

Institut National de la recherche scientifique
Université de Clermont Ferrand

Mise en place et optimisation des conditions de production et de cristallisation de protéines impliquées dans les systèmes de motilité chez les bactéries à Gram négatif

Par
Zheng Dazhong

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître Sciences (M.Sc.)
en sciences expérimentales de la santé et Ingénierie de la santé

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Salim Timo Islam
Institut National de la Recherche
Scientifique, Laval, Canada

Examineur externe

Laurent Terradot
Institut de Biologie et Chimie des
protéines, Lyon, France

Directeur de recherche

Charles Calmettes
Institut National de la Recherche
Scientifique, Laval, Canada

Co-directeur de recherche

Mahchid BAMDAD
Université Clermont-Auvergne,
Clermont-Ferrand, France

© Droits réservés de « Zheng Dazhong », 05 juin 2020

PREFACE

Le mémoire, présenté ici, s'inscrit dans le cadre du programme de double diplomation Sciences expérimentales de la santé et Ingénierie de la Santé, en collaboration entre l'Institut Nationale de la Recherche Scientifique à Laval, au Québec, Canada, et l'Université Clermont-Auvergne à Clermont-Ferrand, en France. Ce programme se différencie d'une maîtrise de recherche car son programme est unique.. En effet, la première année se déroule en France et est essentiellement constituée de cours. Elle comporte aussi un stage obligatoire d'une durée de deux mois, dont l'évaluation se base sur la rédaction d'un mémoire (en l'occurrence le chapitre 1 ici). La deuxième année se déroule au Québec mais, étant donné que le mémoire doit être soumis 5 mois à l'avance pour être dans les délais de l'obtention du diplôme, ce rapport ne comporte que deux sessions d'expérience (6 mois), dont les activités ont été arrêtées 13 mars 2020. De plus, les études de cristallographie aux rayons X ayant une certaine variabilité, les parties résultats ne sont pas aussi développées qu'espéré (obtention de cristaux et résolution de structures).

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je remercie le Dr Charles Calmettes de m'avoir permis d'accéder à ce programme de maîtrise de double diplomation et m'avoir toujours soutenu dans les choix de mes expériences ainsi que de m'avoir conseillé au mieux sur la résolution des problèmes rencontrés. De plus, il s'est aussi rendu très disponible sur tous mes questionnements et ce dans n'importe quel domaine. Il a aussi orienté le choix de mon premier stage et a su me mettre en contact avec les personnes appropriées.

En deuxième lieu, j'adresse une mention toute particulière au Dr Guillaume Duménil, chef de l'unité « Pathogénicité des Infections Vasculaires » à l'Institut Pasteur, de m'avoir accueilli au sein de son équipe pour mon stage de Master 1. En tant que maître de stage, il m'a beaucoup appris en partageant ses connaissances et son expérience en recherche avec moi.

En dernier lieu, je suis reconnaissant envers mes responsables de stages, Dr Imene Kouidmi et Dr Youxin Kong, de m'avoir encadré pendant mon apprentissage. Leur extrême gentillesse, leurs compétences avérées ainsi que leurs qualités humaines et professionnelles m'inspirent une grande admiration et un profond respect.

De plus, je tiens aussi à remercier les différents membres des laboratoires, en particulier Mariem Chalbi, Jihen Ati Cherif et Sylvie Goussard, pour l'attention et l'aide qu'ils m'ont apporté au quotidien pendant toute la durée de ma présence au laboratoire.

Enfin, je remercie toutes les personnes non citées qui m'ont conseillé et relu lors de la rédaction de ce mémoire de fin d'étude. Plus particulièrement Caroline Deriaz et Zineb Kaiss.

RÉSUMÉ

La motilité chez les bactéries est regroupée en 6 catégories. Ici, nous nous sommes intéressés à 2 d'entre-elles dans 2 organismes différents : (i) la motilité de type *twitching* chez *Neisseria meningitidis* et la motilité « sociale » chez *Myxococcus xanthus*, les deux sont médiées par les pili de type 4, et (ii) la motilité de type *gliding* chez *M. xanthus*. L'objectif final de ces études est l'obtention de différentes structures cristallographiques protéiques dans les deux types de motilités. Concernant *Neisseria meningitidis*, nous nous sommes intéressés au mécanisme d'adhésion de la cellule à sa cible grâce à l'extrémité de son pilus de type 4. Chez *Myxococcus xanthus*, les études sur la motilité de type sociale portent sur la sécrétion de différents polysaccharides à travers différents translocons protéiques Wza. Quant aux études sur la motilité de type *gliding*, elles sont axées sur la translocation d'une adhésine, CglB, à travers un complexe de la membrane externe (GltA, GltB et GltH), ainsi que sur les protéines chaperonnes (GltK et GltF) qui permettent le bon fonctionnement de CglB. Ces 3 projets sont nouveaux et requièrent donc beaucoup d'étapes d'optimisation, comprenant la conception des amorces, les conditions d'expression des protéines, les méthodes de purification et les conditions de stabilisation des protéines purifiées ainsi que les conditions de cristallogénèses.

Mots-clés : Cristallogénèse ; Expression ; Purification ; motilité ; Pili de type IV ; Wza ; *gliding* ; *Neisseria meningitidis* ; *Myxococcus xanthus*

ABSTRACT

Bacterial motility can be categorized into six types. Here, we focused on two of them: (i) twitching motility in *Neisseria meningitidis* and "social" motility in *Myxococcus xanthus*, both mediated by type 4 pili, and (ii) gliding motility in *Myxococcus xanthus*. The aim of these studies is to obtain various crystallographic structures of the proteins within these motilities systems. In *Neisseria meningitidis*, we are interested in how the tip of type IV pili tether the target. In *Myxococcus xanthus*, various polysaccharides secreted through Wza translocons, involve in social motility, have been studied. Concerning gliding motility, the translocation of an adhesin, CglB, through an outer membrane platform (composed by GltA, GltB and GltH) has also been studied. Moreover, CglB requires the presence of the proteins GltK and GltF to function properly. These 3 projects are new and require considerable steps of optimization, including primer design, plasmid expressions, protein purification methods and crystallogenesis conditions.

Keywords : Crystallogenesis ; Expression ; Purification ; motility ; Type IV Pili ; Wza ; *gliding* ; *Neisseria meningitidis* ; *Myxococcus xanthus*

TABLE DES MATIÈRES

PREFACE	II
REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	IV
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES TABLEAUX	XII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIII
1. MISE EN CONTEXTE	1
1.1 INTRODUCTION GENERALE.....	1
2. HYPOTHESE ET OBJECTIFS	4
3. CHAPITRE 1 : <i>NEISSEIRIA MENINGITIDIS</i>	5
3.1 INTRODUCTION	5
3.2 REVUES DE LA LITTERATURE.....	7
3.2.1 <i>Caractéristiques microbiologiques et pili de type IV</i>	7
3.2.2 <i>Machinerie du T4P et son mécanisme</i>	7
3.2.1 <i>Structure de la piline majeur PilE</i>	8
3.2.2 <i>Structure biochimique du T4P</i>	10
3.2.3 <i>Rôle de la partie distale de T4P dans les processus d'adhésion</i>	11
3.2.4 <i>Initiation de l'adhésion médiée par la piline majeur PilE</i>	13
3.3 OBJECTIFS DES TRAVAUX	14
3.4 MATERIELS ET METHODES	15
3.4.1 <i>Anticorps et produits chimiques</i>	15
3.4.2 <i>Souches bactériennes, conditions de culture et induction de l'expression</i>	15
3.4.3 <i>Cartes des plasmides</i>	15
3.4.4 <i>Transformation</i>	17
3.4.5 <i>Extraction et purification plasmidique</i>	17
3.4.6 <i>Préparation du lysat total</i>	17
3.4.7 <i>Préparation des protéines périplasmiques</i>	18
3.4.8 <i>Purification des protéines par affinité et exclusion stérique</i>	18
3.4.9 <i>Western-Blot</i>	18
3.5 RESULTATS	19

3.5.1	<i>Conception de la construction</i>	19
3.5.2	<i>Première tentative de purification qui servira de modèle de référence</i>	21
3.5.3	<i>Utilisation d'une souche déficiente en protéases périplasmiques</i>	23
3.5.4	<i>Comparaison des deux souches bactériennes : BL21(DE3) et PAP5198</i>	25
3.5.5	<i>Purification des protéines périplasmiques</i>	25
3.6	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	27
4.	CHAPITRE 2 : MYXOCOCCUS XANTHUS	29
4.1	INTRODUCTION	29
4.2	REVUE DE LA LITTERATURE.....	30
4.2.1	<i>Myxococcus xanthus : Caractéristiques</i>	30
4.2.2	<i>Myxococcus xanthus : Cycle de vie</i>	30
4.2.3	<i>Motilité sociale</i>	32
4.2.4	<i>Polysaccharides sécrétés : caractéristiques et voies de synthèse</i>	33
4.2.1	<i>Translocon WZA : protéines sécrétoires de la membrane externe chez Escherichia coli</i>	37
4.2.2	<i>Trois translocons Wza différents chez Myxococcus xanthus</i>	39
4.2.3	<i>Motilité aventurière</i>	40
4.2.4	<i>Modèle slime gun</i>	41
4.2.5	<i>Modèle de point d'adhésion focal : Agl</i>	43
4.2.6	<i>Modèle de point d'adhésion focal : MglA</i>	44
4.2.7	<i>Modèle de point d'adhésion focal : Glt</i>	45
4.2.8	<i>Modèle de point d'adhésion focal : CglB</i>	46
4.3	OBJECTIFS DES TRAVAUX	48
4.4	MATERIELS ET METHODES	49
4.4.1	<i>Amorces et Clonage PCR</i>	49
4.4.2	<i>Cartes des plasmides</i>	50
4.4.1	<i>Souches bactériennes et conditions de culture</i>	50
4.4.2	<i>Préparation de souche compétente et Transformation</i>	52
4.4.3	<i>Condition d'induction et de production</i>	52
4.4.4	<i>Migrations SDS-PAGE et agarose</i>	52
4.4.5	<i>Extraction et purification plasmidique</i>	53
4.4.6	<i>Extraction et purification des protéines solubles</i>	53
4.4.7	<i>Extraction et purification des protéines membranaires</i>	54
4.4.8	<i>Western-Blot</i>	55

