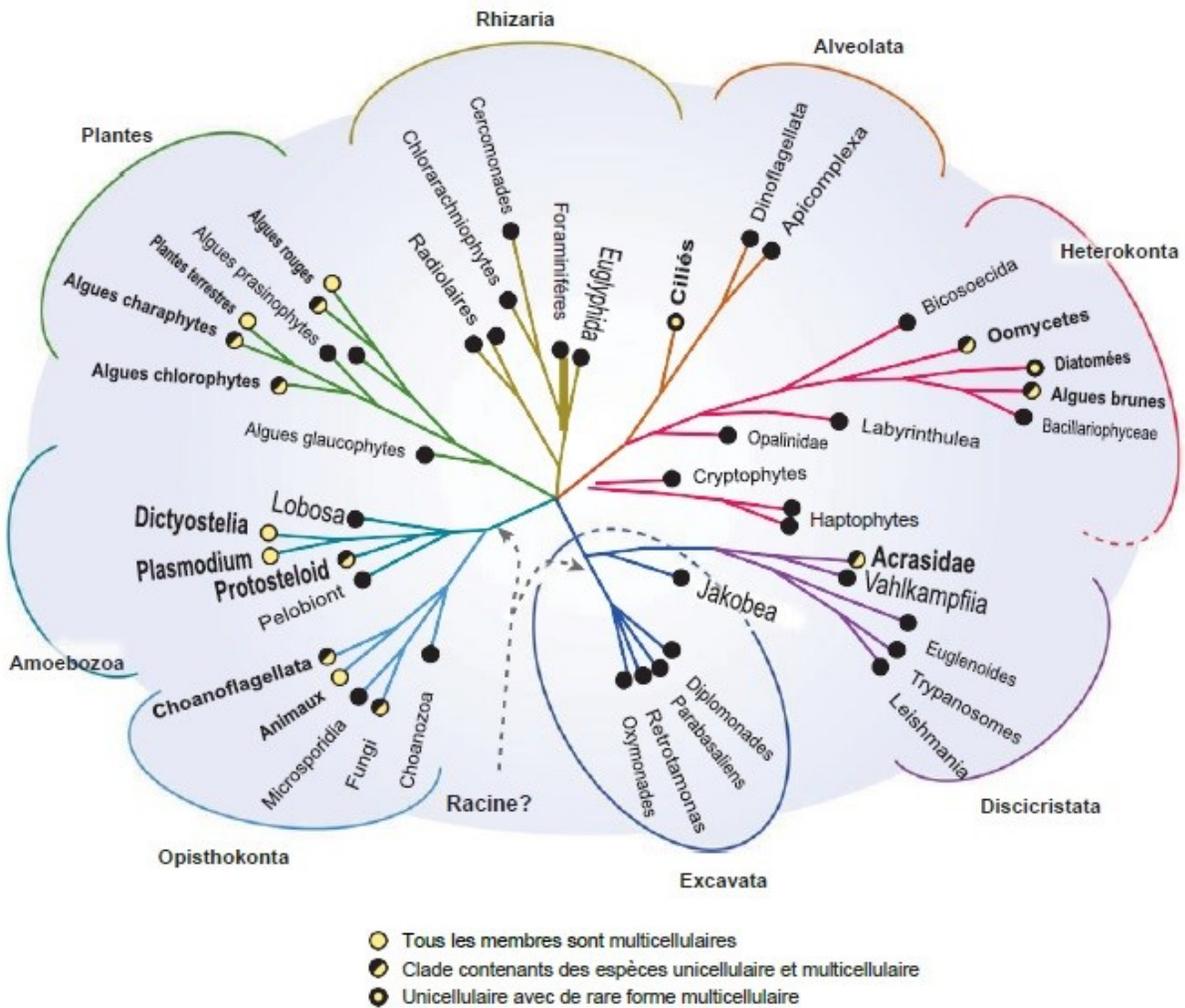


Figure 1.1 : Distribution de la multicellularité chez les eucaryotes

Arbre phylogénétique de la distribution de la multicellularité chez les eucaryotes. Cette répartition est différente chez les différents taxons. Les taxons représentés avec ● sont uniquement composés d'organismes multicellulaires. Les taxons représentés par ◐ sont composés d'organismes unicellulaire et multicellulaires. Les taxons représentés par ● sont composés principalement unicellulaire avec de rares formes multicellulaires. Les taxons représentés par un cercle noir sont totalement unicellulaires. Les taxons en gras possèdent au moins quelques formes multicellulaires (Adapté de Grosberg et al. 2007).

1.1.2 La multicellularité chez les bactéries

Même si elle est beaucoup moins connue et casse tous les paradigmes, les bactéries aussi sont capables de multicellularité. Celle-ci est activée via des stimuli environnementaux (Grosberg and Strathmann, 2007) et permet aux bactéries de répondre à diverses problématiques environnementales, accroître leur capacité de colonisation des divers milieux et augmenter leurs chances de survie. Il existe de multiples formations multicellulaires bactériennes permettant de résister à des conditions difficiles. Pour exemple, nous pouvons citer la formation de biofilm ou de corps fructifères chez *Myxococcus xanthus* (**Fig. 1.2A**) (Julien et al., 2000), la formation de cellules avec des fonctions spécialisées comme chez *Cyanobacterium anabaena* (**Fig. 1.2B**) (Herrero et al., 2016), ou encore chez *Bacillus subtilis* aussi avec la formation de corps fructifères (**Fig. 1.2C**) (Branda et al., 2001). Cependant, nos connaissances sur la manière dont les bactéries régulent leur multicellularité sont limitées. Un élément observé chez beaucoup de bactéries est l'importance des polysaccharides sécrétés dans la formation de structures ainsi que des comportements complexes (Whitney and Howell, 2013). Ces polysaccharides sécrétés forment une matrice extracellulaire (Sutherland, 2001) qui, comme chez les eucaryotes, permettent l'avènement de structures plus complexes.

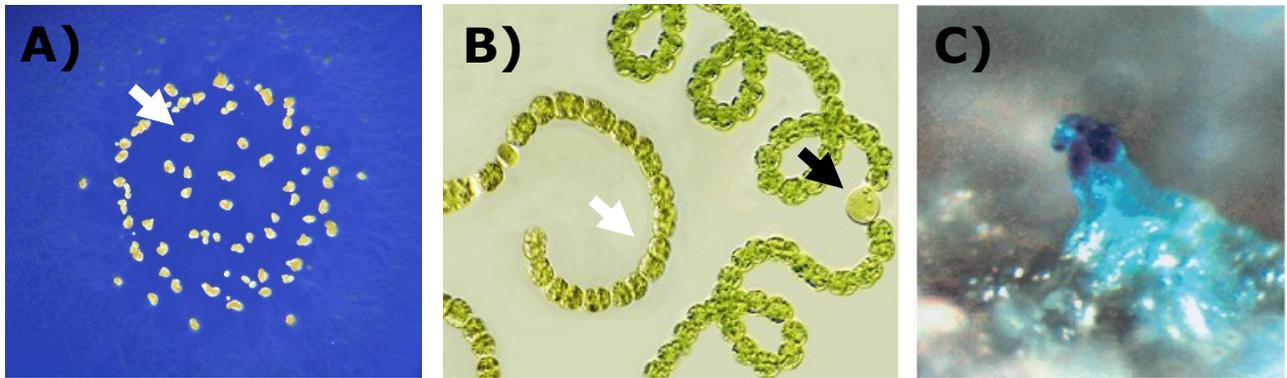


Figure 1.2 : Multicellularité chez les procaryotes

Figure montrant des exemples de différentes structures complexes pouvant être observées chez divers procaryotes. **(A)** Image de corps fructifères chez *M. xanthus* (flèche blanche). **(B)** Image de *Cyanobacterium anabaena* avec la présence d'hétérocyste (flèche noir), cellule végétatif (flèche blanche) (Řezanka et al., 2004) . **(C)** Corps fructifères chez *Bacillus subtilis* (Branda et al., 2001).

1.2 La synthèse et l'export des polysaccharides sécrétés

Les polysaccharides sécrétés chez les bactéries sont extrêmement divers. Ils offrent aux bactéries plusieurs avantages comme le maintien de l'intégrité de la surface de l'enveloppe cellulaire (Whitney and Howell, 2013), une protection chez certaines bactéries où ils sont produits pour former une capsule de protection contre un environnement hostile. Ils sont importants dans la formation de communautés complexes chez les bactéries par exemple lors de formation de biofilms. Ils sont aussi impliqués dans la pathogénicité chez l'humain et les plantes (Sutherland, 1998). Ils sont composés de plusieurs monosaccharides répétés liés par une liaison osidique. Ceci forme les homo- ou heteropolysaccharides. Étudier les polysaccharides est très important, car ils sont indispensables à la formation des biofilms chez certaines bactéries capables d'en faire et provoquant des maladies nosocomiales en milieu hospitalier, dont les coûts sont très importants (Khatoon et al., 2018). Les polysaccharides bactériens sont aussi intéressants dans les domaines industriels qui les utilisent comme gélifiant dans l'agroalimentaire par exemple ou prévoient de les utiliser comme dans les imprimantes 3D (McCarthy et al., 2019; Santos et al., 2016). Du fait de la diversité de fonction dans lesquels sont impliqués les polysaccharides, la composition et la structure de ceci sont très importantes et complexes. En effet, il existe trois différents systèmes. La voie transporteur ABC-dépendante, la voie synthase-dépendante et enfin la voie Wzx/Wzy-dépendante (**Fig. 1.3**).

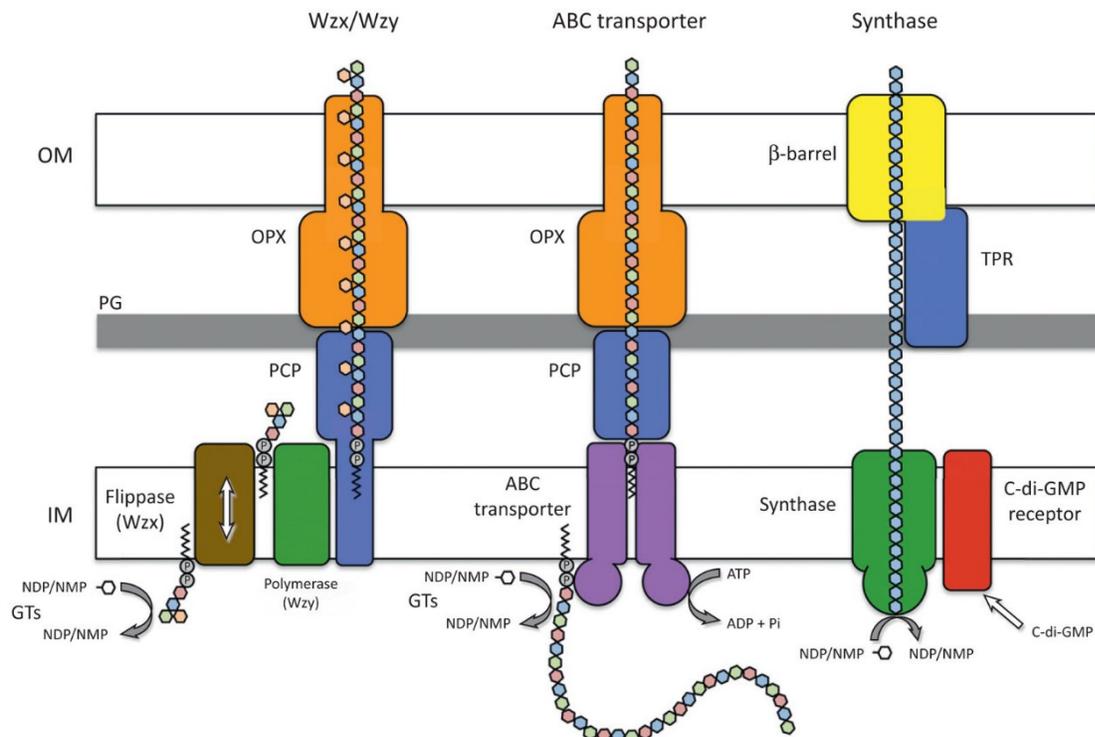


Figure 1.3 : Les différentes machineries de production des polysaccharides bactérienne

Représentation de la voie Wzx/Wzy-dépendante ensuite de la voie des transporteurs ABC et enfin de la voie synthase-dépendante (Whitney and Howell, 2013). Pour la voie Wzx/Wzy-dépendante, une sous-unité du polysaccharide répété est synthétisée par les glycosyltransférases sur l'undecaprenyl diphosphate sur la face cytoplasmique de la membrane interne. Ensuite, la flippase Wzx fait passer cette sous-unité fixée sur la face périplasmique de la membrane interne. Dans le périplasm, la polymérase Wzy assemble les sous-unités du polysaccharide à une longueur spécifiée par le polysaccharide co-polymérase (PCP). Le polymère mature est ensuite exporté par la protéine OPX, qui forme un canal à travers de la membrane externe. Pour la voie transporteur ABC-dépendante, le polysaccharide est synthétisé sous sa forme finale au niveau cytoplasmique et ensuite il est transporté à travers la membrane interne par un transporteur dépendant de l'ATP. Puis, les protéines PCP et OPX vont exporter le polysaccharide final. Pour la voie synthase-dépendante, le polysaccharide est polymérisé et exporté en même temps avec l'addition de chaque sucre. Adapté de Whitney et Howell, 2013.

1.2.1 Voie dépendante des transporteurs ABC

Les voies dépendantes des transporteurs ABC dont le schéma est impliqué dans la production de l'antigène O du lipopolysaccharide (LPS) ou du polysaccharide composant la capsule du groupe 2 chez *Escherichia coli* (Whitfield, 2006; Whitney and Howell, 2013). Le polymère est formé entièrement au niveau cytoplasmique sur un undecaprenyl diphosphate puis il est pris en charge par le transporteur ABC à travers la membrane interne (Greenfield and Whitfield, 2012). Le transporteur ABC est composé de deux domaines de fixation nucléotidique (NBD) et de deux domaines transmembranaires (TMD) (Greenfield and Whitfield, 2012). Les domaines NBD possèdent des motifs très conservés spécifiques aux transporteurs ABC ainsi que les motifs Walker A et B permettant l'hydrolyse de l'ATP qui induit un changement de conformation du transporteur ABC permettant le transport du polymère à travers la membrane interne (Cuthbertson et al., 2010; Greenfield and Whitfield, 2012). Ensuite, le polymère est sécrété via un canal composé de deux protéines du périplasma à l'extérieur, la protéine polysaccharide-copolymérase (PCP) et la protéine OPX (*outer-membrane polysaccharide export*) (Dong et al., 2006). Ces deux protéines sont organisées en homo-oligomère permettant la sécrétion des polysaccharides du périplasma à travers la membrane externe (Kalynych et al., 2012; Tocilj et al., 2008).