4.4.9	<i>Dichroïsme circulaire</i>	55
4.4.10	<i>Protein Thermal Shift</i>	56
4.4.11	<i>MALDI-TOF, SEC-MALS et RMN 1D</i>	56
4.4.12	<i>SAXS</i>	56
4.4.13	<i>Cristallogénèse</i>	57
4.5	RESULTATS	58
4.5.1	<i>Homologie des protéines à cloner</i>	58
4.5.2	<i>Conception des amorces et clonage</i>	58
4.5.3	<i>Test d'expression des protéines</i>	60
4.5.4	<i>WzaX : partie soluble du translocon Wza intervenant dans la sécrétion de l'EPS</i> 62	
4.5.1	<i>WzaS : partie soluble du translocon Wza intervenant dans la sécrétion du sucre de revêtement des spores</i>	67
4.6	DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS	76
5.	CONCLUSION GENERALE	79
6.	BIBLIOGRAPHIE	81
7.	ANNEXES	89
7.1	DONNEE DE SAXS	89

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1-1 : ILLUSTRATION DES DIFFERENTS TYPES DE MOTILITES CHEZ LES BACTERIES	3
FIGURE 3.1-1 : ILLUSTRATION DE LA PATHOGENESE DE <i>NEISSEIRIA MENINGITIDIS</i>	6
FIGURE 3.1-2 : CARTE DE DISTRIBUTION DES INFECTIONS A MENINGOCOQUE.....	6
FIGURE 3.2-1 : MACHINERIE DU T4P ET SON MECANISME	9
FIGURE 3.2-2 : STRUCTURE BIOCHIMIQUE DE LA PILINE MAJEUR PILE.....	10
FIGURE 3.2-3 : PILI DE TYPE 4	11
FIGURE 3.2-4 : MODELE DE CHANGEMENT DE CONFORMATION APRES APPLICATION D'UNE FORCE ...	12
FIGURE 3.2-5 : HYPOTHESE D'ADHESION DE <i>NM</i> AU COURS DU TEMPS.....	13
FIGURE 3.4-1 : CARTOGRAPHIE DES PLASMIDES	16
FIGURE 3.5-1 : CONSTRUCTION DE LA PROTEINE D'INTERET	20
FIGURE 3.5-2 : PLASMIDE PET-22B(+) + INSERT ET CONFORMATION SOUHAITEE	20
FIGURE 3.5-3 : PURIFICATION SUR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE DE LA PROTEINE D'INTERET A PARTIR D'UNE SOUCHE <i>E. COLI</i> BL21(DE3)	22
FIGURE 3.5-4 : PURIFICATION AU SEC 200 A PARTIR DE LA PURIFICATION SUR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE.....	22
FIGURE 3.5-5 : TEST D'INDUCTION POUR LA SOUCHE <i>E. COLI</i> PAP5198	24
FIGURE 3.5-6 : PURIFICATION SUR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE DE LA PROTEINE D'INTERET A PARTIR D'UNE SOUCHE <i>E. COLI</i> PAP5198.....	24
FIGURE 3.5-7 : COMPARAISON DE LA PRODUCTION DE LA PROTEINE D'INTERET DANS LES SOUCHES PAP5198 ET BL21(DE3).....	26
FIGURE 3.5-8 : PURIFICATION DE LA PROTEINE D'INTERET A PARTIR DE LA SOUCHE PAP5198 AVEC UNE EXTRACTION DES PROTEINES PERIPLASMIQUES A LA POLYMYXINE B.....	26
FIGURE 4.2-1 : CYCLE DE VIE COMPLEXE ENVIRONNEMENT-DEPENDANT DE <i>MYXOCOCCUS XANTHUS</i>	31

FIGURE 4.2-2 : MECANISME DE SECRETIONS DE POLYSACCHARIDES. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES VOIES DE BIOSYNTHESE ET D'EXPORT DE Wzx/Wzy DEPENDANTE, ABC TRANSPORTEUR DEPENDANTE ET SYNTHASE-DEPENDANTE	34
FIGURE 4.2-3 : REPRESENTATION EN CARTOON DE LA SYNTHESE ET D'EXPORT DE LA VOIE Wzx/Wzy DEPENDANTE CHEZ <i>E. COLI</i>	37
FIGURE 4.2-4 : STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DE Wza CHEZ <i>E. COLI</i>	38
FIGURE 4.2-5 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS SECRETEURS DE SUCRES CHEZ <i>M. XANTHUS</i>	40
FIGURE 4.2-6 : MODELE DE LA SECRETION DE SLIME DE L'A-MOTILITE CHEZ LES MYXOBACTERIES...42	
FIGURE 4.2-7 : MODELE DES POINTS D'ADHESION FOCAUX.....43	
FIGURE 4.2-8 : PREDICTION DU MOUVEMENT DES MOTEURS DURANT LE MOUVEMENT DE <i>M. XANTHUS</i>	44
FIGURE 4.2-9 : REPRESENTATION EN CARTOON DE LA MACHINERIE AGL-GLT	45
FIGURE 4.2-10 : REPRESENTATION DU MECANISME DE TRANSLOCATION DE CGLB	47
FIGURE 4.4-1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN PROTOCOLE CLASSIQUE DE RF-CLONING	49
FIGURE 4.4-2 : CARTES DES PLASMIDES UTILISEES POUR LA PRODUCTION DES PROTEINES	51
FIGURE 4.4-3 : SCHEMA UN PUIT DE CRISTALLOGENESE EN GOUTTE ASSISE	57
FIGURE 4.5-1 : WESTERN-BLOT DES TESTS D'EXPRESSION DES GENES SEQUENCES.....	61
FIGURE 4.5-2 : SDS-PAGE, WESTERN-BLOT ET SEC-MALS DE LA PROTEINE WzAX.....	63
FIGURE 4.5-3 : DIAGRAMME DE PHASE PROTEIQUE.....	65
FIGURE 4.5-4 : MICROSCOPIE DE CRISTAUX	65
FIGURE 4.5-5 : TEST DU KIT THERMOFLUOR™ AVEC DU LYSOZYME.....	66
FIGURE 4.5-6 : COURBE DE DENATURATION DE LA PROTEINE WzAX.....	68
FIGURE 4.5-7 : SDS-PAGE ET CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE 200 DE LA PROTEINE WzAS	70
FIGURE 4.5-8 : COURBES DE MALDI-TOF ET DE SEC-MALS 200 DE LA PROTEINE WzAS.....	71
FIGURE 4.5-9 : COURBES DE DICHROÏSME CIRCULAIRE ET RMN 1D	73

FIGURE 4.5-10 : ANALYSE DE SAXS DE LA PROTEINE WZAS	75
FIGURE 7.1-1 : PLOT DE GUINIER DU PIC 1 DE LA PROTEINE WZAS	89
FIGURE 7.1-2 : PLOT DE GUINIER DU PIC 2 DE LA PROTEINE WZAS	90
FIGURE 7.1-3 : RECONSTRUCTION EN 3 DIMENSIONS SELON LA DENSITE ELECTRONIQUE OU SELON LE <i>BEAD</i> MODEL DE LA PROTEINE WZAS.....	91

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 4.4-1 : PARAMETRES UTILISES POUR LES CYCLES DE PCR.....	50
TABLEAU 4.4-2 : MELANGE PAR PUIITS POUR LA <i>PROTEIN THERMAL SHIFT</i>	56
TABLEAU 4.5-1 : CONCEPTION DES AMORCES UTILISES POUR LE CLONAGE RF	60

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3D : 3 dimensions

AA : acide aminé

ABC transporter : ATP-binding cassette
transporter

A-motilité : motilité aventurière

Amp : ampicilline

BPS : polysaccharide biosurfactant

CaCl₂ : chlorure de calcium

c-di-GMP : bis-(30-50)-cyclic dimeric
guanosine monophosphate

cryo-EM : négative-stain cryo-electron-
microscopy

C-ter : C-terminal

eau milliQ : eau ultrapure dégazée

EP : espace périplasmique

EPS : exopolysaccharide

FA: adhésion focale

fruiting body : corps fructifère

Frz : frizzy

GlT: gliding transducteur

Glu5 : glutamate en position 5

HSP : protéine de choc thermique

Histag : étiquette hexahistidine

MI : membrane interne

IPTG : isopropyl β -D-thiogalactosidase

LB : Luria-Bertani

LCR : liquide cébrospinal

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser

Desorption Ionization - Time of Flight

MASC : major spore coat

MBPtag : tag maltose binding protein

MCP : methyl-accepting chemotaxis
proteins

MPT : modification post-traductionnelle

NaCl : chlorure de sodium

Nm : *Neisseria meningitidis*

N-ter : N-terminale

ME : membrane externe, outer membrane

OPX : outer membrane polysaccharide
export

PCP : polysaccharide copolymerase

PM : poids moléculaire

PG : peptidoglycan sacculus

RF cloning : restriction-free cloning

RMN1D résonance magnétique nucléaire à
une dimension

SAXS : Small Angle X-rays Scattering

Sec-mals : Size exclusion chromatography
Multiangle light scattering

S-motilité : motilité sociale

Spc : spectinomycine

T4P : pilus de type 4

Tm : température de dénaturation

TPR : tetratricopeptide repeat proteins

UndPP : undecaprenyl pyrophosphate

V : volts

1. MISE EN CONTEXTE

1.1 Introduction générale

Les bactéries sont une source infinie de connaissances et un monde en perpétuel évolution. Elles peuvent être tout aussi bien inoffensives pour l'Homme que fatales. Elles possèdent tellement de caractéristiques qu'il est impossible de toutes les étudier. Ainsi, des axes principaux, qui sont applicables aux plus grands nombres, sont choisis, comme par exemple la motilité. La motilité est une capacité essentielle chez la plupart des bactéries pour leur survie dans les différents environnements auxquels elles sont confrontées. La motilité ne doit pas être confondue avec la mobilité. En effet, en biologie, la motilité désigne l'habilité d'un organisme à se mouvoir spontanément et activement, en utilisant de l'énergie. Alors que la mobilité, représente la capacité d'un objet à bouger. Chez les bactéries, les différents types de motilité peuvent être regroupés en 6 catégories générales: *swimming*, *swarming*, *twitching*, *gliding*, *sliding* et *darting* (Henrichsen, 1972).

Les définitions de ces différentes catégories (Figure 1.1-1) peuvent être légèrement différentes pour certaines bactéries mais, globalement, elles se définissent de la manière suivante (Henrichsen, 1972) :

- *Swimming* (Figure 1.1-1 A) : est la motilité d'une cellule individuelle dans un environnement liquide. Elle est permise grâce à la présence d'un flagelle qui effectue des mouvements de rotation. Exemple de bactérie qui utilise le *swimming* : *Escherichia coli*
- *Swarming* (Figure 1.1-1 B) : se définit comme un mouvement rapide effectué par un essaim de cellules grâce à des flagelles rotatives. Exemple de bactérie qui utilise le *swarming* : *Proteus mirabilis* (Kearns, 2010)
- *Twitching* (Figure 1.1-1 C) : est un mode de déplacement qui n'utilise pas le flagelle mais le pilus de type 4 (T4P). La motilité se fait dans un milieu humide et est important dans la colonisation pour un grand nombre de pathogènes de plantes et d'animaux. Le mécanisme ressemble à celui d'un grappin, il y a d'abord la formation / extension du pilus par une machinerie de piliation, puis l'attachement à un point d'ancrage, et enfin la rétractation qui attire la cellule vers le point d'ancrage. Exemples de bactéries qui utilisent le *twitching* : *Neisseria meningitidis*. De même, l'expansion des essaims de *Myxococcus xanthus* est une variation de "*twitching*" car cela utilise l'attachement et rétractation des T4Ps. Cependant, l'ancrage des cellules se fait sur les exopolysaccharides (EPS) d'une

cellule voisine (Imhaus & Duménil, 2014; Islam & Lam, 2014; Islam *et al.*, 2020; Mattick, 2002)

- *Gliding* (Figure 1.1-1 D) : terme général impliquant les formes de motilités qui n'utilisent pas de structures extracellulaires comme des flagelles ou des T4Ps. Elle est définie comme un mouvement continu et régulier suivant l'axe long de la cellule. Exemple de bactérie qui utilise le *gliding* : *M. xanthus* (Islam & Mignot, 2015)
- *Sliding* (Figure 1.1-1 E) : est aussi un mécanisme flagellum-indépendant qui se repose sur la multiplication cellulaire. Plus exactement, c'est la combinaison de la force d'expansion d'une culture en croissance, couplée avec des propriétés de réduction des forces de frictions entre la cellule et le substrat, qui permet le déplacement. Exemple de bactérie qui utilise le *sliding* : *Streptococcus* sp. (Martínez *et al.*, 1999)
- *Darting* (Figure 1.1-1 F) : comme dans le cas du *sliding*, le *darting* repose sur la multiplication cellulaire. Le *darting* diffère du *sliding* en cela qu'il repose sur une croissance explosive qui défie les forces adhésives, qui retiennent normalement les cellules ensemble. Cette explosivité projette des cellules individuelles à une courte distance qui vont à leur tour commencer l'expansion de colonies. Exemple de bactérie qui utilise le *darting* : *Staphylococcus* (Pollitt & Diggle, 2017)

Parmi ces 6 types de motilités, 4 sont actives, c'est-à-dire qu'elles utilisent des mécanismes énergie-dépendants permettant ainsi à la cellule de contrôler sa direction : *swimming*, *twitching*, *gliding* et *swarming*. Les deux autres motilités sont dites passives car elles dépendent de l'environnement : *sliding* et *darting*. Il faut aussi distinguer le flagelle du T4P, dont la structure est plus courte et plus fine que celle d'un flagelle.

Dans la suite de ce mémoire, nous allons nous intéresser plus en détail, dans un premier temps, à la *twitching motility* chez *Neisseria meningitidis*. Et plus exactement au rôle que joue l'extrémité du T4P dans les processus d'adhésion (chapitre 1). Dans un second temps, nous allons nous orienter vers les mécanismes de la motilité sociale et la motilité de *gliding* chez *Myxococcus xanthus* (chapitre 2).

Ces projets s'inscrivent dans le domaine de la cristallographie aux rayons X et une grande partie du travail est axé sur la production de protéines ainsi que l'obtention de protéines pures.

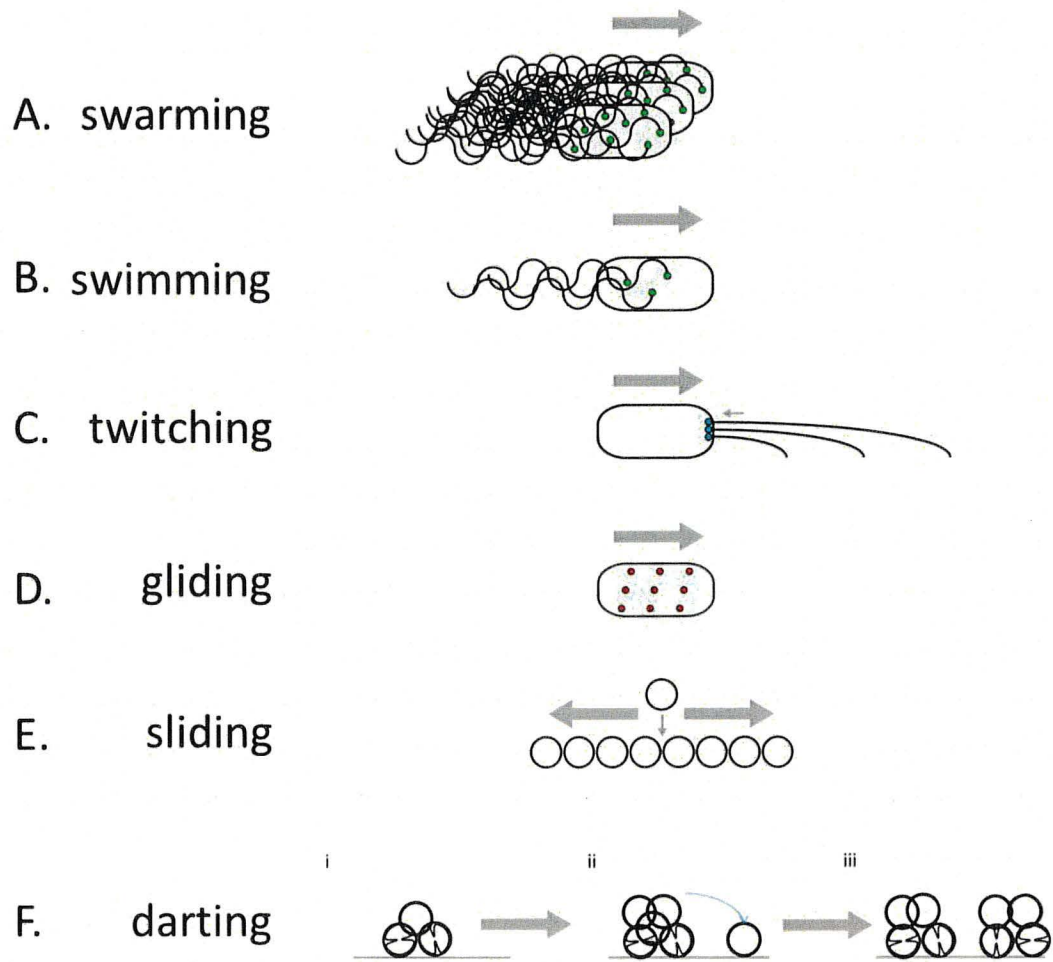


Figure 1.1-1 : Illustration des différents types de motilités chez les bactéries

Image modifiée de (Kearns, 2010; Pollitt & Diggle, 2017)

2. HYPOTHESE ET OBJECTIFS

Les hypothèses et les objectifs sont détaillées dans chacun des chapitres.

3. CHAPITRE 1 : *NEISSEIRIA MENINGITIDIS*

Mes travaux réalisés sur *Neisseria meningitidis* ont été réalisés lors de mon stage de 6 mois au sein du laboratoire du Dr. Guillaume Duménil à l'Institut Pasteur.

3.1 Introduction

La première mention d'une maladie ressemblant à une infection à méningocoque remonte au XVI^{ème} siècle. Sa première description, faite par Vieusseux en 1805, est considérée comme étant la première identification de ce type d'infection (Vieusseux, 1805). Encore aujourd'hui, les maladies à méningocoques restent les causes principales de méningites et de septicémies bactériennes dans le monde. L'agent pathogène responsable de ces infections est principalement la bactérie à Gram négatif *Neisseria meningitidis* (*Nm*) (Rosenstein *et al.*, 2001).

Nm, ou plus communément appelé méningocoque, a été décrit pour la première fois par Marchiafava et Celli dans le liquide cébrospinal (LCR) en 1884 (Marchiafava & Celli, 1884). Elle a ensuite été isolée par Weichselbaum (1887). Elle fait partie de la famille des Neisseriaceae, qui ne comprend qu'un seul autre pathogène humain majeur, *Neisseria gonorrhoeae* (Giancchetti *et al.*, 2015). *Nm* est une bactérie commensale dont l'unique réservoir connu à ce jour est le nasopharynx humain. Elle est retrouvée chez 5 à 30 % des individus (Imhaus & Duménil, 2014). Plus rarement, cette bactérie est capable de franchir les cellules épithéliales pour gagner la circulation sanguine puis atteindre le LCR pour provoquer une méningite (Figure 3.1-1).