1.2.2 Voie synthase-dépendante

Pour le système synthase-dépendante (**Fig. 1.3**), la synthèse peut se faire avec ou sans l'undecaprenyl diphosphate (Cartee et al., 2001; Hubbard et al., 2012). Dans ce système, la synthèse du polysaccharide et sa sécrétion se font en simultané (Hubbard et al., 2012). Tout d'abord une glycosyltransférase permet l'extension et le passage du polymère à travers la membrane interne, ensuite un baril bêta associé à une protéine possédant le motif répétition tétratricopeptide (TPR) permet de faciliter la sécrétion à travers le baril bêta du polysaccharide fini et de stabiliser le baril bêta lui-même.

1.2.3 Voie Wzx/Wzy-dépendante

Pour la machinerie Wzx/Wzy-dépendante (**Fig. 1.3**), tout commence à la partie cytoplasmique de la membrane interne où une sous-unité est synthétisée sur un undecaprenyl-diphosphate par des glycosyltransférases, puis prise en charge par la flippase Wzx (Islam et al., 2013; Islam et al., 2012; Islam and Lam, 2013 ; Islam et al., 2010). Cette flippase permet à la sous-unité polysaccharidique fixée sur l'undecaprenyl-diphosphate d'être exportée au feuillet périplasmique de la membrane interne (Islam and Lam, 2014; Liu et al., 1996; Whitfield, 1995). Ensuite, cette sous-unité est prise en charge par la polymérase Wzy, qui lie une nouvelle sous-unité à la base d'une chaîne polymérisée (Islam et al., 2011; Islam et al., 2013b; Islam et al., 2010; Robbins et al., 1967; Woodward et al., 2010). Le nombre de sous-unités incorporés dans ces polymères est contrôlé par la protéine PCP (Islam et al., 2013b; Islam and Lam, 2014; Reid and Whitfield, 2005; Whitfield and Paiment, 2003). Après que le polysaccharide soit formé entièrement, il est pris en charge par le canal formé par la protéine OPX (Dong et al., 2006; Nickerson et al., 2014; Reid and Whitfield, 2005). Cette voie synthétisant les polysaccharides de haut poids moléculaire est majoritaire chez les bactéries (Islam and Lam, 2014).

1.3 Propriétés des polysaccharides bactériens

Les polysaccharides bactériens sont extrêmement riches en raison de leur diversité. Ceci leur procure une multitude de fonctions possibles. Ils sont utilisés dans diverses industries comme celle de la santé où ils sont utilisés comme antigènes dans des vaccins (Weintraub, 2003). Des exemples dans l'industrie agroalimentaire, ou pharmaceutique existent comme le xanthan qui est un heteropolysaccharide issu de répétitions des unités composées de deux glucoses, deux mannoses et un acide glucoronique (Garcia-Ochoa et al., 2000). Le xanthan est utilisé pour faire la gomme xanthan utilisée pour ses propriétés émulsifiantes dans les sauces pour salades ou comme lubrifiant dans les trous de forage dans l'industrie pétrolière (Garcia-Ochoa et al., 2000). Ici, nous allons nous concentrer sur deux propriétés intéressantes que

nous aborderons chez les polysaccharides. Ce sont les propriétés bioémulsifiante et tensioactive.

1.3.1 Propriétés bioémulsifiantes des polysaccharides sécrétés

Les bioémulsifiants sont produits par un grand nombre de bactéries (Calvo et al., 2009). Ils ont la capacité de stabiliser le mélange en deux phases différentes non miscibles, comme de l'eau et de l'huile. Les bioémulsifiants possèdent un haut poids moléculaire (Santos et al., 2016; Uzoigwe et al., 2015). Il existe différentes compositions de bioémulsifiants comme des heteropolysaccharides, mais aussi des lipopolysaccharides et parfois ceux-ci sont associés avec des protéines. On peut voir aussi des lipoprotéines possédées des propriétés bioémulsifiantes. Dans le vivant, les bio-émulsifiants servent à améliorer l'accès à certains substrats peu solubles en améliorant leur solubilité et favorisant l'accès à certains nutriments pour aider le développement des bactéries (Uzoigwe et al., 2015).

1.3.2 Propriétés tensioactives des polysaccharides sécrétés

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles — c'est-à-dire possédant une partie hydrophile et une partie hydrophobe — produites par des organismes vivants. En plus d'augmenter la solubilité de molécules hydrophobes comme pour les bioémulsifiants, ils sont capables de réduire la tension de surface entre deux phases différentes comme entre l'huile et l'eau (Santos et al., 2016). Compte tenu de ces propriétés, les biosurfactants sont extrêmement intéressants d'un point de vue économique, mais aussi écologique (Calvo et al., 2009). Ils sont utilisés en industrie agroalimentaire, comme dans la confection des crèmes glacées afin de d'augmenter la conservation des produits ou d'obtenir une consistance souhaitée (Muthusamy et al., 2008). Contrairement aux surfactants synthétiques qui sont d'habitude dérivés du pétrole donc peu respectueux de l'environnement, les biosurfactants prennent en compte la problématique environnementale de plus en plus importante dans nos sociétés. Ils ont une faible toxicité et sont biodégradables. Ils fonctionnent aussi dans

un large éventail (pH, température optimale, salinité, faible concentration micellaire critique). Il existe diverses classes de biosurfactants autres que ceux qui sont polysaccharidiques. On peut voir des classes glycolipidiques comme les rhamnolipides très étudiées avec une importante diversité structurelle (Abdel-Mawgoud et al., 2010; Soberón-Chávez et al., 2005). On peut trouver aussi des classes lipopeptidiques comme la surfactine qui est un des surfactants les plus efficaces (Arima et al., 1968; Santos et al., 2016).

1.4 *Myxococcus xanthus*

1.4.1 Généralités

Myxococcus xanthus est une bactérie du sol Gram-négatif appartenant à la classe des δ -proteobactéries et à l'ordre des Myxococcales. Elle possède une forme de bacille avec une longueur moyenne de 5 à 7 μm et de diamètre de 0,5 μm (Spormann, 1999; Wolgemuth, 2005). Elle possède un cycle de développement complexe (**Fig. 1.4**). En conditions environnementales favorables, elle possède un cycle de vie dit végétatif (Zusman et al., 2007). En condition de carence nutritive, *M. xanthus* a la capacité de s'organiser et de former des structures complexes nommées corps fructifères procurant à *M. xanthus* une résistance à ces conditions défavorables. À cette étape, trois types cellulaires distincts forment le corps fructifère. Le premier type cellulaire est formé par les cellules périphériques, situé en périphérie du corps fructifères quittant le « *swarm* » pour chercher de meilleures conditions nutritives (**Fig. 1.4**). Le second type cellulaire est composé des cellules basales en contact avec le substrat qui forment la base des corps fructifères (**Fig. 1.4**). Et enfin le dernier groupe formé est constitué des spores, métaboliquement inactives pouvant germer ultérieurement et retourner à un cycle végétatif dans de meilleures conditions (**Fig. 1.4**). Chacun de ces types de cellules possèdent un profil transcriptomique distinct, indiquant qu'elles sont bien trois sous-types de cellules différenciées émergeant initialement du même groupe cellulaire homogène (Muñoz-Dorado et al., 2019; Zusman et al., 2007) .

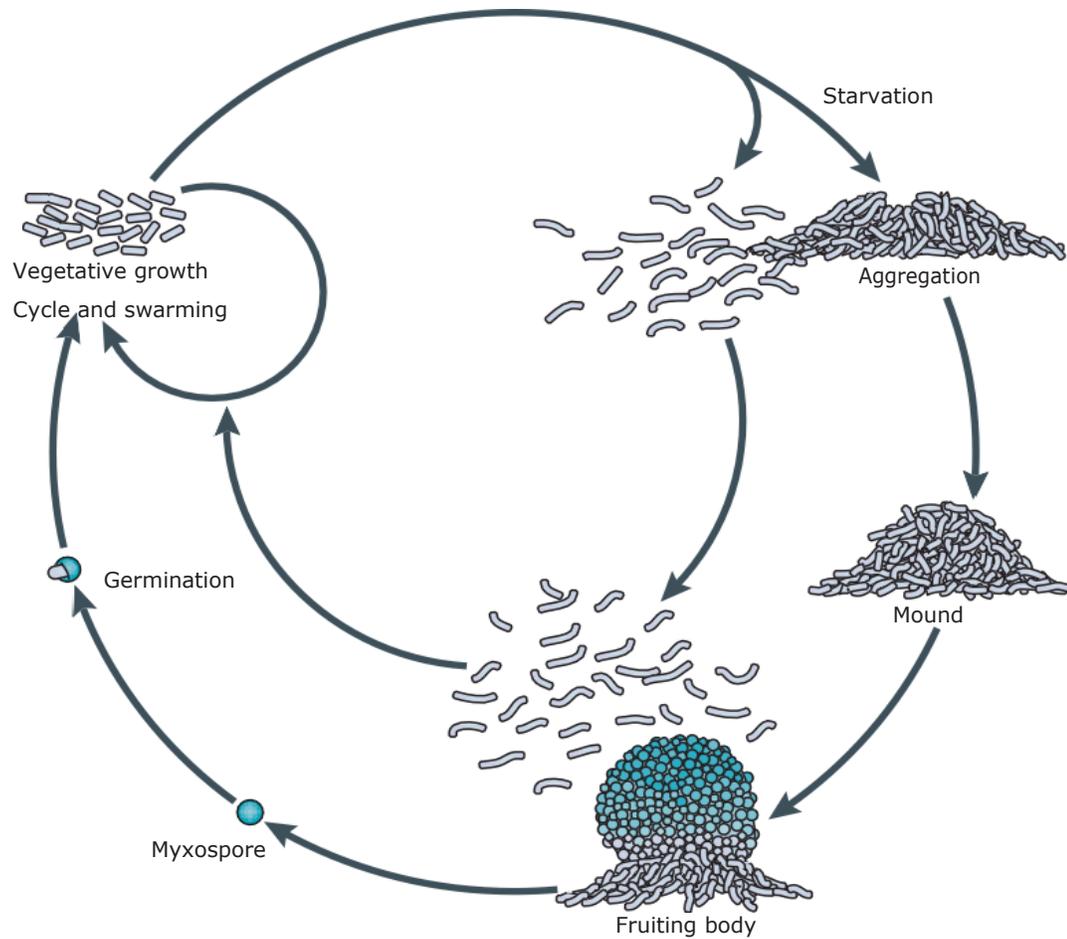


Figure 1.4 : Schéma du cycle développemental chez *Myxococcus xanthus*

Myxococcus xanthus possède un cycle de vie dit végétatif donnant deux bactéries à partir d'une seule, commun à toutes les bactéries. En plus de ce cycle, *M. xanthus* possède un cycle de vie complexe en cas de carence nutritive amenant à son agrégation et la formation de corps fructifères. Le corps fructifère est composé de trois populations différentes toutes issues de la même population initiale. Chaque population a une spécialisation. La population de cellules périphériques sonde l'environnement afin de trouver des nutriments. Les spores, cellules rondes permettant à *M. xanthus* de résister aux carences nutritives étant en état de quiescence métabolique. Et enfin les cellules basales permettant la fixation au substrat de cette structure. Une fois de meilleures conditions retrouvées, les myxospores germineront. (Adapté de Zusman et al., 2007).

1.4.2 La motilité chez *Myxococcus xanthus*

Afin que ce cycle cellulaire complexe ait lieu, *M. xanthus* a besoin de se déplacer. Il existe deux types de motilité chez *M. xanthus*.

1.4.2.1 La motilité de type « *gliding* »

La première est la motilité de type « *gliding* » sur les surfaces dures. Elle ne dépend d'aucun appendice extracellulaire visuel comme les pili ou les flagelles (**Fig. 1.5**). Cette motilité concerne les cellules au niveau individuel. Elle dépend d'une machinerie Agl–Glt permettant la fixation des cellules au substrat avec l'aide d'une trainée produite par *M. xanthus* qui est une trainée de polysaccharides qui restent inconnus (**Fig. 1.5**) (Ducret et al., 2012; Islam and Mignot, 2015; Spormann and Kaiser, 1995). La machinerie Agl–Glt est composée d'une partie cytoplasmique interagissant avec le cytosquelette MreB qui lui sert d'ancrage cytoplasmique (Blackhart and Zusman, 1985; Islam and Mignot, 2015). Puis une partie à la membrane interne avec le complexe Agl permettant d'énergiser la machinerie par le gradient proton-motrice. Ensuite une partie périplasmique et enfin une partie à la membrane externe qui permet la fixation solide à la surface. Un polysaccharide inconnu permet l'adhésion à la surface (Ducret et al., 2012; Islam and Mignot, 2015). Ceci permet la pleine fixation et l'ancrage de la bactérie à la surface pour le déplacement des cellules individuelles. Ce point d'adhésion s'appelle le point d'adhésion focale. Une particularité que possèdent les cellules chez *M. xanthus* est la capacité de reculer (Blackhart and Zusman, 1985). Cette capacité de reculer est contrôlée par le système chimiotactisme Frz ainsi qu'une influence de l'EPS (Blackhart and Zusman, 1985; Zhou and Nan, 2017).