Ce pouvoir pathogène dépend fortement de la zone géographique : une incidence élevée est observée dans les pays d'Afrique sub-saharienne (*meningitidis belt*), alors que seuls quelques cas sporadiques sont observés dans le reste du monde (Figure 3.1-2). Les causes de cette distribution restent encore inconnues mais de nombreux facteurs environnementaux, tels que la poussière ou l'humidité de l'air, pourraient être impliqués (Stephens *et al.*, 2007). Ces facteurs seraient susceptibles de fragiliser l'épithélium du nasopharynx et le rendre plus sensible à *Nm*. Au niveau de l'infection vasculaire, l'adhésion semble contribuer à l'évasion immunitaire et l'agrégation à la colonisation des méninges. La concentration des bactéries sur les sites spécifiques peut induire une altération de la physiologie des cellules endothéliales (Obino & Duménil, 2019).

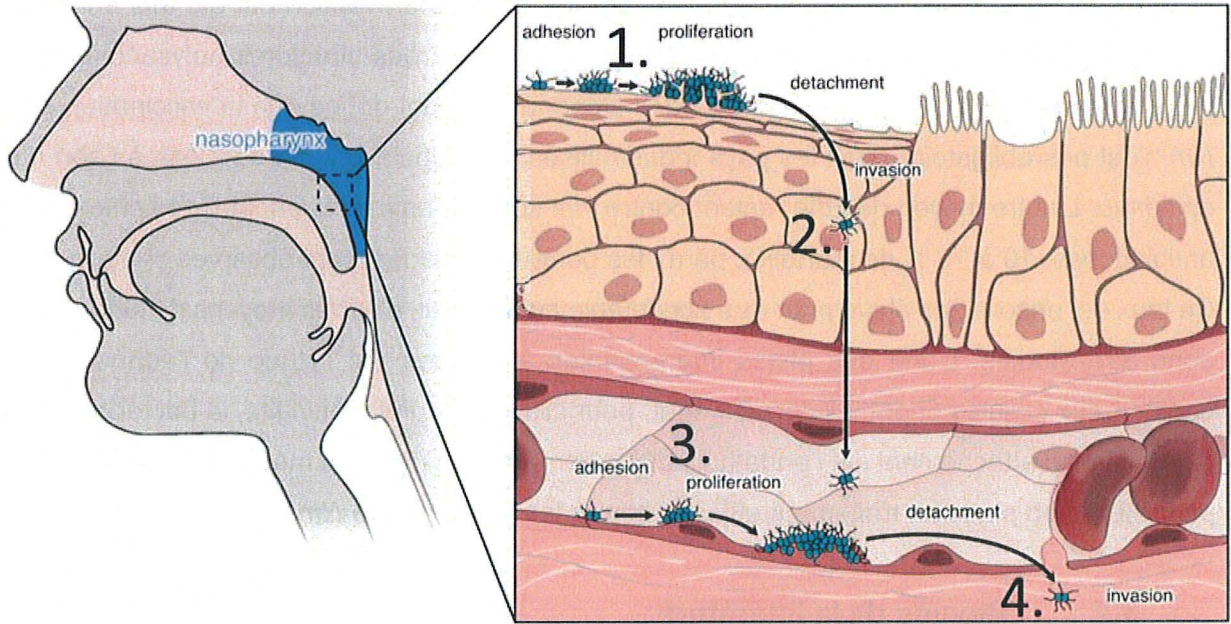


Figure 3.1-1 : Illustration de la pathogénèse de *Neisseria meningitidis*

(1) Début de la colonisation au niveau du nasopharynx. (2) Invasion dans la circulation sanguine, début de l'infection. (3) Infections vasculaires. (4) Infections généralisés et méningites.

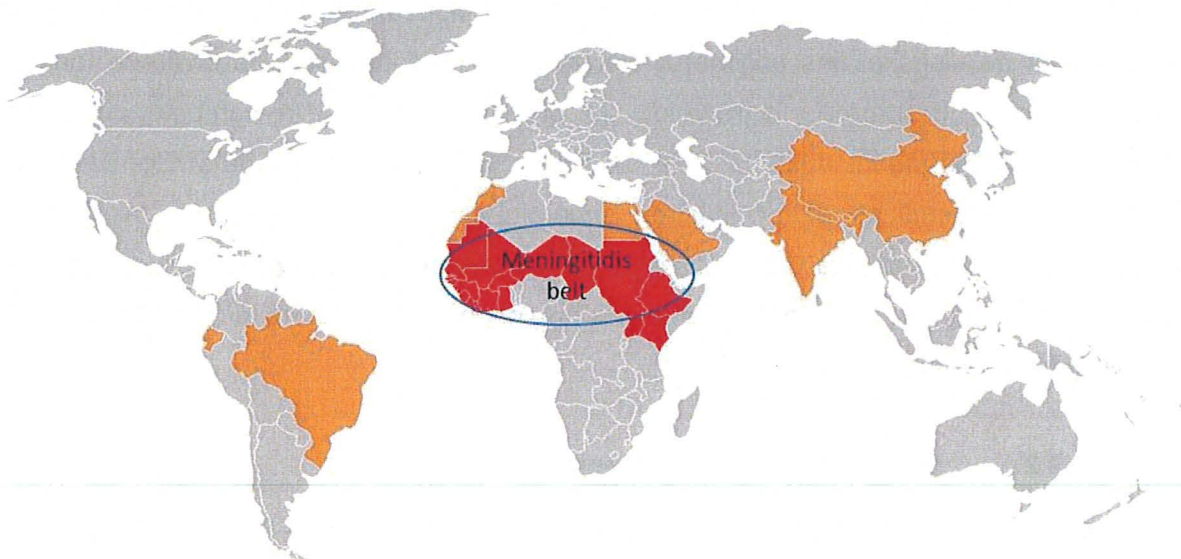


Figure 3.1-2 : Carte de distribution des infections à méningocoque

En rouge sont représentés les pays où la fréquence d'épidémie est élevée. En marron sont représentés quelques cas d'épidémies qui ont été observés. En gris, des cas sporadiques qui ont été reportés. Adapté de Wikipédia.

Pour diminuer le pouvoir pathogène de *Nm*, des moyens de prévention ont été mis en place. Il concerne les vaccins dirigés contre les différents sérotypes des structures polysaccharidiques des capsules de *Nm* (Stephens *et al.*, 2007). Cependant, étant donné que la vaccination contre *Nm* n'est pas obligatoire dans les pays industrialisés, les populations ne sont pas à l'abri d'une épidémie. L'autre moyen de lutte restant contre *Nm* sont les antibiotiques. Malgré l'efficacité des antibiotiques, 10 à 15 % de mortalité, parmi les porteurs malades, sont observés chaque année. Ce taux est encore trop élevé pour être acceptable aujourd'hui, d'autres moyens de luttés doivent donc être étudiés. L'une des pistes intéressantes à explorer est l'étude de l'adhésion de la bactérie aux cellules endothéliales. En effet, pour provoquer une méningite, la bactérie a besoin d'un moyen d'attachement sur l'endothélium. La compréhension de ce mécanisme est essentielle pour mettre en place un traitement efficace contre les méningites à *Nm*.

3.2 Revues de la littérature

3.2.1 Caractéristiques microbiologiques et pili de type IV

Nm est classée parmi les bactéries diplocoques à Gram négatif. Ces bactéries ont comme particularité de posséder une membrane interne (MI), un espace périplasmique (EP) ainsi qu'une membrane externe (ME), contrairement aux bactéries à Gram positif, qui n'ont qu'une seule membrane couverte par une couche épaisse de peptidoglycane (Costa *et al.*, 2015). *Nm* a aussi à sa surface de nombreuses organelles non flagellaires, appelés les pili de type 4 (T4P). Ces structures sont de longs et fins polymères de protéines, responsables de diverses fonctions cellulaires (comme l'adhésion, l'agrégation, la motilité ou même la compétence pour la transformation). Elles jouent aussi un rôle crucial en tant que facteurs de virulences durant l'infection. Ces appendices extracellulaires dynamiques, retrouvés aussi de façon moins importante chez les bactéries à Gram positif et les *Archaea*, sont capables d'atteindre plusieurs micromètres de longueur, notamment grâce à la présence de la machinerie de piliation du T4P dans le cas de *Nm* (Hospenthal *et al.*, 2017).

3.2.2 Machinerie du T4P et son mécanisme

Le corps du T4P est essentiellement composé d'une protéine majeure : la piline E (PilE). Sa biogénèse dépend de la machinerie du T4P, qui est composée d'une trentaine de protéines. Cette machinerie peut-être sous la forme d'un état pilié (ouverte, en présence du pilus) ou non-pilié (fermée, absence de pilus). Elle présente 3 parties : un complexe ME, permettant l'extrusion du pilus, un complexe MI, permettant l'élongation, et une ATPase cytoplasmique, permettant la

biogénèse (Figure 3.2-1A et Figure 3.2-1B). Le rôle de la machinerie du T4P intervient aussi bien dans la phase d'élongation du pilus que dans la phase de rétractation (Chang *et al.*, 2016).

La biogénèse commence par l'incorporation de précurseur de PilE au niveau de la MI par les ATPases. Ce précurseur contient un signal peptidique N-terminal (N-ter) qui lui permet de s'insérer dans la MI par le système SecYEG. Une fois dans la MI, le signal peptidique est clivé pour former la PilE mature. Durant la phase d'élongation, PilE est extraite de la MI et est incorporée au niveau de la base du pilus par la machinerie du T4P (Figure 3.2-1D). De même, durant la phase de rétractation, PilE est retirée du T4P au niveau de la base et réintègre dans la MI (Hospenthal *et al.*, 2017).