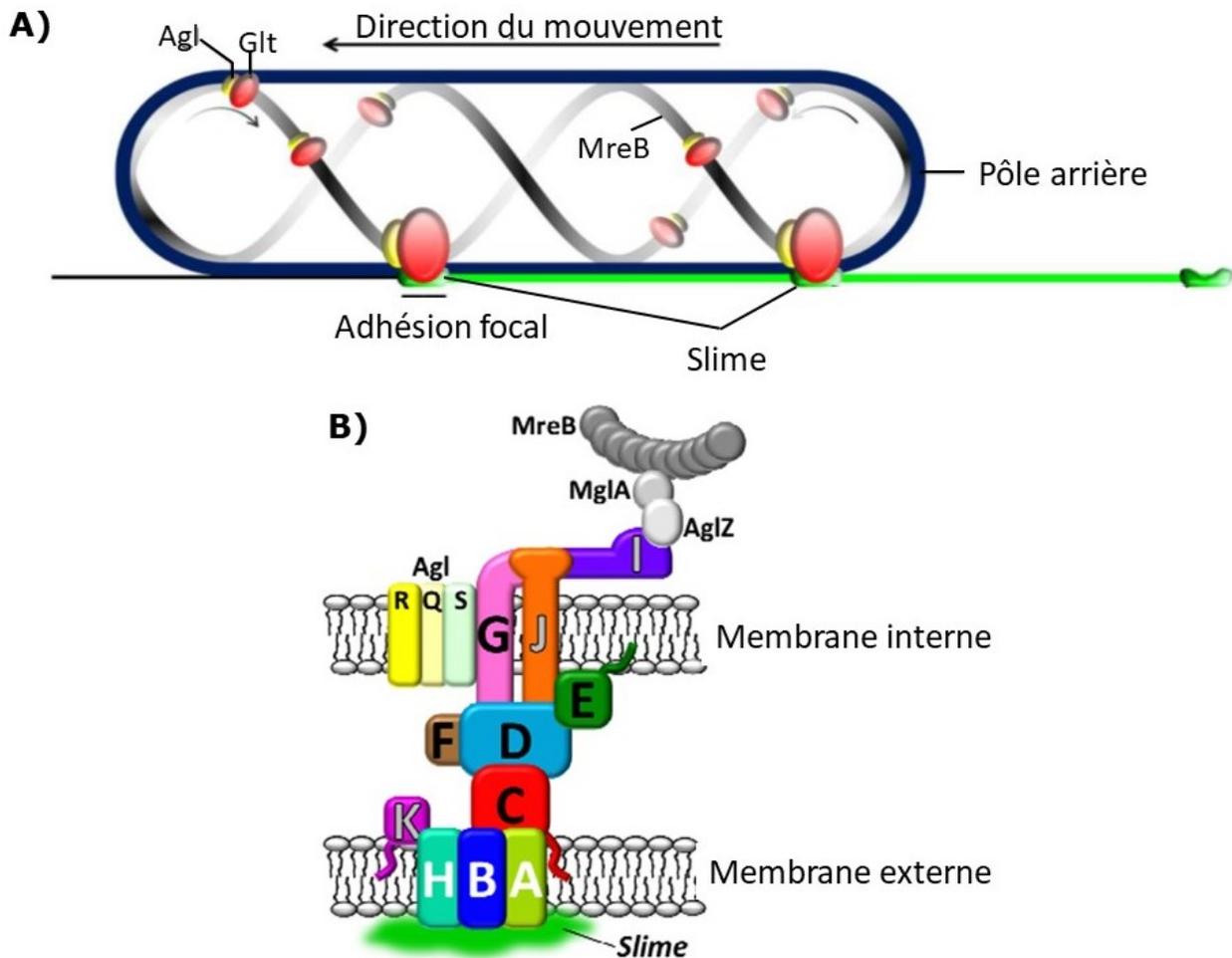


Figure 1.5 : Représentation du système de type « gliding » chez *M. xanthus*

A) Modèle de la motilité de type « gliding ». Le modèle représente schématiquement le cytosquelette MreB, réparti de manière hélicoïdale et servant d'encreage à la machinerie Agl-Glt circulant le long de la cellule. Quand la partie à la membrane externe du complexe Glt rencontre le substrat à la surface cellulaire, ceci forme une adhésion focale médiée par le « slime » permettant à la cellule de se mouvoir. Une fois le complexe Agl-Glt atteignant l'avant de la cellule, il se défait et se rassemble à l'arrière de la cellule. B) Schéma de la machinerie Agl-Glt. MglA, une GTPase connecte la machinerie Agl-Glt au cytosquelette MreB. La machinerie est énergisée par le complexe AglRQS formant une pompe à proton. Ensuite vient le corps principal de la machinerie, le complexe Glt (GltA à GltK), dont la partie à la membrane externe fait l'adhésion focale. (Adapté d'Islam and Mignot, 2015).

1.4.2.2 La motilité dépendante du T4P

Le second type de motilité présente chez *M. xanthus*, intervenant dans la motilité de groupe est nommé motilité dépendante du T4P. Cette motilité dépend de deux éléments majeurs, le T4P et l'exopolysaccharide (EPS) qui est un polysaccharide spécifique produit par *M. xanthus* (Konovalova et al., 2010). Le T4P d'une bactérie donnée se forme et interagit avec l'EPS d'une cellule voisine (**Fig. 1.7**). Suite à cette adhésion, le T4P se rétracte à sa base (Li et al., 2003), les cellules se rapprochent coordonnant un mouvement de groupe (Friedrich et al., 2014). Tout ceci est contrôlé par un système chimiotactique nommé « *Defect in fruiting body* » (Dif) contrôlant la production de l'EPS (Yang et al., 2000) et le système chimiotactique Frz permettant de réguler la localisation du pilus au pôle en avant ou en arrière de la cellule (Sun et al., 2000).

1.4.3 Les polysaccharides sécrétés chez *Myxococcus xanthus*

Myxococcus xanthus sécrète divers polysaccharides qui, comme définit précédemment, sont indispensables au bon déroulement du cycle de vie complexe chez *M. xanthus*.

1.4.3.1 Antigène O du lipopolysaccharide

Tout d'abord, *M. xanthus* possède un premier polysaccharide qui est l'antigène O du LPS (MacLean et al., 2007). Il est produit grâce à un groupe de gènes codant une machinerie transporteur ABC (Guo et al., 1996). L'antigène O du LPS joue un rôle dans la formation des corps fructifères et dans la motilité de type « *gliding* » et celle dépendante du T4P (Bowden and Kaplan, 1998; Fink and Zissler, 1989; Pérez-Burgos *et al.*, 2019)

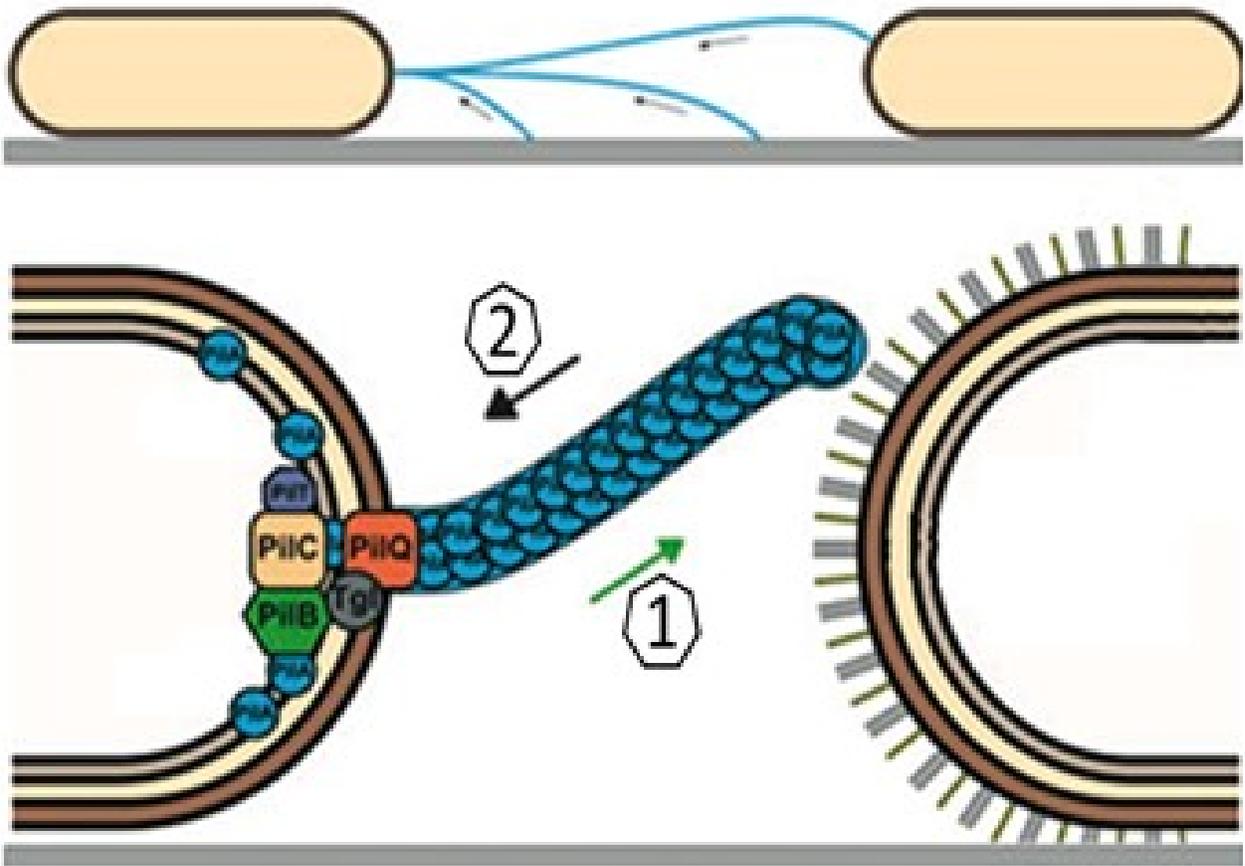


Figure 1.6 : Représentation schématique de la motilité T4P-dépendante

La motilité dépendante du T4P est une motilité de groupe utilisée par *M. xanthus*. Elle dépend du pilus de type IV qui va s'assembler et fixer une cellule voisine. Cette fixation engendre une rétractation à la base du pilus de type IV et provoque un rapprochement des cellules entre elles (Adapté de Zhang et al., 2012).

1.4.3.2 L'exopolysaccharide

M. xanthus synthétise aussi l'EPS qui est le polysaccharide intervenant dans la motilité dépendante du T4P. Là aussi un cluster de gènes code pour une machinerie Wzx/Wzy-dépendante (**Fig. 1.7**) (Lu et al., 2005). L'EPS est aussi une composante de la matrice extracellulaire chez *M. xanthus* qui une fois sécrété se trouve associé à la membrane externe (Behmlander and Dworkin, 1994b). La synthèse et production de l'EPS sont gouvernées par le système chimiotactique Dif (Yang et al., 1998; Yang et al., 2000). C'est un système de chimiotactisme homologue au système chimiosenseur Che chez *E. coli* (Bellenger et al., 2002) (Yang et al., 1998). L'EPS des cellules végétatives est composé principalement de galactose, glucosamine, glucose, rhamnose et xylose (Behmlander and Dworkin, 1994a).

1.4.3.3 Le polysaccharide du manteau de la spore

Le troisième connu est le polysaccharide formant le manteau de la spore (MASC). Il est produit grâce à un groupe de gènes codant pour une machinerie Wzx/Wzy-dépendante distincte de celle produisant l'EPS (**Fig. 1.7**) (Holkenbrink et al., 2014). Le polysaccharide composant le manteau des spores de *M. xanthus* est composé de *N*-acetyl-galactosamine, de glucose et de glycine (Holkenbrink et al., 2014).

1.4.3.3 Le polysaccharide de la motilité de type « *gliding* »

Il existe un dernier polysaccharide impliqué dans l'adhésion des cellules à la surface lors de la motilité de type « *gliding* » (Hoiczky et al., 2002; Yu and Kaiser, 2007). Ce polysaccharide fut étudié et identifié comme étant le substrat sur laquelle la partie à la membrane externe de la machinerie Agl-Glt se fixe pour former le point d'adhésion focale permettant aux cellules d'avancer (**Fig. 1.5B**). La machinerie qui le produit ou sa composition reste inconnues, seule son observation sous forme

de trainée derrière la cellule fut observée par microscopie et marquage du polysaccharide avec la lectine concanavalin A (**Fig. 1.5A**) (Ducret et al., 2012).

1.5 Problématique

Chez *M. xanthus*, pour récapituler, il existe deux machineries Wzx/Wzy-dépendantes connues produisant chacun un polysaccharide affectant l'organisation communautaire. Cependant, depuis des années il est connu que *M. xanthus* possède un gène orphelin codant pour une protéine qui est une Wza ; tout ce qui est connu est que ce gène n'est pas essentiel pour la présence de motilité de type « *gliding* » chez *M. xanthus* (Ducret et al., 2012). La présence de ce gène orphelin suggère la présence d'une troisième voie Wzx/Wzy-dépendante chez *M. xanthus*. Donc, il y a la possibilité qu'il existe un autre polysaccharide inconnu impliqué dans la physiologie complexe de cette bactérie. Mon objectif durant ma maîtrise était d'étudier la contribution de ce nouveau polymère putatif à la physiologie macroscopique de *M. xanthus*. Ensuite, j'ai étudié l'effet de l'absence de ce nouveau polysaccharide au niveau cellulaire et finalement les propriétés physico-chimiques du polymère.

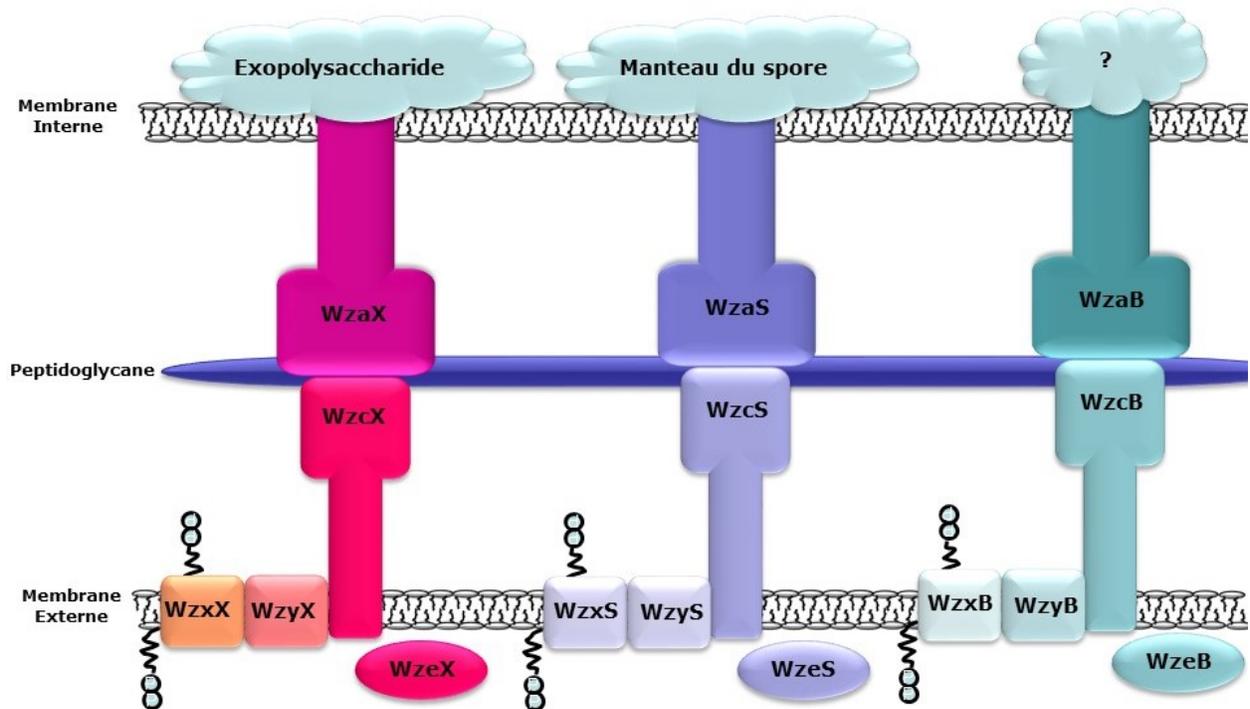


Figure 1.7 : Schéma des différentes machineries Wzx/Wzy-dépendante chez *M. xanthus*

Représentations des deux machineries complètes produisant l'EPS intervenant dans la motilité dépendante du T4P et le polysaccharide du manteau de la spore. Identification d'une nouvelle machinerie Wzx/Wzy-dépendante produisant un polysaccharide inconnu dont la fonction est inconnue.

2 Matériels et Méthodes

2.1 Les souches bactériennes utilisées

Les souches de *M. xanthus* utilisées sont listées au sein du Tableau 1.

2.2 Conditions de culture

La composition des différents milieux et tampons utilisés est présente au Tableau 2.2. *M. xanthus* croît sur un milieu solide composé de CYE (*casitone–yeast extract*) dans un incubateur maintenu à 32 °C. Elle croît aussi sur un milieu liquide CYE maintenu aussi à 32 °C au sein d'un incubateur et avec une agitation de 220 rpm. Le CYE contient 1% de casitone, 0.5% d'extraits de levures, 10 mM MOPS à pH 7,5, et 4 mM MgSO₄. Le tampon utilisé est du Tris phosphate magnésium (TPM) composé de 10 mM Tris (pH 7,6), 1 mM KH₂PO₄ et 8 mM MgSO₄.

2.3 Tests phénotypiques

On sédimente 15 mL de culture d'intérêt ayant poussé en phase exponentielle dans du CYE liquide à 32 °C durant la nuit avec une agitation de 220 rpm à 6000 × *g* pendant 5 min. On suspend le culot dans 10 mL de TPM et on mesure la densité optique (DO) à 600 nm. On centrifuge 1 mL de cette suspension à 6000 × *g* pendant 5 min. On remet en suspension dans le volume adéquat de tampon TPM pour avoir une DO₆₀₀ de 5.0. On inocule 5 µL de cette suspension à DO₆₀₀ de 5.0 sur une boîte de pétrie soit CYE 0.5% d'agar pour étudier la motilité dépendante du T4P, soit CF 1.5% d'agar pour étudier la formation des corps fructifères. Des images sont prises après 72 h avec un stéréoscope Olympus SZX16 équipé d'une caméra UC90 4K.

Tableau 2.1 : Souches bactériennes utilisées dans cette étude

<u>Souche bactérienne</u>	<u>Code</u>	<u>Description</u>	<u>Source</u>
DZ2	SI 1	Souche sauvage	(Campos and Zusman, 1975)
$\Delta mxan_{7417}$	TM469.1	Délétion du gène <i>wza</i> codant la protéine Wza ne produisant plus d'EPS	(Ducret et al., 2012)
$\Delta mxan_{1915}$	TM529	Délétion du gène <i>wza</i> codant la protéine Wza ne produisant plus de BPS	(Ducret et al., 2012)
$\Delta mxan_{3225}$	TM484.1	Délétion du gène <i>wza</i> codant la protéine Wza ne produisant plus le MASC	(Ducret et al., 2012)

Tableau 2.2 : Composition des milieux et des tampons

<u>Milieu de culture et tampon</u>	<u>Composition</u>
Casitone Yeast Extract (CYE)	1% de casitone 0.5% d'extraits de levures 10 mM MOPS à pH 7,5 4 mM MgSO ₄
CYE agar	1% de casitone 0.5% d'extraits de levures 10 mM MOPS à pH 7,5 4 mM MgSO ₄ 1,5% agar
Tris phosphate magnésium (TPM)	10 mM Tris (pH 7,6) 1 mM KH ₂ PO ₄ 8 mM MgSO ₄

2.4 Test d'autoagrégation

Une culture bactérienne d'intérêt a poussé durant la nuit dans du CYE liquide. On mesure la DO_{600} de cette culture. On prélève le volume adéquat c'est-à-dire le volume pour avoir une DO_{600} de 1.0. Ensuite on sédimente cette culture à $6000 \times g$ durant 5 min. On enlève le surnageant et on remet en suspension le culot soit dans 1 mL de CYE liquide. Ensuite on prélève 200 μ L de culture dans un des puits de la plaque 48 puits de marque Costar 3548 qu'on insère dans le néphélomètre (NEPHELOstar-BMG Labtech). Le néphélomètre mesure les particules en suspension dans le milieu liquide dans le temps via un laser qui passe à travers la culture bactérienne liquide qui rencontre des particules et se diffuse. Les faisceaux lumineux diffractés à 90° sont détectés par un photodétecteur situé sur le côté (**Fig. 2.1**). Plus une souche s'agrège au fond du puit, plus la valeur mesurée diminue. Une mesure est prise toutes les 145 s et ceci pendant 200 cycles. Les cultures ne doivent pas être remises en suspensions pendant les mesures. Le temps d'attente avant la mesure est de 0.4 s et le temps de mesure à chaque puit est de 5 s. L'intensité du laser est de 40% avec un Gain de 90 et la hauteur du faisceau du laser de 2.5 mm.

2.5 Test marquage au Trypan bleu

Le test Trypan bleu permet la mesure de la production de l'EPS chez *M. xanthus* car celui-ci a la propriété de se fixer à l'EPS produit par *M. xanthus*. On sédimente une culture bactérienne de la veille à $6000 \times g$ pendant 10 min. Le culot est resuspendu dans le tampon TPM à DO_{600} 1.0. Puis, 900 μ L de la suspension cellulaire est transféré dans un tube de 1.5 mL (900 μ L de tampon TPM sont ajoutés dans un autre tube pour le blanc). Dans chaque tube est ajoutée 100 μ L d'une solution de Trypan bleu possédant une concentration de 100 μ g/mL puis chaque tube est mélangé via 1 s au vortex. Ensuite, tous les tubes sont placés dans un raque couvert par de l'aluminium afin de les protéger de la lumière et incubés 1 h sur un agitateur. Par la suite, les tubes sont sédimentés à $16\ 000 \times g$ pendant 5 min afin de

séparer les cellules du surnageant. Pour ne pas toucher ou resuspendre le culot, prélever 900 μL du surnageant qu'on transfère dans une cuvette acrylique de spectrophotomètre afin de lire l'absorbance à 585 nm afin de mesurer la concentration de Trypan bleu encore présente dans le surnageant. Le blanc est donc fait avec le tube contenant le mélange 900 μL de TPM avec 100 μL de Trypan bleu correspondant aux tubes où tout le Trypan bleu est présent dans le surnageant dû à l'absence de bactéries. Pour chaque surnageant des différentes souches, la normalisation se fait sur la souche wild type (WT).

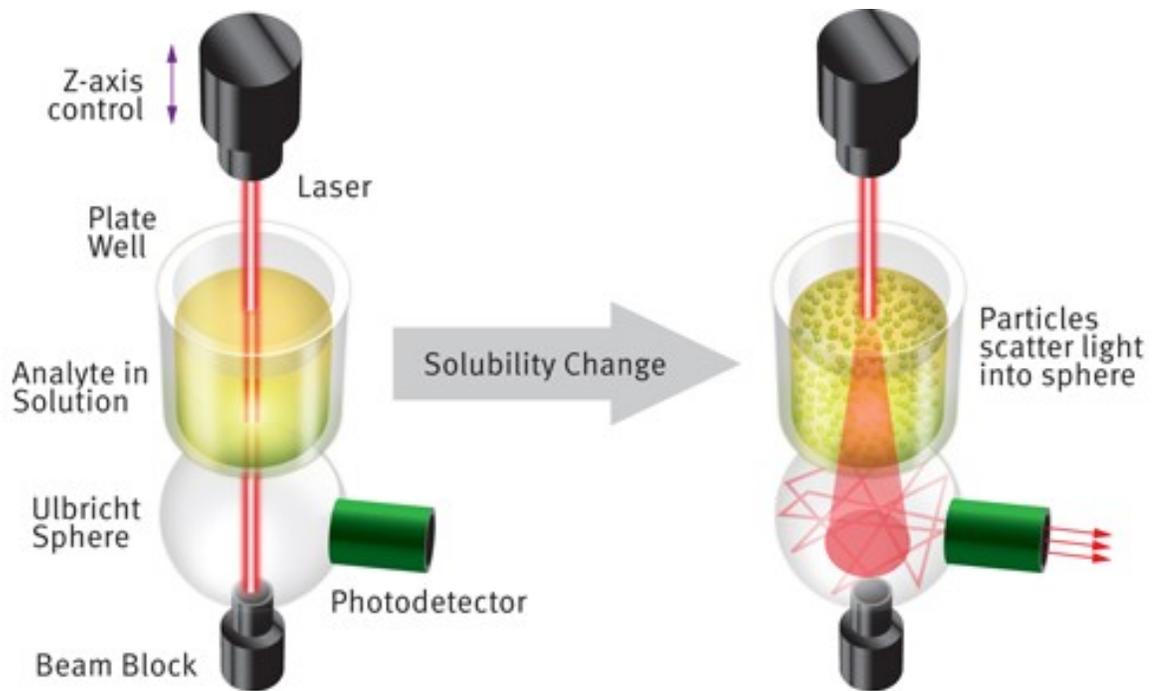


Figure 2.1 : Principe du néphélomètre

À gauche, le laser passant à travers une solution avec peu d'agglutination se diffracte peu et donc passe à peu à travers le photodétecteur. À la suite de l'agrégation, quand le laser passe à travers la solution, le laser se diffracte plus et donc passe à travers le photodétecteur. (Figure issue de Carl Peters BMG LABTECH Inc., NC, USA 06/2017)

2.6 Analyse de la motilité de type « *gliding* »

2.6.1 Microscopie

Une culture cellulaire de la veille est sédimentée à $6000 \times g$ pendant 5 min et resuspendue dans le tampon TPM à une DO_{600} de 5.0. Un volume de 5 μ L est prélevé puis mis sur une lamelle avec par-dessus un carré de TPM-agar à 1.5%. Le dispositif est laissé pendant 10 min à 32 °C pour que les cellules puissent adhérer sur la surface TPM-agar. Ensuite, une image est prise toutes les 30 s avec un microscope confocale, LSM780 équipé d'un laser diode à 405 nm et à 30 Mw. Le logiciel utilisé pour prendre les images est Zen 2011 (Zeiss). L'objectif à huile utilisé est l'EC Plan-Neofluar avec un grossissement de 40 \times .

2.6.2 Logiciel Image J

L'analyse des films obtenus est faite en utilisant le module MicrobeJ du logiciel d'imagerie Image J afin d'obtenir la vitesse des cellules ainsi que le nombre de réversions. Les paramètres appliqués afin d'analyser les vidéos sont listés au sein du Tableau 2.3 (Ducret et al., 2016).

2.7 Test émulsifiant

Une culture est inoculée à une DO_{600} de 0.05 et laissé croître à 32 °C avec une agitation de 220 rpm, jusqu'à une DO_{600} de comprise entre 5.0 et 7.0. Puis la culture est transférée dans un tube de 50 mL et sédimentée à $7000 \times g$ pendant 25 min à 22 °C (JA-17 rotor). 4 mL du surnageant filtré et transféré dans une cuvette en Quartz. Est ajouté à ces 4 mL, 300 μ L d'hexadécane contenant du colorant soudan noir (0.1 g de soudan noir dans 50 mL d'hexadécane) et mélangé via un vortex pendant 1 min. Immédiatement après le mélange, nous prenons une vidéo de 1 minute et comparons la vitesse à laquelle les deux phases se séparent.

Tableau 2.3 : Paramètres de réglages du module d'extension MicrobeJ

<u>Réglages</u>	<u>Minimum</u>	<u>Maximum</u>
Région (en pixel)	30	800
Longueur (en pixel)	10	Maximum
Largeur (en pixel)	1.5	Maximum
Durée de vie (en image)	20	Maximum
Seuil de déplacement (en pixel)	20	Maximum

2.8 Test de tension de surface

Tout d'abord, une nouvelle culture de 50 mL de CYE commençant à une DO_{600} 0.05 est laissée croître à 32 °C et une agitation de 220 rpm, jusqu'à une DO_{600} 5.0 – 7.0. Puis la culture est transférée dans un tube de 50 mL et sédimenté à $7000 \times g$ pendant 25 min à 22 °C (JA-17 rotor). Le surnageant est ensuite repéré et filtré à 0.22 micron afin d'enlever toutes les cellules. La tension de surface est mesurée avec un tensiomètre de surface manuelle (*Fisher surface tensiometer Model 20*). L'eau à l'osmose inversée est utilisée comme contrôle de calibration ainsi que le CYE sans bactérie ayant poussé dedans. La tension de surface est mesurée 3 fois pour chaque échantillon, les contrôles compris.

3 RÉSULTATS

3.1 Étude de l'effet de l'EPS et du nouveau polysaccharide putatif sur la macro-organisation

Afin de tester l'hypothèse qu'il y avait un produit d'une troisième voie Wzx/Wzy-dépendante qui impact le cycle de vie de *M. xanthus*, nous avons procédé à divers tests permettant d'étudier en premier lieu la motilité dépendante du T4P puis la formation des corps fructifères chez des mutants défectueux pour chacune des voies Wzx/Wzy-dépendantes connues (**Fig. 3.1**). Pour le mutant défectueux dans la production du MASC (MASC⁻), j'ai observé encore de la motilité médiée par les T4P (**Fig. 3.1A,B**), en accord avec l'activation de cette voie pendant les phases développementales et pas au cours des phases végétatives (Muñoz-Dorado et al., 2019). Comme prévu, le mutant ne produisant plus d'EPS (EPS⁻) a montré une motilité dépendante du T4P éliminé (**Fig. 3.1A**) (Lu et al., 2005). Il est intéressant de noter que le mutant BPS⁻ de la nouvelle voie Wzx/Wzy-dépendante — nommer BPS (pour « *bioemulsifier polysaccharide* », décrit ci-dessous) — présente une morphologie crêpelée distincte du swarm des autres souches et l'expansion du *swarm* BPS⁻ est réduit par rapport à celle du WT, mais plus importante que celle de l'EPS⁻ (**Fig. 3.1A,B**).

En conditions de carences nutritives, toutes les souches montraient une capacité d'agréger en tas sauf la souche EPS⁻ qui possède un défaut pour son développement avec une absence de maturation et une impossibilité de former des corps fructifères matures (**Fig. 3.1A**), en accord avec l'importance du T4P en la formation de ces structures macroscopiques (Shimkets, 1999; Wu and Kaiser, 1995). Il est notable que le mutant BPS⁻ forme bien les corps fructifères (**Fig. 3.1A**). Ensemble, les différences entre les souches pour la formation des corps fructifères et la motilité médiée par les T4P suggèrent qu'il y a bien un produit distinct synthétisé par la voie BPS qui affecte la physiologie de *M. xanthus*.