3.2.1 Structure de la piline majeur PilE

PilE est une protéine de 161 acides aminés (AA) essentiellement incorporé dans les T4Ps. Elle est composée de deux parties majeures : une tête globulaire hydrophile C-terminale (C-ter) et une queue en hélice α hydrophobe N-ter. Cette protéine possède de nombreuses régions très conservées, telles que le glutamate en position 5 (Glu5), le motif EYYLN ou encore les cystéines 120 et 154 impliquées dans la formation de ponts disulfures. Le pont disulfure est une modification post-traductionnel (MPT) important aussi bien dans la stabilité de la tête globulaire que dans les interactions fonctionnelles. Glu5 est impliqué dans la formation de liaisons électrostatiques avec le groupement aminé en N-ter de la sous-unité voisine qui permet de stabiliser le pilus. T4P possède aussi des régions hypervariables, situées entre le feuillet β_6 et la boucle en épingle à cheveux, qui permettent d'éviter la reconnaissance par le système immunitaire (Figure 3.2-2) (Kolappan *et al.*, 2016).

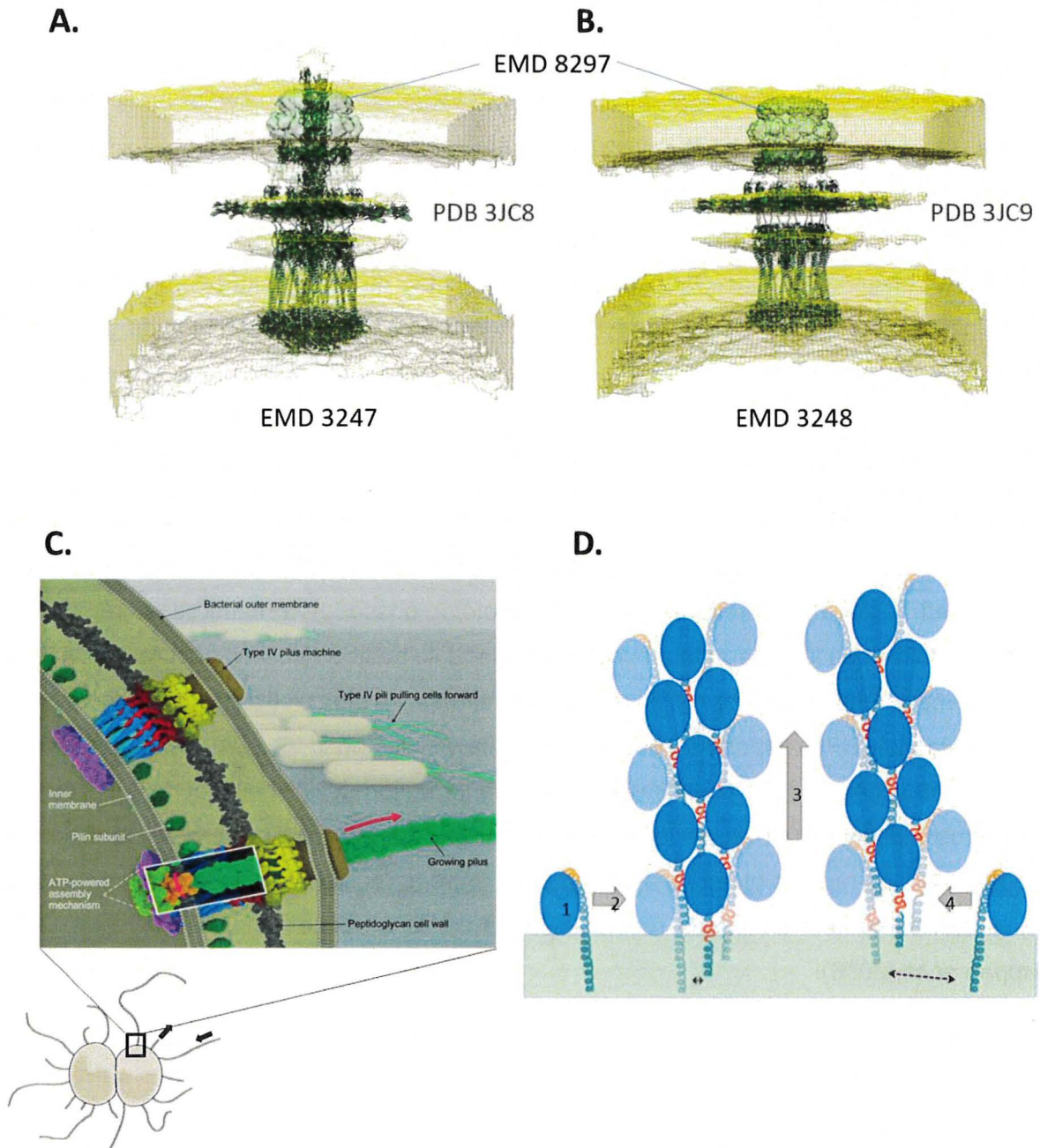


Figure 3.2-1 : Machinerie du T4P et son mécanisme

Machinerie du T4P (A) en forme pilié (ouverte) et (B) en forme non pilié (fermé). La densité électronique de la machinerie du T4P obtenue à partir d'images par la technique *Subtomogram averaging* de la bactérie *M. xanthus* est représentée en jaune. Le modèle en cartoon reconstruite à partir de la densité électronique est représenté en vert cartoon et la densité électronique en vert *mesh* représente PilQ qui est un complexe de la membrane externe. (C) Modèle de la machinerie du T4P tiré de (Chang *et al.*, 2016). (D) Modèle du mécanisme de piliation de T4P. (1) Avant leurs incorporations dans le pilus, les sous-unités de pilines sont ancrées dans la membrane interne avec leur queue alpha-hélice. (2) La sous unité est incorporée dans le pilus grâce à une complémentarité de charge entre l'AA Glu5 et l'amine Nter. (3) L'extension du pilus hors de la membrane externe créent un nouvel espace pour l'incorporation d'une autre sous-unité. (4) Une autre sous-unité peut alors être incorporée et le processus recommence. Le motif EYYLN est représenté en orange. Adapté de (Kolappan *et al.*, 2016)

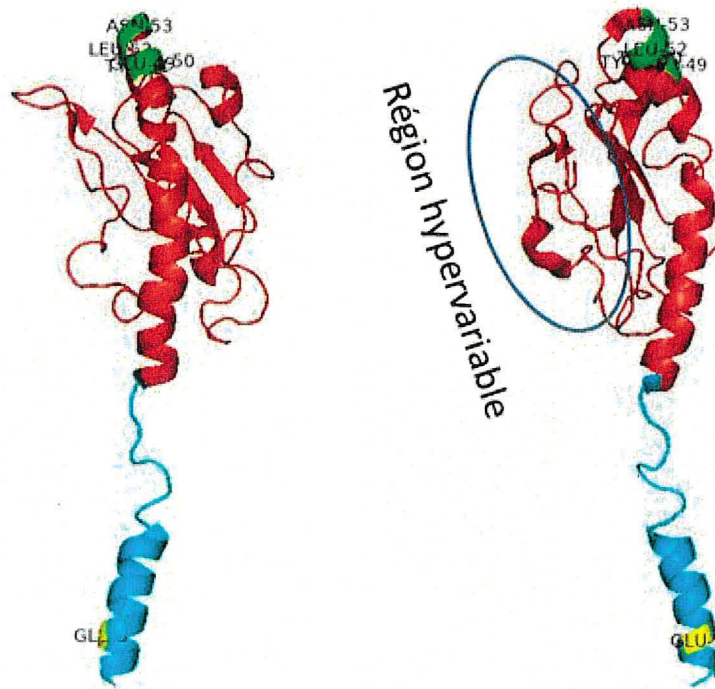


Figure 3.2-2 : Structure biochimique de la piline majeur PilE

Les deux images sont des PilE sous différents angles de vue. La queue hydrophobe est représentée en cyan, l'AA glu5 en jaune, la partie globulaire en rouge et le motif EYYLN en vert.

3.2.2 Structure biochimique du T4P

La structure complète du T4P se présente comme une structure hélicoïdale. Chaque tour d'hélice est composé de domaines globulaires connectés entre eux linéairement par un petit nombre d'interactions électrostatiques ou polaires, ainsi que par des interactions hydrophobes grâce aux queues N-ter des sous-unités adjacentes. Chaque tour d'hélice est maintenu dans l'axe de la structure hélicoïdale grâce aux interactions électrostatiques et polaires entre les domaines globulaires des différents tours, et par attachement des queues des tours précédant et suivant (Figure 3.2-3 C). Pour simplifier, T4P est une succession de PilE dont les hélices α N-ter sont regroupées ensemble et dissimulées au centre de la structure par les domaines globulaires C-ter, qui sont eux tournés vers l'extérieur (Figure 3.2-3 A et B). Grâce aux liaisons électrostatiques et à la force hydrophobe interne, le pilus est une structure très stable qui ne peut être rompue que par l'utilisation d'un détergent. Cette conformation renforce aussi les résistances du pilus à la chaleur, qui nécessite alors une température supérieure à 60° pour être dénaturé (Chang *et al.*, 2016).