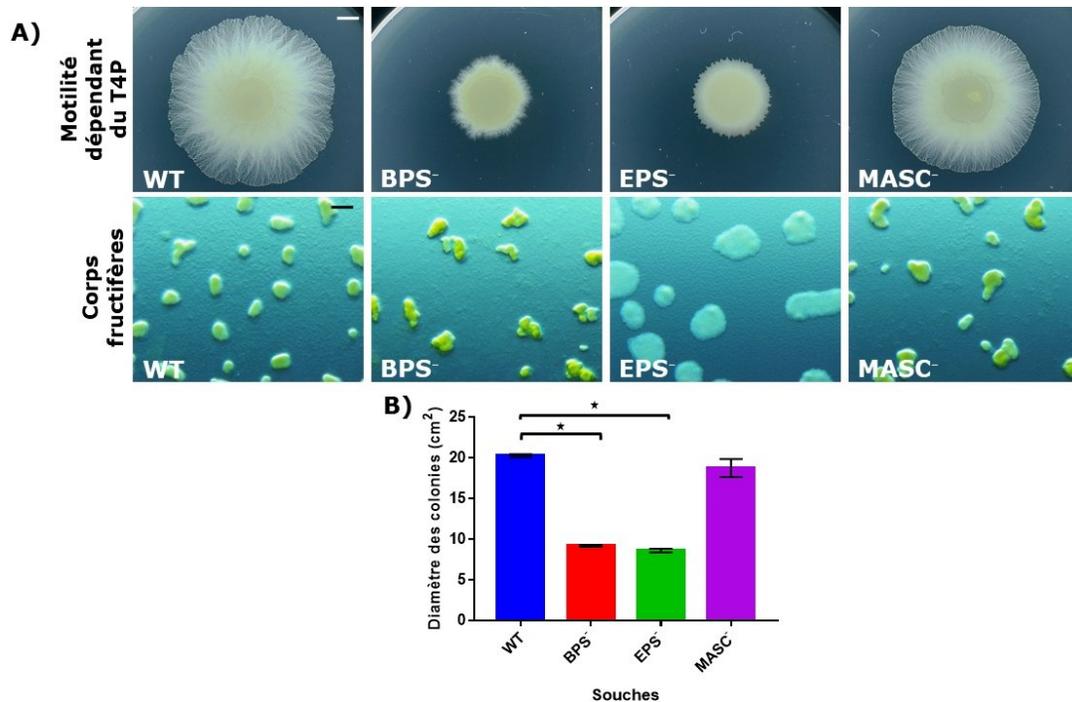


Figure 3.1 : Test phénotypique de la motilité dépendante du T4P et de la formation des corps fructifères

(A) Image d'études phénotypiques sur des mutants affectant la production d'EPS ($\Delta mxan_{7417}$), de BPS ($\Delta mxan_{1915}$) ou de MASC ($\Delta mxan_{3225}$). Image de la motilité dépendante du T4P après 72 h à 32 °C en haut (Échelle : 2 mm) observé sur boîte de CYE-agar à 0.5% d'agar. Étude de la formation des corps fructifères après 72 h à 32 °C en bas (Échelle : 200 μ m) avec de CF-agar à 1.5% d'agar. 3 répliquas biologiques ont été comparés. **(B)** Histogramme du diamètre des colonies des souches WT, BPS⁻ ($\Delta mxan_{1915}$), EPS⁻ ($\Delta mxan_{7417}$), MASC⁻ ($\Delta mxan_{3225}$) de 4 répliquas biologiques (+/- SEM). Le test statistique de Wilcoxon-Mann-Whitney fait entre la souche WT et BPS⁻ et entre la souche WT et EPS⁻ est statistiquement significatif (★) ($p = <0.05$).

3.2 Étude de complémentation de l'EPS et du BPS

Suite à l'observation d'un défaut dans la motilité dépendante du T4P chez les mutants ne produisant plus le BPS, j'ai étudié la possibilité de compléter cette déficience en mélangeant deux souches soit celle affectée pour la production de l'EPS et celle affectée pour la production du BPS en les mélangeant à divers pourcentages respectivement 50%, 10% ou 90%.

Pour un mélange des souches BPS⁻ et EPS⁻ à un ratio de 50% : 50%, j'ai observé un rétablissement de la motilité dépendante du T4P comparée à celle du WT (**Fig. 3.2**). Un ratio de mélange des souches avec 90% BPS⁻ : 10% EPS⁻ a aussi été testé et j'ai observé qu'en introduisant à peine 10% de cellules capables de produire du BPS (i.e. EPS⁻) on rétablit fortement la motilité dépendante du T4P (**Fig. 3.2**). Pour le ratio de mélange des souches avec 90% EPS⁻ : 10% BPS⁻, on voit un rétablissement faible de la motilité dépendante du T4P, plus faible que pour le ratio 90% BPS⁻ : 10% EPS⁻. Cela suggère que EPS et BPS peuvent être partagés entre cellules, mais aux niveaux différents.

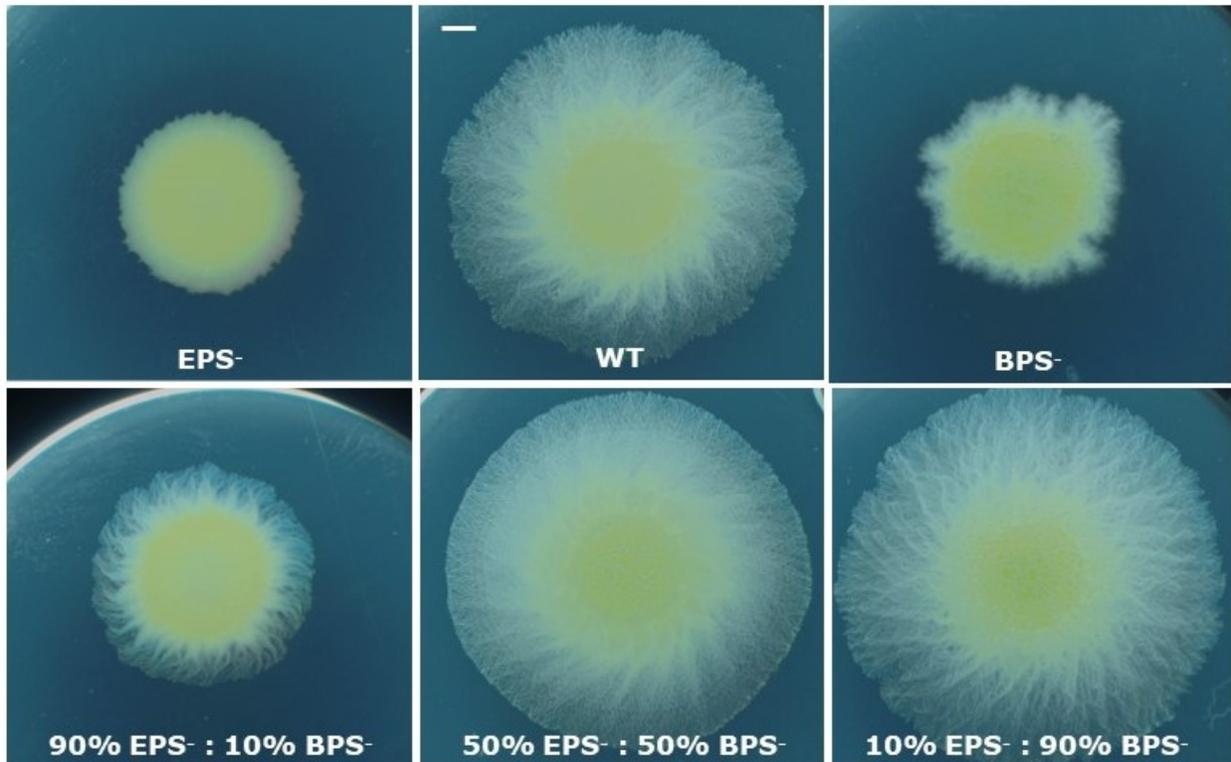


Figure 3.2: Complémentation de la motilité dépendante du T4P entre la souche EPS⁻ et BPS⁻

Image d'étude phénotypique de la motilité dépendante du T4P suite à un test de complémentation en mélangeant à divers ratios, une souche ne produisant plus d'EPS (EPS⁻, *Δmxan_7417*) et une ne produisant plus de BPS (BPS⁻, *Δmxan_1915*). 3 répliques biologiques ont été comparés (Échelle : 2 mm).

3.3 Étude de la motilité de type « *gliding* » et de l'effet du BPS sur celle-ci

Le BPS affecte *M. xanthus* dans sa capacité à utiliser la motilité des groupes de cellules dépendante du T4P. Suite à cette observation ma question fut affecte-t-il la motilité des cellules individuelles ? Pour cela j'ai fait des films par microscopie optique des cellules individuelles se déplaçant sur un bloc d'agar dur (1.5 %) et j'ai étudié les films obtenus par l'utilisation du module d'extension MicrobeJ du logiciel ImageJ (Ducret et al., 2016). Les cellules BPS⁻ se déplacent plus rapidement que le WT alors que les cellules EPS⁻ se déplacent plus lentement (**Fig. 3.3A**). J'ai aussi étudié la capacité de réversion des différentes souches (**Fig. 3.3B**). J'ai observé que les cellules EPS⁻ reculent plus fréquemment que le WT, en accord avec les données publiées (Zhou and Nan, 2017). Par contre, les cellules BPS⁻ reversent moins souvent que le WT.

3.4 Rôle du BPS sur la surface des cellules bactériennes

3.4.1 Autoagrégation

Suite à nos observations sur l'effet du BPS sur *M. xanthus* autant sur le plan macroscopique que celui des cellules individuelles (**Figs. 3.1 et 3.3**), j'ai étudié la capacité des cellules des différents mutants d'auto-agrégation pour comprendre les changements à la surface cellulaire. Pour cela, j'ai développé l'utilisation du néphélomètre afin de déterminer le taux de particules présent en suspension dans un milieu liquide (**Fig. 2.1**). Ceci détermine la turbidité d'un milieu en mesurant les faisceaux diffractés par les particules en suspension à 90° et capturés par le capteur situé sur le côté (**Fig. 2.1**). J'ai mesuré la turbidité de 200 µL de culture bactérienne normalisée à une DO₆₀₀ de 0.5. Plus les cellules auto-agrégent plus la présence de particules en suspension dans le milieu diminue. J'ai observé que la souche BPS⁻

forme des particules plus larges plus vite que la souche WT (**Fig. 3.4**). Alors que la souche EPS⁻ n'auto-agrège pas dans le temps (**Fig. 3.4**).

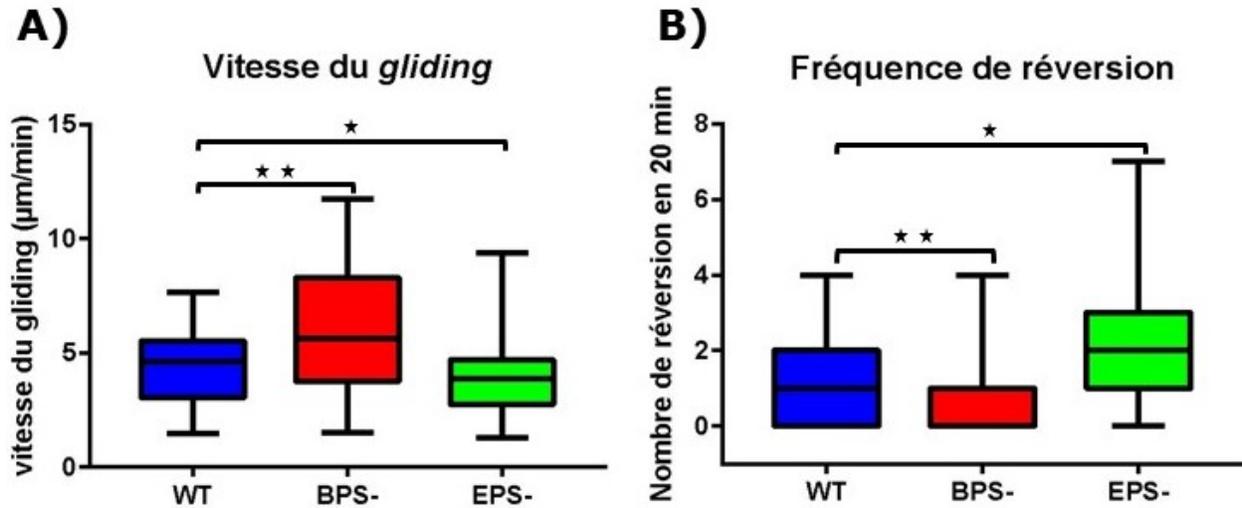


Figure 3.3 : Analyse de la motilité de type « gliding »

(A) Diagramme en boîte de l'analyse de la vitesse moyenne ($\mu\text{m}/\text{min}$) des cellules utilisant le « gliding », avec la barre inférieure représentant le premier quartile et la barre supérieure représentant le troisième quartile. La barre du milieu représente la médiane. Le nombre de cellules analysées est de 109 pour chaque souche. Le test statistique de Wilcoxon-Mann-Whitney fait entre la souche WT et BPS⁻ ($\Delta mxan_{1915}$) est statistiquement significatif, (★★) ($p = <0.0001$) et entre la souche WT et EPS⁻ ($\Delta mxan_{7417}$) est statistiquement significatif (★) ($p = <0.0090$). **(B)** Diagramme en boîte de l'analyse du nombre de réversions moyen par cellules pendant 20 min avec la barre supérieure représentant le troisième quartile. La barre inférieure représente le second quartile pour la souche WT, pour la souche BPS⁻ ($\Delta mxan_{1915}$) elle représente la médiane, pour la souche EPS⁻ ($\Delta mxan_{7417}$) le premier quartile. La barre du milieu de la boîte représente la médiane. Le nombre de cellules analysées est de 109 pour chaque souche. Le test statistique de Wilcoxon-Mann-Whitney fait entre la souche WT et BPS⁻ ou WT et EPS⁻ sont statistiquement significatifs, (★★) ($p = <0.0001$)

Test Autoagrégation

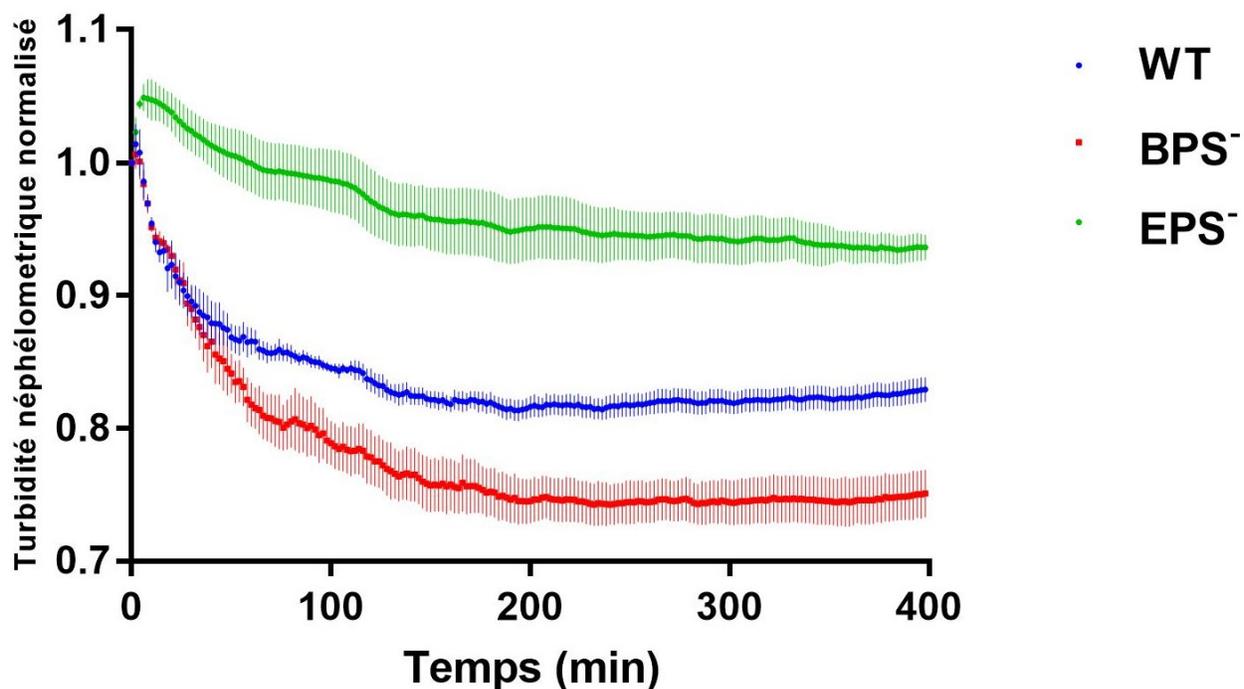


Figure 3.4 : Observation de l'autoagrégation dans le temps via néphélométrie

Observation de la capacité autoagrégative de la souche WT, la souche EPS⁻ ($\Delta mxan_7417$) et BPS⁻ ($\Delta mxan_1915$). La mesure fut faite via le néphélomètre qui mesure la concentration de particules en suspension de 200 μ L de culture normalisée à une DO₆₀₀ initiale de 0.5 pendant 400 min. Chaque courbe représente la moyenne des triplicatas biologiques (+/- SEM) pour chaque souche normalisée sur le premier point de mesure du néphélomètre.

3.4.2 Mesure la quantité d'EPS à la surface des cellules de *M. xanthus*

Afin de comprendre l'impact de l'absence du BPS à la surface des cellules et l'interaction du BPS et l'EPS à cette même surface, j'ai fait des tests de fixation du colorant Trypan bleu. Le taux de Trypan bleu fixé aux cellules est lié à la quantité d'EPS sur la surface des cellules (Arnold and Shimkets, 1988; Black and Yang, 2004). Ce test consiste à mettre en contact une resuspension cellulaire de *M. xanthus* normalisée à DO_{600} 1.0 avec une solution aqueuse de Trypan bleu ; plus une souche produit de l'EPS, plus le Trypan bleu se fixe aux cellules. On récupère le surnageant et on observe le taux restant en Trypan bleu dans le surnageant non fixé aux cellules. Moins une cellule produit de l'EPS plus on trouvera le Trypan bleu au surnageant. J'ai testé les souches WT, BPS⁻, EPS⁻, et MASC⁻ et observé que la souche BPS⁻ fixe plus de Trypan bleu que la souche WT. Chez la souche EPS⁻ la fixation de Trypan bleu est très impactée, pour la souche MASC⁻ le taux est équivalent au WT (**Fig. 3.5**).

3.5 Propriété du nouveau BPS

Suite à l'observation que j'ai faites sur les cellules BPS⁻ montrant le défaut de motilité dépendante du pilus de type IV (**Fig. 3.1**) et la plus forte autoagrégation de la souche ne produisant plus le BPS (**Fig. 3.4**), j'ai émis la possibilité que ce BPS soit une molécule active de surface avec une activité émulsifiante ou surfactante. Donc, j'ai testé la capacité des surnageants aqueux filtrés des cultures de haute densité à stabiliser une émulsion avec l'hexadécane, un liquide hydrophobe. L'idée de ce test est que s'il y a la présence d'un polysaccharide sécrété, plus longtemps les cellules croissent, plus le surnageant sera riche de ce polysaccharide; plus l'émulsion de ce surnageant avec l'hexadécane deviendra stable (Guellil et al., 1998; Rosenberg et al., 1980). J'ai pris des vidéos afin d'observer la séparation entre le surnageant et l'hexadécane dans le temps. Pour la souche BPS⁻ la séparation des deux phases observée par l'éclaircissement du surnageant mélangé à l'hexadécane est plus rapide que pour le WT avec une visibilité maximale de la différence à 25 secondes (**Fig. 3.6**).

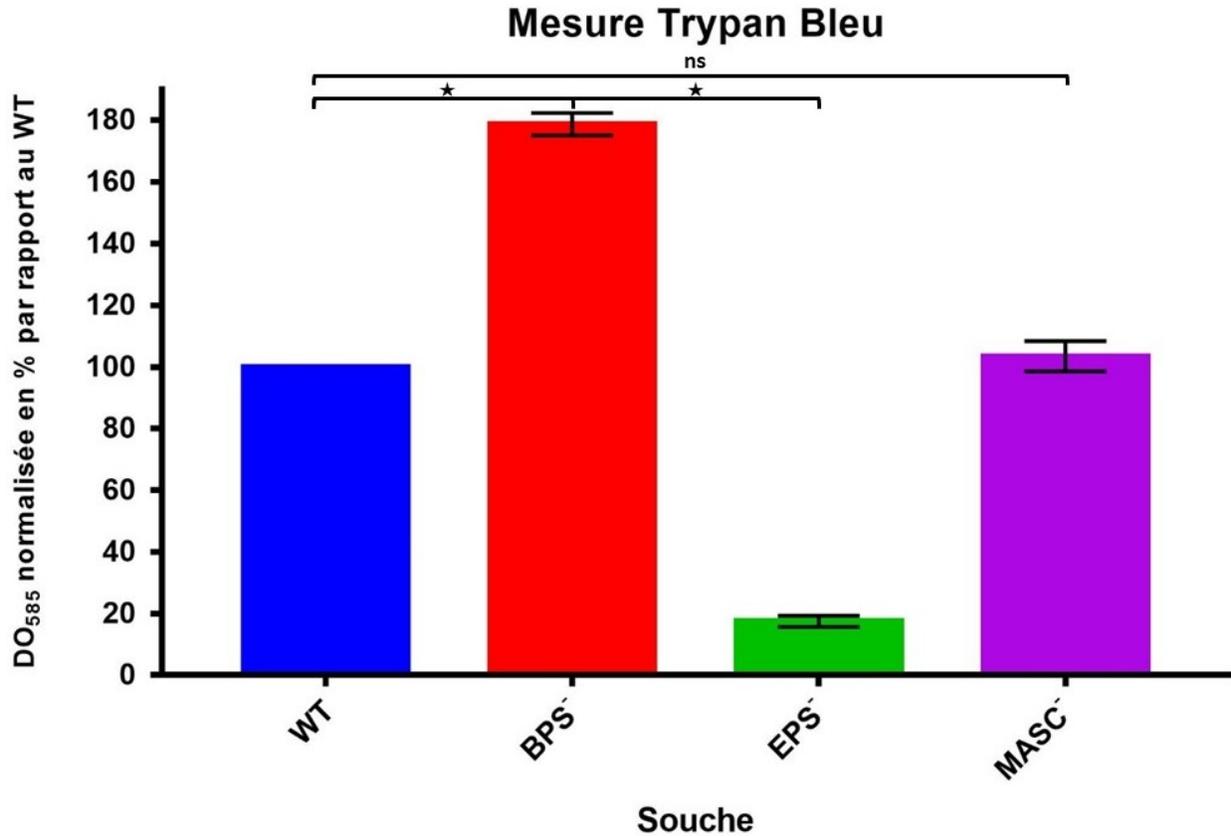


Figure 3.5 : Mesure de la production de l'EPS chez la souche WT, BPS⁻, EPS⁻ et MASC⁻

Histogramme de la mesure de la production de l'EPS chez la souche WT, la souche BPS⁻ (*Δmxan_1915*) et EPS⁻ (*Δmxan_7417*) comparé à la souche WT. Plus la mesure du Trypan bleu est forte, plus une souche produit de l'EPS. La moyenne de 6 répliques biologiques est représentée ici (+/- SEM). Le test statistique de Wilcoxon-Mann-Whitney fait entre la souche WT et BPS⁻ et entre la souche WT et EPS⁻ est statistiquement significatif (★) ($p = 0.0313$). Le test statistique de Wilcoxon-Mann-Whitney fait entre la souche WT et MASC⁻ est statistiquement non-significatif (ns).

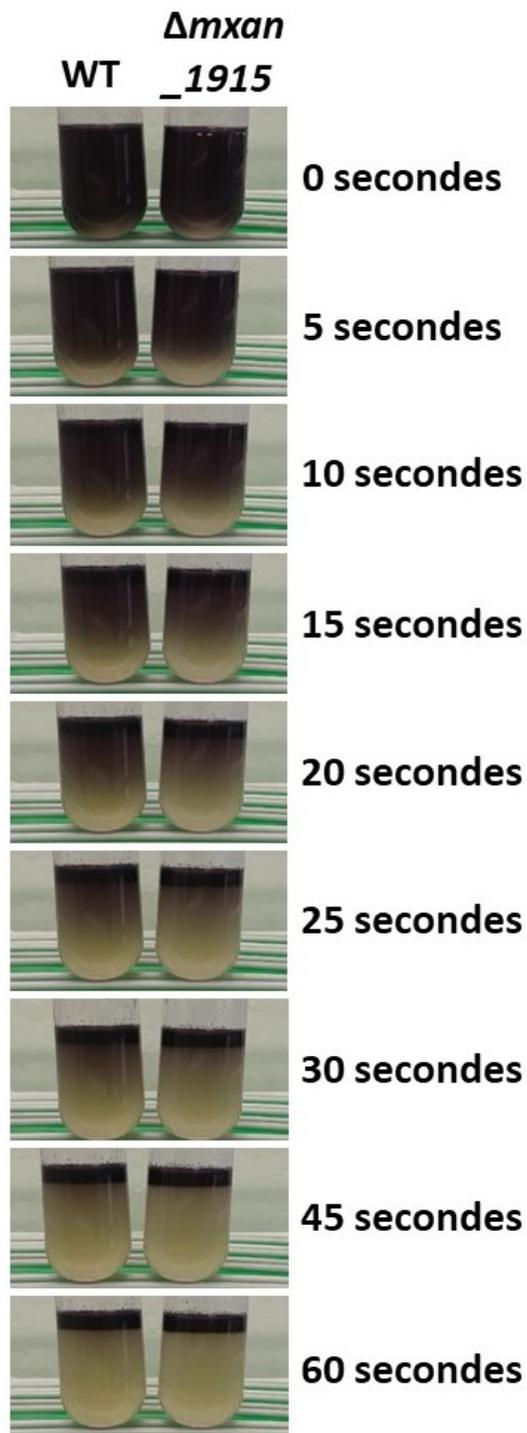


Figure 3.6 : Test de la propriété émulsifiante

Images correspondant à la vidéo du mélange entre le surnageant de la souche WT ou la souche ne produisant plus de BPS avec l'hexadécane. Nous observons la vitesse de séparation au cours du temps.

Ensuite, la littérature montre que certains polysaccharides possédant des propriétés bio-émulsifiantes possèdent aussi des propriétés tensioactives (Uzoigwe et al., 2015). Donc afin de mettre en évidence une possible propriété tensioactive, j'ai utilisé un tensiomètre manuel. Celui-ci consiste à submerger dans le liquide qu'on souhaite tester un anneau en platine et le remonter jusqu'à ce qu'il sorte du milieu liquide et une aiguille nous indiquant la force utilisée pour le remonter. Pour étalonner le tensiomètre, j'ai utilisé l'eau à osmose inversée. J'ai ensuite mesuré la tension de surface du CYE comme contrôle négatif. Ensuite, j'ai mesuré la tension de surface des surnageants de haute densité venant des souches WT, EPS⁻ et BPS⁻. Pour la souche WT, la tension de surface est à 66.37 mN/m (+/- 0.35), pour la souche EPS⁻ la tension de surface est de 63.47 mN/m (+/- 2.42) et pour la souche BPS⁻ elle est de 66.35 mN/m (+/- 2.60). À noter que le CYE possède une tension de surface à peu près identique aux trois souches testées de 62.4 mN/m (+/- 0.1).

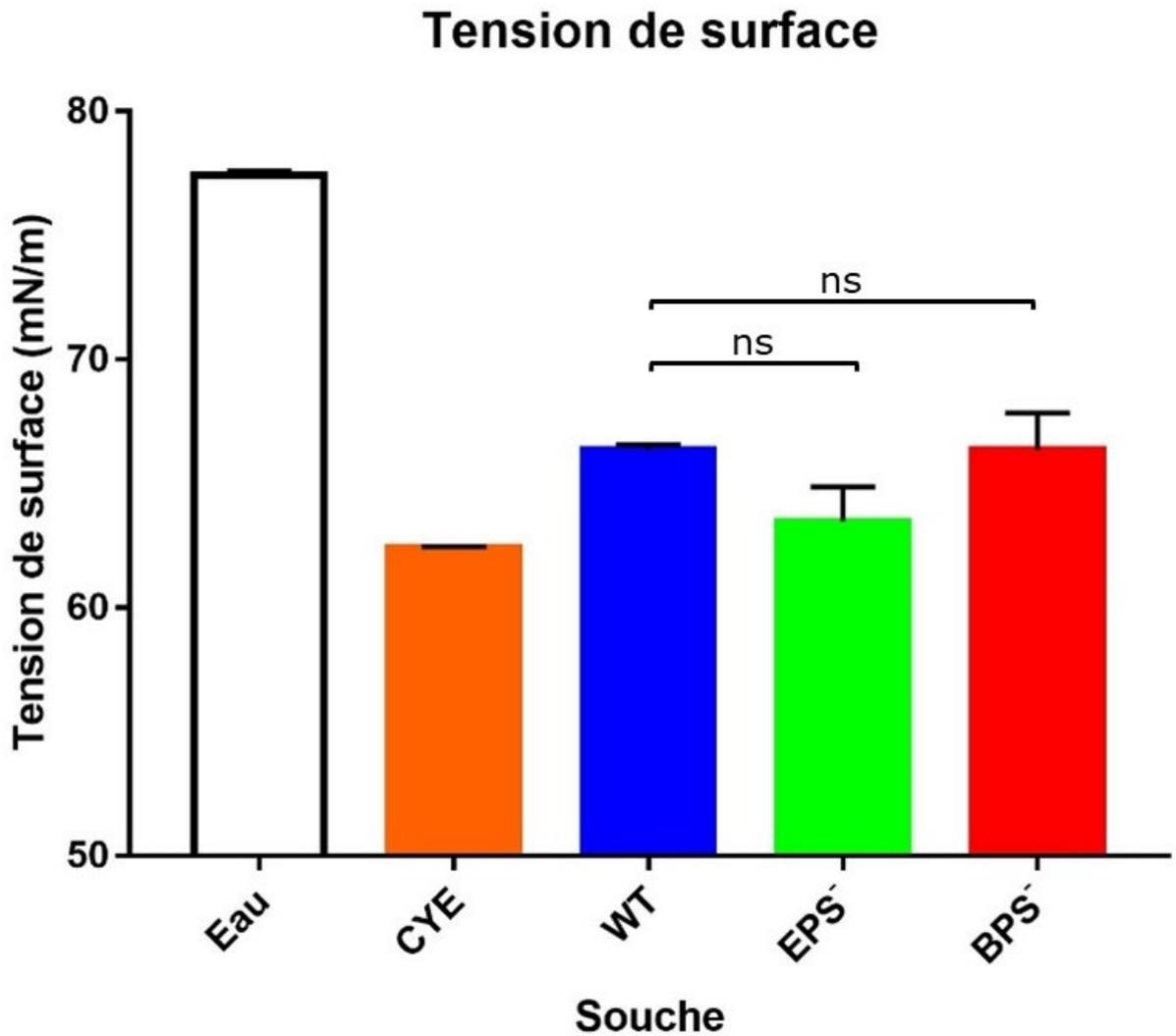


Figure 3.7 : Mesure de la tension de surface des souches sauvage, EPS⁻ et BPS⁻

Histogramme de la mesure de la tension de surface chez différentes souches en triplicatas. La tension de surface de l'eau à osmose inversée sert de contrôle d'étalonnage. Le test du CYE est un contrôle négatif. WT, EPS⁻ ($\Delta mxan_7417$) et BPS⁻ ($\Delta mxan_1915$) correspondent au surnageant des souches testées pour la tension de surface avec la moyenne pour chaque souche d'un triplicata biologique (+/- SEM). Le test statistique de Wilcoxon-Mann-Whitney fait entre la souche WT et BPS⁻ ($p = 0.7$) et entre la souche WT et EPS⁻ ($p = 0.1$) est statistiquement non-significatif (ns).