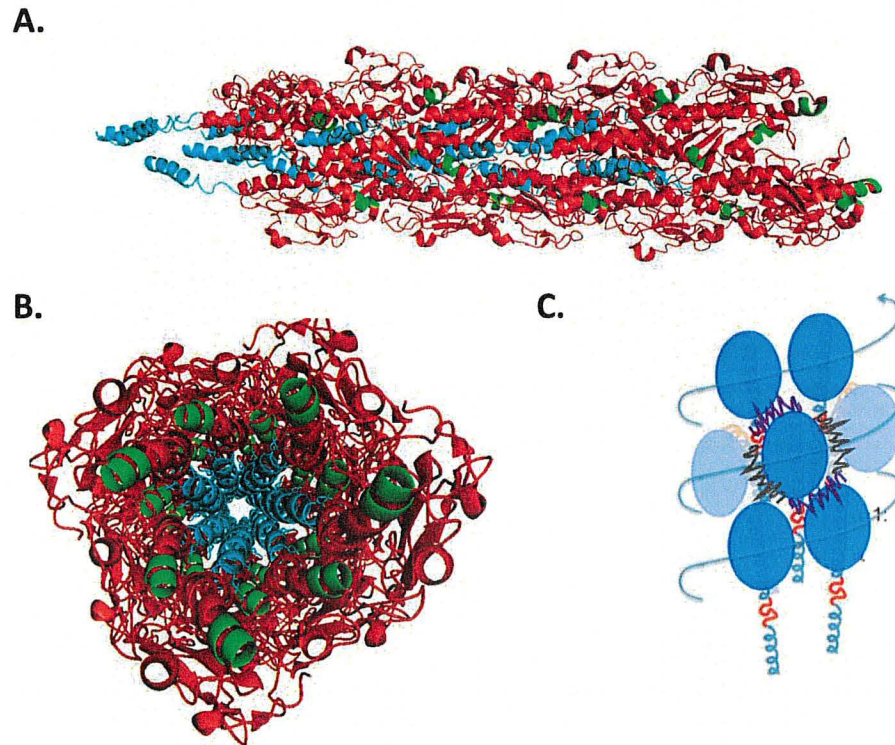


Figure 3.2-3 : Pili de type 4

(A-B) Représentation en coupe transversale (A) et en coupe frontale (B) du T4P. La queue hydrophobe est représentée en cyan, l'AA glu5 en jaune, la partie globulaire en rouge et le motif EYYLN en vert. (C) Modèle du T4P, les interactions axiales sont représentées en violet et les interactions entre les pilines adjacentes sont représentées en gris. Adapté de (Kolappan *et al.*, 2016)

3.2.3 Rôle de la partie distale de T4P dans les processus d'adhésion

Le processus d'adhésion joue un rôle important dans les mécanismes d'infection par *Nm*. Une étude de Kennouche *et al.* (2019) a montré que l'extrémité distal du pilus (qui sera nommé *tip* par la suite) jouerait un rôle important dans les phases précoces d'adhésion. Plusieurs preuves de son étude démontrent cette possibilité.

Premièrement, lorsqu'un T4P entier, purifié à partir de *Nm*, est incubé seul avec les cellules endothéliales, sa position reste verticale quand aucune force de cisaillement (imitant la circulation sanguine) n'est appliquée. Lorsqu'on en applique une, les pili se couchent transitoirement sur les cellules mais leur maintien dans cette position nécessite l'application d'une force de plusieurs dyn.cm⁻¹, sinon ils reviennent en position verticale initiale (Beaussart *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2015). Le mécanisme moléculaire derrière cette adhésion secondaire n'est pas encore connu mais il semblerait que lors de l'application de force de cisaillement, les interactions faibles axiales entre les domaines globulaires de chaque tour d'hélice sont rompues, libérant de nouveaux sites de reconnaissance (Figure 3.2-4).

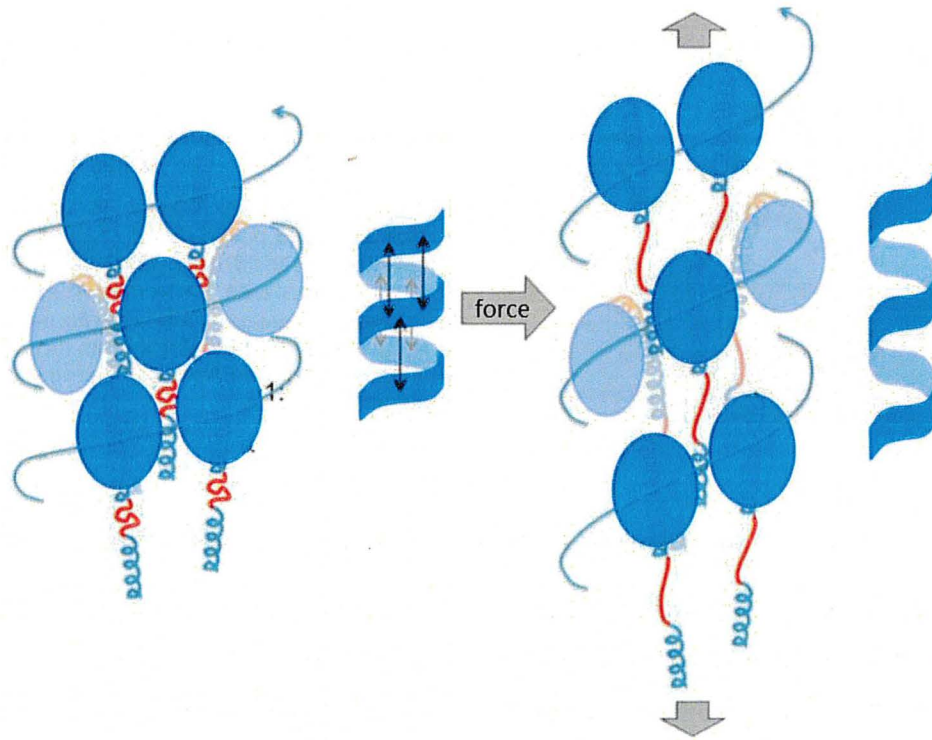


Figure 3.2-4 : Modèle de changement de conformation après application d'une force

L'image de gauche représente la conformation du pilus lors qu'aucune force est appliquée. Le motif EYYLN (en rouge) n'est accessible qu'au niveau de la partie distal du pilus. L'image de droite représente la conformation induite par une force, les interactions latérales entre les têtes globulaires sont rompues mais pas les interactions axiales. Il y a alors une exposition du motif EYYLN le long du pilus. Adapté de (Kolappan *et al.*, 2016)

Deuxièmement, pour mettre en évidence que c'est le *tip* du T4P qui est responsable de l'adhésion précoce et non la partie hydrophobe proximale, l'anticorps SM1 (spécifique du *tip*) a été utilisé (Virji *et al.*, 1989). L'incubation du T4P avec cet anticorps montre une inhibition dans les phases précoces de l'adhésion. Cela laisse donc suggérer que *Nm* commence par s'attacher avec l'extrémité du T4P dans les phases précoces de l'adhésion puis la force de la circulation sanguine induit un changement de conformation du T4P pour qu'il adhère grâce au corps du pilus (Figure 3.2-5).

Dernièrement, l'utilisation de l'anticorps 20D9 qui se lie au corps du pilus, n'a montré aucun impact dans les processus d'adhésion précoce, ce qui renforce l'hypothèse que le pilus s'adhère par le *tip* (Kennouche *et al.*, 2019).

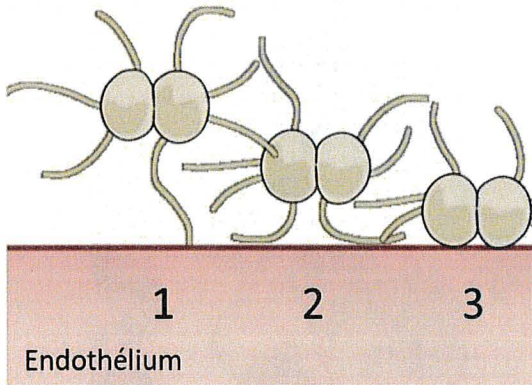


Figure 3.2-5 : hypothèse d'adhésion de *Nm* au cours du temps

(1) Dans un premier temps, lorsque *Nm* est proche de l'endothélium, la partie distale des pili peut reconnaître des récepteurs et s'y adhérer. (2) Dans un second temps, pour résister à la force de la circulation sanguine, d'autres sites de reconnaissances sont libérés le long du pilus, qui permettent alors une adhésion plus forte. (3) La rétraction des pili attire le corps de *Nm* sur l'endothélium et permet une meilleure adhésion.

3.2.4 Initiation de l'adhésion médiée par la piline majeur PilE

L'autre point majeur soulevé par l'étude du *tip* du T4P suggère l'implication directe de PilE dans les processus d'adhésion précoce. Mais il a aussi été démontré que d'autres pilines sont requises dans les processus d'adhésion, en particulier PilC1 (Rudel *et al.*, 1995) et les pilines mineures PilV et PilX (Imhaus & Duménil, 2014).

La première preuve de l'inhibition de l'adhésion au niveau du *tip* est par l'utilisation de l'anticorps SM1. SM1 reconnaît spécifiquement le motif EYYLN de PilE (accessible uniquement au niveau du *tip* ; Figure 3.2.3 B), ce qui suggère que si une adhésine autre que PilE est localisée au niveau du *tip* et est responsable de l'adhésion sur les cellules endothéliales, l'observation d'une inhibition par SM1 ne serait pas possible. Cela est donc en faveur d'un rôle direct de PilE dans l'adhésion par le *tip* du T4P et implique que ce *tip* ne soit pas couvert par un complexe protéique. La deuxième évidence est la mutation autour de l'AA Y50, qui fait partie du motif EYYLN. Ces mutations induisent une forte diminution de la capacité d'adhésion de *Nm*.

Cependant, un rôle direct de PilE dans les fonctions de T4P reste controversé (Kennouche *et al.*, 2019) et une démonstration directe de l'adhésion via le *tip* reste à faire.

3.3 Objectifs des travaux

Les résultats du laboratoire laissent supposer que les pilines majeures, PilE, situées au niveau du *tip* de T4P, interviendraient directement dans les processus d'adhésion en phase précoce, et non un autre type d'adhésine. Pour étudier cette possibilité, l'isolation du *tip* de T4P ne comportant que la protéine PilE est essentielle. Pour cela, une construction mimant le *tip* a été imaginée et mise en place.