4 Discussion

Mes résultats supportent la sécrétion d'un nouveau polysaccharide chez *M. xanthus* qui impacte plusieurs aspects physiologiques de cette bactérie, en particulier l'organisation communautaire grâce à la modulation de la motilité T4P-dépendante et la motilité de type « *gliding* », les deux qui influencent la formation des corps fructifères. Comme les voies Wzx/Wzy-dépendantes sont très spécifiques avec leurs substrats (i.e. elles ne sont pas modulaires avec multiples Wza fonctionnant avec une seule paire de Wzx et Wzy), il est très probable qu'il existe une voie Wzx/Wzy-dépendante complètement distincte pour la production de BPS, incluant des composants Wzx, Wzy, et Wzc pour fonctionner avec le Wza caractérisé dans ce mémoire. Mes travaux m'ont permis aussi d'observer que le BPS possède une propriété bioémulsifiante, d'où le nom « *bioemulsifier polysaccharide* » pour le produit proposé.

4.1 EPS et BPS, effets distincts sur l'organisation d'une colonie

Lors du test phénotypique visant à étudier la motilité dépendante du T4P on observe un impact de l'absence de l'EPS déjà connu dans la littérature (Lu et al., 2005) (**Fig. 3.1**). Par contre, l'absence de BPS impacte aussi la motilité dépendante du T4P, mais de façon différente. De même pour la formation des corps fructifères ou l'absence d'EPS empêche la formation de corps fructifères matures (Lu et al., 2005) alors qu'en absence de BPS n'empêche pas la formation de ces structures. Ces résultats nous indiquent clairement une action différente des deux polysaccharides, l'EPS et le BPS sur l'organisation des cellules. Ces deux polysaccharides produits chacun par sa propre machinerie Wzx/Wzy-dépendante ajouté au polysaccharide du manteau de la spore lui aussi produit par le même type de machinerie montrent le rôle essentiel joué par les polysaccharides dans la multicellularité chez *M. xanthus*.

4.2 Échange des divers polysaccharides au sein d'une communauté

En souhaitant tester la complémentation entre une souche ne produisant plus l'EPS et une ne produisant plus le BPS on voit aussi que les polysaccharides produits par *M. xanthus* sont un bien commun échangeable au sein d'une colonie. On observe que le mélange de 50% de souche EPS⁻ et BPS⁻ rétablit la motilité dépendante du T4P comme chez le WT (**Fig. 3.2**). Étant donné que pour avoir une motilité dépendante du T4P optimale *M. xanthus* a besoin des deux polysaccharides, c'est-à-dire l'EPS et le BPS, donc la souche EPS⁻ récupère l'EPS produit par la souche BPS⁻ et le BPS provient lui de la souche EPS⁻. Cette observation fait naître la question de savoir si l'un des deux polysaccharides est plus facilement échangeable entre les cellules ? Le test de mélange à ratio 90% EPS⁻ : 10% BPS⁻ et 90% BPS⁻ : 10% EPS⁻ nous donne une piste de réponse. À l'ajout de 10% de cellules EPS⁻ c'est-à-dire capable de produire du BPS on observe via le test phénotypique un retour de la motilité dépendante du T4P important. Ceci nous permet de s'orienter vers le fait que le BPS s'échange plus facilement que l'EPS.

4.3 Effet du BPS sur la motilité de type « *gliding* »

Afin de comprendre l'effet du BPS sur les cellules au niveau individuel, nous avons étudié la vitesse de « *gliding* ». On voit que la souche BPS⁻ possède une vitesse plus élevée et recule moins fréquemment. Pour la souche ne produisant plus l'EPS, l'effet est inverse. C'est-à-dire que l'absence de l'EPS a pour effet une diminution de la vitesse de « *gliding* » et une augmentation de la fréquence des réversions. Les résultats concernant l'absence de l'EPS sont déjà observés dans la littérature (Zhou and Nan, 2017) et confirmés par mes observations. Ce résultat appuie notre observation selon laquelle les polysaccharides sécrétés sont importants pour la construction et l'organisation de communauté organisée et complexe où l'on observe une différence d'action des divers polysaccharides sur les cellules sur la

motilité de type « *gliding* », c'est-à-dire sur les cellules au niveau individuel et sur la capacité à reverser de celles-ci.

4.4 Rôle du BPS sur la surface des cellules bactériennes

Dans le but de comprendre l'effet de l'absence du BPS sur la surface des cellules bactériennes chez *M. xanthus*, j'ai étudié la capacité des cellules à auto-agréger. J'ai observé que la souche ne produisant plus l'EPS perdent la capacité autoagrégitrice comparée à la souche WT qui auto-agrège (**Fig. 3.4**) ; ceci correspond à ce qui a été observé dans la littérature (Lu et al., 2005). Pour la souche ne produisant plus le BPS, on observe une auto-agrégation plus rapide que la souche WT (**Fig. 3.4**). Ceci montre que le BPS affecte la surface cellulaire.

Afin de continuer dans l'étude de la surface cellulaire, on étudie la production de l'EPS par les cellules via la mesure de fixation de Trypan bleu. La souche affectée pour la production du BPS montre une fixation du Trypan bleu plus forte que chez le WT (**Fig. 3.5**). Ceci confirme un changement à la surface cellulaire et donc un effet du BPS sur la surface cellulaire. Il y a deux possibilités : (i) le BPS chez la souche WT interagît à la surface avec l'EPS afin de créer la bonne propriété de surface pour le bon développement de *M. xanthus*, où (ii) dans le mutant BPS⁻, l'EPS est surproduite et que ça affecte profondément les propriétés de la surface de *M. xanthus*.

4.5 Propriété du BPS

Les résultats de (i) la stabilisation de surnageants aqueux mélangés avec l'hexadécane (**Fig. 3.6**), et (ii) l'absence d'une réduction en tension de surface significative des surnageants (**Fig. 3.7**) supportent la désignation du polymère BPS putative comme bioémulsifiant. Ceci est en correspondance avec sa capacité d'agir au niveau macroscopique jusqu'au niveau cellulaire. Observer cette capacité n'est

pas surprenant, car les bioémulsifiants chez les bactéries sont utiles à faciliter l'accaparement de nutriments utiles au bon développement.

Une autre conclusion naissante du test m'ayant permis d'établir la propriété bioémulsifiante du BPS émerge : le fait que cette propriété était observée au sein du surnageant que nous avons récupéré des cultures cellulaires nous permet de penser que le BPS est une molécule sécrétée par les cellules au sein du surnageant.

5 Perspectives

La mise en évidence de cette nouvelle machinerie qui produit ce nouveau polysaccharide étant un bioémulsifiant change toute la vision de comment marche cette bactérie *M. xanthus*, mais surtout sur la fonction des polysaccharides dans la formation des structures complexes.

J'ai réussi à montrer de manière évidente la fonction de différents polysaccharides dans certains mécanismes afin de permettre cette complexification. La littérature montre que la production de l'EPS par la machinerie Wzx/Wzy-dépendante est contrôlée par le T4P et le système de chimiotactisme Dif (Black et al., 2006; Yang et al., 2000). Une première question qui naît sur le BPS est comment il est régulé ? Le T4P joue-t-il un rôle dans la régulation de la production du BPS ? Pour ceci nous pouvons tester l'absence du T4P sur la production du BPS en testant une souche ne possédant plus le T4P et produisant le BPS et tester la capacité émulsifiante.

Identifier un système chimiotactique qui pourrait contrôler la production du BPS peut s'avérer plus compliqué. D'abord, une étape simple est de savoir grâce aux divers tests que j'ai utilisés si un mutant du système chimiotactisme Dif agit sur la production du BPS positivement ou négativement. Une autre idée serait d'observer les phénotypes des divers mutants des divers systèmes de chimiotactismes, travail fait dans la littérature précédemment (Moine et al., 2014). Ensuite, il sera important de corrélérer ses phénotypes avec les phénotypes observés chez la souche ne produisant plus le BPS et de concentrer notre intérêt sur celle-ci.

Il est connu que le système CRISPR-Cas est un système permettant la défense contre des organismes insérant des éléments génétiques mobiles comme les bactériophages (Barrangou et al., 2007; Labrie et al., 2010). CRISPR est un composé de multiples séquences répétées d'une trentaine de bases en général espacé par des séquences non répétées d'environ une soixantaine de paires de bases. Ces séquences CRISPR sont accompagnées de plusieurs gènes *cas* codants pour des protéines CAS

intervenants avec un CRISPR RNA pour activer la défense des éléments génétiques transposables (Barrangou et al., 2007; Labrie et al., 2010; Westra et al., 2014). Des travaux ont permis de mettre en exergue que le système CRISPR-Cas intervient aussi dans la régulation de gènes endogènes intervenants dans la régulation comme la formation des biofilms et la motilité chez *Pseudomonas aeruginosa* (Zegans et al., 2009). Chez *M. xanthus* il existe un niveau de régulation pour la production de l'EPS chez *M. xanthus* dépendant du système CRISPR-Cas par l'action du CRISPR RNA qui vise un ARN messager évoluant dans la régulation de la production d'EPS (Wallace et al., 2014). Ceci se ferait potentiellement par la dégradation ou le clivage de l'ARNm visé (Wallace et al., 2014; Westra et al., 2014). Une nouvelle question qui naît est de savoir s'il existe une régulation similaire pour la production du BPS ?

Pour le T4P, nous savons que la rétractation de celui-ci est induite par l'EPS (Li et al., 2003). Alors la question est : Quel est l'effet du BPS sur le T4P ? Nous pourrions observer par Western blot en détectant la piline, sous-unité formant le pilus (Friedrich et al., 2014; Li et al., 2003), ou par microscopie électronique en transmission.

Nous devons aussi confirmer le changement à la surface détecté chez les cellules de *M. xanthus* (**Figs. 3.4 et 3.5**). Pour ceci nous devons utiliser les techniques de microscopie électronique à balayage afin de voir la différence au niveau de la topographie des cellules individuelles des populations ne produisant plus le BPS versus la souche WT.

À travers le résultat des tests phénotypiques (**Fig. 3.1**) je montre que pour le bon développement, *M. xanthus* a besoin de la sécrétion des deux polysaccharides (EPS et BPS). Toujours dans le but de comprendre la régulation, nous devons comprendre le ratio existant entre les deux polysaccharides qui permet d'avoir le bon développement. Une étude doit être faite sur l'inter-régulation entre le BPS et l'EPS au niveau transcriptionnelle et traductionnelle.

En dehors de la compréhension de comment s'agence le BPS au sein de *M. xanthus*, nous devons étudier la propriété bioémulsifiante identifiée chez le BPS de

par l'utilité des bioémulsifiants et des biosurfactants dans les diverses industries (Rinaudo, 2008; Santos et al., 2016). Pour ceci nous devons tout d'abord purifier le BPS présent dans le surnageant et définir la composition et la structure du BPS. Ensuite nous devons aussi établir une condition de pH et température optimale, et un milieu qui permet d'augmenter la propriété bioémulsifiante.

Concernant la propriété tensioactive, sous les conditions utilisées pour le test, BPS n'a pas montré des propriétés tensioactives détectables (**Fig. 3.7**). Suite à une future purification, des tests plus approfondis avec équipement plus sensible permettraient de savoir si oui ou non le BPS possède une propriété tensioactive qui serait faible, mais potentiellement améliorable via l'élaboration d'un milieu au bon pH, température, etc.

La découverte du BPS nous permet d'approfondir nos connaissances sur la multicellularité chez les bactéries et l'impact des polysaccharides bactériens dans l'agencement de cette multicellularité. Nous comprenons plus comment les polysaccharides affectent la macro-organisation cellulaire, impactent le comportement au niveau unicellulaire, affectent la propriété des surfaces des cellules, et jouent un rôle primordial sur la multicellularité.

6 BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Mawgoud, A.M., Lépine, F., and Déziel, E. (2010). Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol.* 86, 1323-1336.
- Arima, K., Kakinuma, A., and Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 31, 488-494.
- Arnold, J.W., and Shimkets, L.J. (1988). Cell surface properties correlated with cohesion in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* 170,5771-5777.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., and Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315,1709-1712.
- Behmlander, R.M., and Dworkin, M. (1994a). Biochemical and structural analyses of the extracellular matrix fibrils of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* 176,6295-6303.
- Behmlander, R.M., and Dworkin, M. (1994b). Integral proteins of the extracellular matrix fibrils of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* 176, 6304-6311.
- Bellenger, K., Ma, X., Shi, W., and Yang, Z. (2002). A CheW homologue is required for *Myxococcus xanthus* fruiting body development, social gliding motility, and fibril biogenesis. *J Bacteriol.* 184, 5654-5660.
- Black, W.P., Xu, Q., and Yang, Z. (2006). Type IV pili function upstream of the Dif chemotaxis pathway in *Myxococcus xanthus* EPS regulation. *Mol Microbiol.* 61, 447-456.
- Black, W.P., and Yang, Z. (2004). *Myxococcus xanthus* chemotaxis homologs DifD and DifG negatively regulate fibril polysaccharide production. *J Bacteriol.* 186, 1001-1008.
- Blackhart, B.D., and Zusman, D.R. (1985). " Frizzy" genes of *Myxococcus xanthus* are involved in control of frequency of reversal of gliding motility. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82, 8767-8770.
- Bosman, F.T., and Stamenkovic, I. (2003). Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol.* 200, 423-428.
- Bowden, M.G., and Kaplan, H.B. (1998). The *Myxococcus xanthus* lipopolysaccharide O-antigen is required for social motility and multicellular development. *Mol Microbiol.* 30, 275-284.
- Branda, S.S., González-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., and Kolter, R. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98, 11621-11626.
- Calvo, C., Manzanera, M., Silva-Castro, G., Uad, I., and González-López, J. (2009). Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *Sci Total Environ.* 407, 3634-3640.