L'objectif principal de mon stage est de mettre au point un protocole optimal pour l'expression et la purification de cette construction. Une fois purifié, cette protéine pourra être incubée avec des cellules pour tester sa capacité à interagir avec un récepteur.

3.4 Matériels et méthodes

3.4.1 Anticorps et produits chimiques

Les anticorps primaires monoclonaux, utilisés pour le Western-blot (WB), sont soit dirigés contre PilE dilué au 1/5000^{ème} (produits chez le lapin) ou soit contre l'étiquette hexahistidine, dilué au 1/2500^{ème} (produits chez la souris). Les anticorps secondaires polyclonaux (produits chez la chèvre) sont soit dirigés contre le lapin, dilution au 1/1000^{ème} ; soit contre la souris, dilué au 1/1000^{ème}) sont dirigés contre les anticorps primaires et sont couplés avec la peroxydase Horseadish (HRP). L'isopropyl β -D-thiogalactosidase (IPTG) provient de chez Promega®.

3.4.2 Souches bactériennes, conditions de culture et induction de l'expression

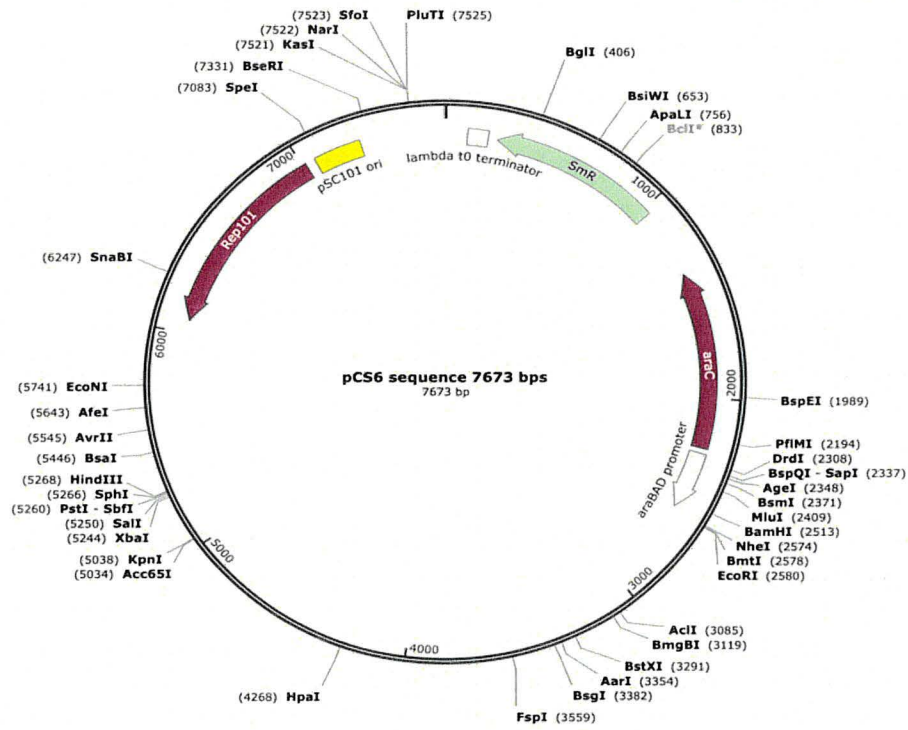
Deux souches d'*E. coli* ont été utilisées pour produire la protéine d'intérêt. La première, BL21(DE3), mutée pour les gènes *OmpT* et *Lon*, est cultivée sur milieu Luria-Bertani (LB)(Difco) solide ou liquide, supplémenté avec 100 μ g/mL d'ampicilline (Amp), à 37 °C. La seconde, PAP5198, mutée pour les gènes *OmpT*, *PRT* et *DegP*, est cultivée sur milieu LB solide ou liquide, supplémenté avec 50 μ g/mL d'Amp et 25 μ g/mL de spectinomycine (Spc), à 30 °C.

Pour la production de la protéine d'intérêt, la souche BL21(DE3) ou PAP5198 sont ensemencées sur du milieu LB solide, supplémenté en antibiotique, pour obtenir des colonies bactériennes. Une préculture de 100 mL LB + antibiotique est effectuée avec une colonie isolée. Cette préculture est cultivée pendant toute la nuit (O/N) et est répartie dans des flasques de 1 L, le lendemain, dans du milieu LB supplémenté en antibiotiques. Après atteinte d'une densité optique (longueur d'onde à 600 nm)(DO₆₀₀) comprise entre 0,6 et 0,8, 200 μ M d'IPTG est ajouté dans les flasques pour l'induction de l'expression des plasmides. Cette expression est induite à 16 °C. Des volumes de 2 mL sont prélevés à T = 0 (avant induction à DO₆₀₀ = 0,6 – 0,8), à T = 2 h et T = O/N pour effectuer les tests de vérifications.

3.4.3 Cartes des plasmides

Les deux plasmides utilisés dans cette étude sont cartographiés ci-contre (Figure 3.4-1). Le plasmide pET-22b+ (Genscript®) est utilisé pour la production de la protéine d'intérêt dans les deux souches bactériennes et le plasmide PCS6 (Addgene®) est utilisé pour la production de l'ARN polymérase T7 dans la souche PAP5198.

A.



B.

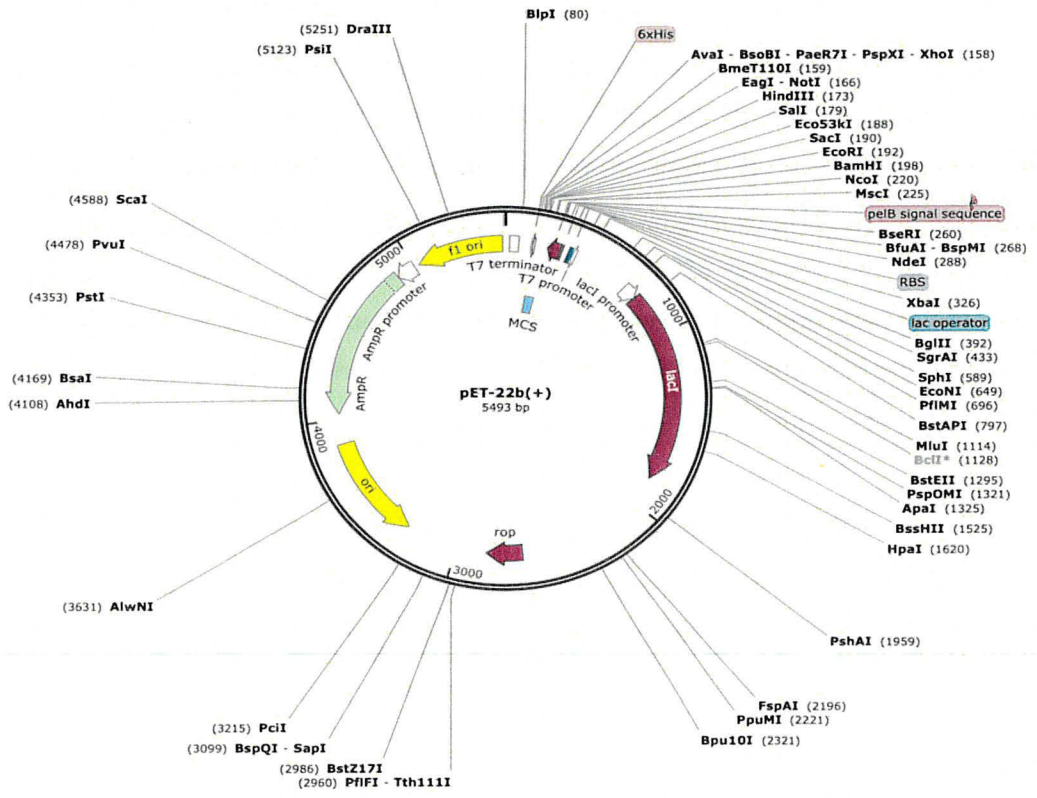


Figure 3.4-1 : Cartographie des plasmides

(A) Plasmide pCS6 pour la production de l'ADN polymérase T7. (B) Plasmide pET-22b(+) pour la production de la protéine d'intérêt.

3.4.4 Transformation

L'induction de la compétence des bactéries est faite grâce à 50 mM de chlorure de calcium (CaCl_2).

Pour la transformation, 100 μl de bactéries compétentes sont incubées pendant 30 min à 4 °C avec 100 ng de plasmides. Un choc thermique à 42 °C pendant 1 min est ensuite effectué pour l'introduction du plasmide puis les bactéries sont refroidies pendant 2 min dans la glace. Les bactéries sont ensuite cultivées pendant 1 h à 37 °C sous agitation. Enfin, les bactéries transformées sont sélectionnées sur boîtes de Pétri contenant de l'ampicilline.

3.4.5 Extraction et purification plasmidique

L'extraction et la purification des plasmides ont été effectuées avec le kit Wizard plus SV Minipreps (Promega®).

3.4.6 Préparation du lysat total

3.4.6.1 Extraction des protéines par sonication et lysozyme (à froid)

L'expression des plasmides a été induite avec 200 μM d'IPTG à 16 °C. Le culot obtenu après sédimentation est lavé avec du PBS et sédimenté à 1 500 g pendant 45 min à 4 °C. Le culot est resuspendu dans un tampon composé de 20 mM HEPES, de 50 mM de chlorure de sodium (NaCl) à pH 8, de 5 % v/v glycérol et de 1 mg/mL de lysozyme (Euromedex®) en présence d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich®). Les paramètres utilisés pour la sonication, sont les suivants : sonication pendant 2 min avec une amplitude de 30% à intervalles de 20 s, avec une température inférieure à 10 °C. Les débris sont éliminés par sédimentation à 9 800 g à 4 °C pendant 1 h et le surnageant est filtré avec un filtre de 0.22 μm .