- Campos, J.M., and Zusman, D.R. (1975). Regulation of development in *Myxococcus xanthus*: effect of 3': 5'-cyclic AMP, ADP, and nutrition. *Proc Natl Acad Sci USA*. *72*, 518-522.
- Cartee, R.T., Forsee, W.T., Jensen, J.W., and Yother, J. (2001). Expression of the *Streptococcus pneumoniae* type 3 synthase in *Escherichia coli*. Assembly of type 3 polysaccharide on a lipid primer. *J Biol Chem*. *276*, 48831- 48839.
- Cuthbertson, L., Kos, V., and Whitfield, C. (2010). ABC transporters involved in export of cell surface glycoconjugates. *Microbiol Mol Biol Rev*. *74*, 341-362.
- Dong, C., Beis, K., Nesper, J., Brunkan-LaMontagne, A.L., Clarke, B.R., Whitfield, C., and Naismith, J.H. (2006). Wza the translocon for *E. coli* capsular polysaccharides defines a new class of membrane protein. *Nature* *444*, 226-229.
- Ducret, A., Quardokus, E.M., and Brun, Y.V. (2016). MicrobeJ, a tool for high throughput bacterial cell detection and quantitative analysis. *Nat Microbiol*. *1*, 1-7.
- Ducret, A., Valignat, M.-P., Mouhamar, F., Mignot, T., and Theodoly, O. (2012). Wet-surface-enhanced ellipsometric contrast microscopy identifies slime as a major adhesion factor during bacterial surface motility. *Proc Natl Acad Sci USA*. *109*, 10036-10041.
- Fink, J.M., and Zissler, J.F. (1989). Defects in motility and development of *Myxococcus xanthus* lipopolysaccharide mutants. *J Bacteriol*. *171*, 2042-2048.
- Friedrich, C., Bulyha, I., and Sogaard-Andersen, L. (2014). Outside-in assembly pathway of the type IV pilus system in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol*. *196*, 378-390.
- Garcia-Ochoa, F., Santos, V., Casas, J., and Gómez, E. (2000). Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnol Adv*. *18*, 549-579.
- Greenfield, L.K., and Whitfield, C. (2012). Synthesis of lipopolysaccharide O-antigens by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydr Res*. *356*, 12-24.
- Grosberg, R.K., and Strathmann, R.R. (2007). The evolution of multicellularity: a minor major transition? *Annu Rev Ecol Evol Syst*. *38*, 621-654.
- Guellil, A., Block, J.C., and Urbain, V. (1998). Adaptation of the microbial adhesion to hydrocarbon test (math) for measuring activated sludge hydrophobicity. *Water Sci Technol*. *37*, 359-362.
- Guo, D., Bowden, M.G., Pershad, R., and Kaplan, H.B. (1996). The *Myxococcus xanthus* *rfaABC* operon encodes an ATP-binding cassette transporter homolog required for O-antigen biosynthesis and multicellular development. *J Bacteriol*. *178*, 1631-1639.
- Herrero, A., Stavans, J., and Flores, E. (2016). The multicellular nature of filamentous heterocyst-forming cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev*. *40*, 831-854.
- Herron, M.D., Borin, J.M., Boswell, J.C., Walker, J., Chen, I.-C.K., Knox, C.A., Boyd, M., Rosenzweig, F., and Ratcliff, W.C. (2019). *De novo* origins of multicellularity in response to predation. *Sci Rep*. *9*, 1-9.

- Hoiczky, E., Kaiser, D., Wolgemuth, C., and Oster, G. (2002). How myxobacteria glide. *Curr Biol* 12, 369-377.
- Holkenbrink, C., Hoiczky, E., Kahnt, J., and Higgs, P.I. (2014). Synthesis and assembly of a novel glycan layer in *Myxococcus xanthus* spores. *J Biol Chem.* 289, 32364-32378.
- Hubbard, C., McNamara, J.T., Azumaya, C., Patel, M.S., and Zimmer, J. (2012). The hyaluronan synthase catalyzes the synthesis and membrane translocation of hyaluronan. *J Mol Biol.* 418, 21-31.
- Islam ST, Eckford PDW, Jones ML, Nugent T, Bear CE, Vogel C, et al. Proton-dependent gating and proton uptake by Wzx support O-antigen-subunit antiport across the bacterial inner membrane. *mBio.* 2013;4(5):e00678-13.
- Islam, S.T., Fieldhouse, R.J., Anderson, E.M., Taylor, V.L., Keates, R.A.B., Ford, R.C., and Lam, J.S. (2012). A cationic lumen in the Wzx flippase mediates anionic O-antigen subunit translocation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol.* 84, 1165-1176.
- Islam, S.T., Gold, A.C., Taylor, V.L., Anderson, E.M., Ford, R.C., and Lam, J.S. (2011). Dual conserved periplasmic loops possess essential charge characteristics that support a catch-and-release mechanism of O-antigen polymerization by Wzy in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Biol Chem.* 286, 20600-20605.
- Islam, S.T., Huszczyński, S.M., Nugent, T., Gold, A.C., and Lam, J.S. (2013b). Conserved-residue mutations in Wzy affect O-antigen polymerization and Wzz-mediated chain-length regulation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Sci Rep.* 3, 3441.
- Islam ST, Lam JS. Wzx flippase-mediated membrane translocation of sugar polymer precursors in bacteria. *Environ Microbiol.* 2013;15(4):1001-15.
- Islam, S.T., and Lam, J.S. (2014). Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway. *Can J Microbiol.* 60, 697-716.
- Islam ST, Mignot T. The mysterious nature of bacterial surface (gliding) motility: a focal adhesion-based mechanism in *Myxococcus xanthus*. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;46:143-54.
- Islam ST, Taylor VL, Qi M, Lam JS. Membrane topology mapping of the O-antigen flippase (Wzx), polymerase (Wzy), and ligase (WaaL) from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 reveals novel domain architectures. *mBio.* 2010;1(3):e00189-10.
- Julien, B., Kaiser, A.D., and Garza, A. (2000). Spatial control of cell differentiation in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97, 9098-9103.
- Kalynychn, S., Yao, D., Magee, J., and Cygler, M. (2012). Structural characterization of closely related O-antigen lipopolysaccharide (LPS) chain length regulators. *J Biol Chem.* 287, 15696-15705.
- Khatoun, Z., McTiernan, C.D., Suuronen, E.J., Mah, T.-F., and Alarcon, E.I. (2018). Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon* 4, e01067-e01067.

- Konovalova, A., Petters, T., and Søgaard-Andersen, L. (2010). Extracellular biology of *Myxococcus xanthus*. *FEMS Microbiol Rev.* *34*, 89-106.
- Labrie, S.J., Samson, J.E., and Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol.* *8*, 317-327.
- Li, Y., Sun, H., Ma, X., Lu, A., Lux, R., Zusman, D., and Shi, W. (2003). Extracellular polysaccharides mediate pilus retraction during social motility of *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci USA* *100*, 5443-5448.
- Liu, D., Cole, R.A., and Reeves, P.R. (1996). An O-antigen processing function for Wzx (RfbX): a promising candidate for O-unit flippase. *J Bacteriol.* *178*, 2102-2107.
- Lu, A., Cho, K., Black, W.P., Duan, X.y., Lux, R., Yang, Z., Kaplan, H.B., Zusman, D.R., and Shi, W. (2005). Exopolysaccharide biosynthesis genes required for social motility in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol.* *55*, 206-220.
- MacLean, L., Perry, M.B., Nossova, L., Kaplan, H., and Vinogradov, E. (2007). The structure of the carbohydrate backbone of the LPS from *Myxococcus xanthus* strain DK1622. *Carbohydr Res.* *342*, 2474-2480.
- McCarthy, R.R., Ullah, M.W., Booth, P., Pei, E., and Yang, G. (2019). The use of bacterial polysaccharides in bioprinting. *Biotechnol Adv.* *37*, 107448.
- Moine, A., Agrebi, R., Espinosa, L., Kirby, J.R., Zusman, D.R., Mignot, T., and Mauriello, E.M. (2014). Functional organization of a multimodular bacterial chemosensory apparatus. *PLoS Genet.* *10*.
- Muñoz-Dorado, J., Moraleda-Muñoz, A., Marcos-Torres, F.J., Contreras-Moreno, F.J., Martin-Cuadrado, A.B., Schrader, J.M., Higgs, P.I., and Pérez, J. (2019). Transcriptome dynamics of the *Myxococcus xanthus* multicellular developmental program. *ELife* *8* :e50374
- Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T.K., and Sivachidambaram, P. (2008). Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Curr Sci.*, 736-747.
- Nickerson NN, Mainprize IL, Hampton L, Jones ML, Naismith JH & Whitfield C (2014) Trapped translocation intermediates establish the route for export of capsular polysaccharides across *Escherichia coli* outer membranes. *Proc National Acad Sci* *111*(22):8203-8208.
- Pérez-Burgos M, García-Romero I, Jung J, Valvano MA & Søgaard-Andersen L (2019) Identification of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis priming enzyme and the O-antigen ligase in *Myxococcus xanthus*: critical role of LPS O-antigen in motility and development. *Mol Microbiol* *112*(4):1178-1198.
- Carl Peters (06/2017). PRINCIPLE, Assay. Improving throughput for assessing nephelometric turbidity units (NTUs) using the NEPHELOstar® Plus BMG LABTECH Inc., NC, USA.
- Reid, A.N., and Whitfield, C. (2005). Functional analysis of conserved gene products involved in assembly of *Escherichia coli* capsules and exopolysaccharides:

- evidence for molecular recognition between Wza and Wzc for colanic acid biosynthesis. *J Bacteriol.* *187*, 5470-5481.
- Řezanka, T., Temina, M., Tolstikov, A.G., and Dembitsky, V.M. (2004). Natural microbial UV radiation filters – Mycosporine-like amino acids. *Folia Microbiol* *49*, 339-352.
- Rinaudo, M. (2008). Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer Int.* *57*, 397-430.
- Robbins PW, Bray D, Dankert M, Wright A. Direction of chain growth in polysaccharide synthesis: work on a bacterial polysaccharide suggests that elongation can occur at the "reducing" end of growing chains. *Science.* 1967;158(3808):1536-42.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., and Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett.* *9*, 29-33.
- Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., and Sarubbo, L.A. (2016). Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *Int J Mol Sci.* *17*, 401.
- Shapiro, J.A. (1998). Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu Rev Microbiol.* *52*, 81-104.
- Shimkets, L.J. (1999). Intercellular signaling during fruiting-body development of *Myxococcus xanthus*. *Annu Rev Microbiol.* *53*, 525-549.
- Soberón-Chávez, G., Lépine, F., and Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.* *68*, 718-725.
- Spormann, A.M. (1999). Gliding motility in bacteria: insights from studies of *Myxococcus xanthus*. *Microbiol Mol Biol Rev.* *63*, 621-641.
- Spormann, A.M., and Kaiser, A.D. (1995). Gliding movements in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* *177*, 5846-5852.
- Sun, H., Zusman, D.R., and Shi, W. (2000). Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the *frz* chemosensory system. *Curr Biol.* *10*, 1143-1146.
- Sutherland, I.W. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol.* *16*, 41-46.
- Sutherland, I.W. (2001). The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* *9*, 222-227.
- Tocilj, A., Munger, C., Proteau, A., Morona, R., Purins, L., Ajamian, E., Wagner, J., Papadopoulos, M., Van Den Bosch, L., and Rubinstein, J.L. (2008). Bacterial polysaccharide co-polymerases share a common framework for control of polymer length. *Nat Struct Mol Biol.* *15*, 130.
- Uzoigwe, C., Burgess, J.G., Ennis, C.J., and Rahman, P.K. (2015). Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Front Microbiol.* *6*, 245.

- Wallace, R.A., Black, W.P., Yang, X., and Yang, Z. (2014). A CRISPR with roles in *Myxococcus xanthus* development and exopolysaccharide production. *J Bacteriol.* *196*, 4036-4043.
- Weintraub, A. (2003). Immunology of bacterial polysaccharide antigens. *Carbohydr Res.* *338*, 2539-2547.
- Westra, E.R., Buckling, A., and Fineran, P.C. (2014). CRISPR–Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nat Rev Microbiol.* *12*, 317-326.
- Whitfield, C. (1995). Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol.* *3*, 178-185.
- Whitfield, C. (2006). Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem.* *75*, 39-68.
- Whitfield, C., and Paiment, A. (2003). Biosynthesis and assembly of Group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli* and related extracellular polysaccharides in other bacteria. *Carbohydr Res.* *338*, 2491-2502.
- Whitney, J., and Howell, P. (2013). Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* *21*, 63-72.
- Wolgemuth, C.W. (2005). Force and flexibility of flailing myxobacteria. *Biophys J.* *89*, 945-950.
- Woodward R, Yi W, Li L, Zhao G, Eguchi H, Sridhar PR, et al. *In vitro* bacterial polysaccharide biosynthesis: defining the functions of Wzy and Wzz. *Nat Chem Biol.* 2010;6(6):418-23.
- Wu, S.S., and Kaiser, D. (1995). Genetic and functional evidence that type IV pili are required for social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol.* *18*, 547-558.
- Yang, Z., Geng, Y., Xu, D., Kaplan, H.B., and Shi, W. (1998). A new set of chemotaxis homologues is essential for *Myxococcus xanthus* social motility. *Mol microbiol.* *30*, 1123-1130.
- Yang, Z., Ma, X., Tong, L., Kaplan, H.B., Shimkets, L.J., and Shi, W. (2000). *Myxococcus xanthus dif* genes are required for biogenesis of cell surface fibrils essential for social gliding motility. *J Bacteriol.* *182*, 5793-5798.
- Yu, R., and Kaiser, D. (2007). Gliding motility and polarized slime secretion. *Mol Microbiol.* *63*, 454-467.
- Zegans, M.E., Wagner, J.C., Cady, K.C., Murphy, D.M., Hammond, J.H., and O'Toole, G.A. (2009). Interaction between bacteriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviors of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* *191*, 210-219.
- Zhang, Y., Ducret, A., Shaevitz, J., and Mignot, T. (2012). From individual cell motility to collective behaviors: insights from a prokaryote, *Myxococcus xanthus*. *FEMS Microbiol Rev.* *36*, 149-164.
- Zhou, T., and Nan, B. (2017). Exopolysaccharides promote *Myxococcus xanthus* social motility by inhibiting cellular reversals. *Mol Microbiol.* *103*, 729-743.

Zusman, D.R., Scott, A.E., Yang, Z., and Kirby, J.R. (2007). Chemosensory pathways, motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Nat Rev Microbiol.* 5, 862-872.