3.4.6.1 Extraction des protéines par le tampon Laemmli bleu et choc thermique

Le culot bactérien est lavé avec du PBS puis lysé avec 100 μL de tampon Laemmli (Biorad®) à 95 °C pendant 5 min. L'ADN génomique est éliminé par sédimentation à 16 000 g pendant 5 min.

3.4.7 Préparation des protéines périplasmiques

L'extraction des protéines périplasmiques à partir de cellules entières est effectuée avec l'antibiotique polymyxine B (EMD millipore©), à une concentration de 1 mg/mL, dans du PBS en présence d'inhibiteurs de protéases. Les bactéries sont incubées pendant 1 h à froid puis sédimentées pendant 10 min à 9 000 g.

3.4.8 Purification des protéines par affinité et exclusion stérique

Le système utilisé ici pour la purification de protéines est la chromatographie de celui de l'ÄKTA™ pure (GE Healthcare©). Les colonnes utilisées sont les colonnes d'affinité (Histrap™ 5 mL de GE Healthcare©) et les colonnes d'exclusion stérique (Superdex™ 200 et 75 de GE Healthcare©).

Pour la purification sur Histrap™, le système, la colonne ainsi que tous les pompes sont nettoyées avec de l'eau ultrapure (eau milliQ). Les pompes A1 et S1 ainsi que la colonne Histrap sont équilibrées avec le tampon de lavage A1 (HEPES 20 mM, NaCl 500 mM à pH 8 et 5 % v/v de glycérol). Le pompe B1 est équilibrée avec le tampon d'élution B1 (HEPES 20 mM, NaCl 500 mM à pH 8, 5 % v/v glycérol et 350 mM d'imidazole). Le surnageant issu de l'étape d'extraction protéique est injecté dans la colonne grâce à la pompe S1. La colonne est lavée une première fois par 2 % v/v de tampon B1 et 98 % v/v de tampon A1 puis une deuxième fois par 5 % v/v de tampon B1 (95 % v/v A1) et enfin élué avec 100 % v/v de B1. Les fractions sont collectées tous les 1 mL par un collecteur à fraction.

Pour la purification sur chromatographie d'exclusion stérique, les fractions contenant théoriquement la protéine d'intérêt sont regroupées et concentrées dans un volume de 1 mL grâce à un filtre à centrifugation (Amicon Ultra-15 de Merckmillipore©). La colonne est équilibrée avec 30 mL d'eau et 30 mL de tampon de gel filtration. Les échantillons sont injectés manuellement.

3.4.9 Western-Blot

Les protéines sont séparées sur SDS-PAGE (Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Precast Gels de Biorad©) à 200 volts (V) pendant 40 min. Les protéines sont ensuite transférées sur des membranes Polyvinylidene fluoride (ThermoFisher™) pendant 20 min à 15 V par électro-transfert (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell de Biorad®). Les membranes sont saturées dans la solution de blocage (5% v/v de lait + PBS + 0,1% v/v de Tween®) et incubées pendant 1 h avec l'antisérum spécifique. Les membranes sont incubées pendant 1 h avec les anticorps secondaires. La chemiluminescence est révélée grâce à Pierce™ ECL Plus (ThermoFisher™) et enregistrée par un imageur Chemidoc (Biorad®).

3.5 Résultats

3.5.1 Conception de la construction

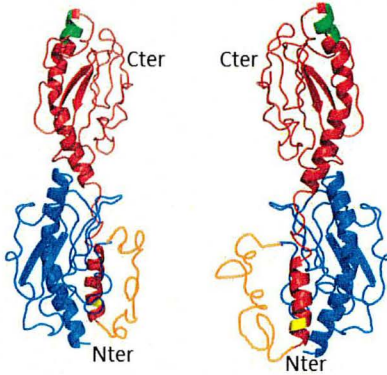
A cause du caractère hydrophobe de la partie Nter de PilE, sa purification n'est pas possible directement. En effet, dès lors que PilE est extraite de la membrane plasmique de la bactérie, les queues hydrophobes vont spontanément être attirées les unes par les autres et former des précipités. Cette précipitation peut former des structures diverses et variées, qui ne correspondent, dans la plupart du temps, pas à la conformation souhaitée (Dobson, 2004). Ainsi, pour passer outre ce problème, la réflexion d'une construction qui formera la protéine recombinante est nécessaire.

La construction a été imaginée à partir du *tip* des pili. Elle comprend deux copies de PilE, depuis la partie Nter vers Cter : une étiquette d'hexahistidine, une PilE tronquée de la queue hydrophobe, un linker et une PilE complète (Figure 3.5-1). Il est supposé que lorsque cette construction (monomère de 34 kDa) est transportée au niveau de l'espace périplasmique, les interactions hydrophobes des queues permettront de former des tétramères de PilE. Cette structure permet ainsi de mimer le *tip* de T4P avec les queues hydrophobes des PilE entières cachées par les têtes globulaires de PilE tronquées (Figure 5.2-2 B). De plus, grâce à la présence de l'étiquette hexahistidine, la purification sur chromatographie d'affinité permettra d'obtenir des protéines d'intérêts pures. La réalisation de cette construction a été confiée à un organisme tier (Genscript®).

Une fois que cette construction est synthétisée, elle est insérée dans le plasmide pET-22b au niveau des sites de restriction BamH1 et NcoI. Ces sites de restriction ont été choisis car ils ne sont pas présents au sein de la séquence mais sur les extrémités. Ce plasmide présente aussi comme intérêt d'encoder la séquence PelB et l'opéron *lac*. La séquence PelB permet la translocation de la protéine d'intérêt au niveau du périplasma qui est nécessaire pour la formation des ponts disulfures et ainsi avoir la bonne conformation de la protéine d'intérêt. Cette localisation périplasmique présente cependant comme désavantage de produire moins de protéines que la production protéique au niveau du cytoplasmique. L'opéron *lac*, inducible par l'IPTG, est essentiel pour la surproduction de la protéine d'intérêt (Figure 5.2-2 A).

Ce plasmide nouvellement combiné, avec la construction, est, par la suite, introduit dans les bactéries par transformation pour les études d'expression.

A.



B.

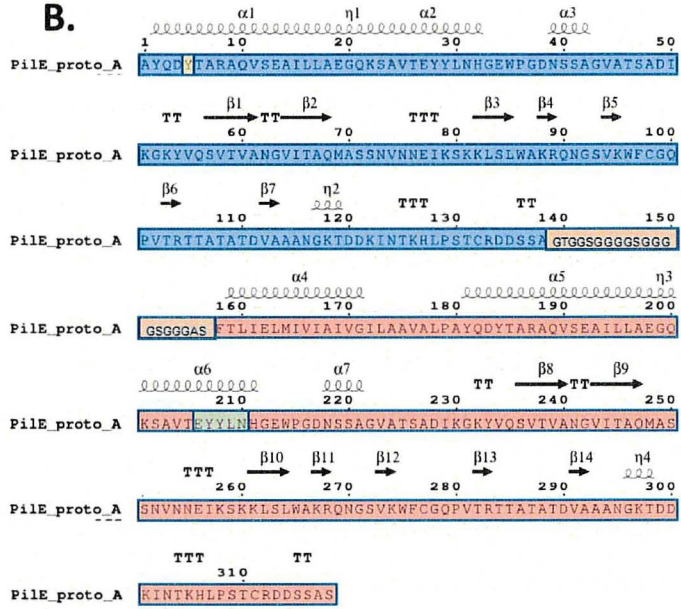
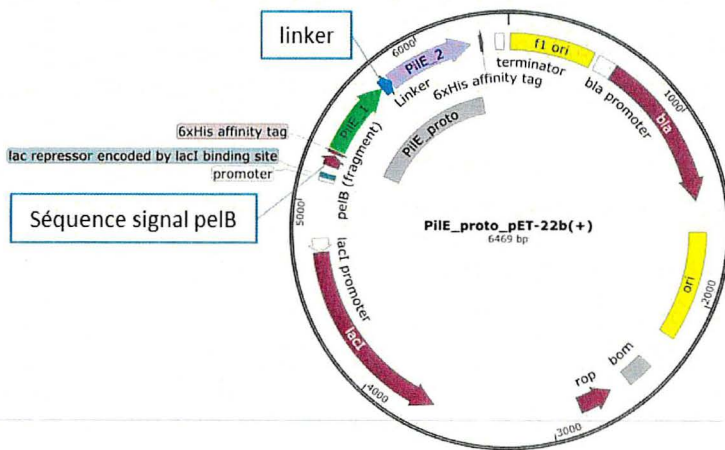


Figure 3.5-1 : Construction de la protéine d'intérêt

(A) Les deux vues montrent une représentation de la protéine d'intérêt. (B) Séquence de la protéine d'intérêt insérée dans le plasmide. (A-B) Bleu : PiiE tronqué, jaune : acide glutamique 5, orange : linker, rouge : PiiE entière, vert : motif EYYLN

A.



B.



Figure 3.5-2 : Plasmide pET-22b(+) + insert et conformation souhaitée

(A) La dénomination PiiE proto est le nom donné pour la séquence de la protéine d'intérêt. La séquence est insérée entre les sites de restriction BamH1 et NcoI. (B) Modèle de la conformation quaternaire de la protéine d'intérêt souhaitée qui mime le *tip* de T4P. En bleu, vert, rouge et jaune est représenté les pilines E entier et en cyan les pilines tronquées.

3.5.2 Première tentative de purification qui servira de modèle de référence

Après introduction du plasmide dans la souche BL21(DE3), une première tentative de purification selon un protocole, que nous qualifierons de « standard », est effectuée. L'expression est ici induite avec 200 μ M d'IPTG pendant une nuit. Les cellules sont ensuite lysées par sonication pour libérer toutes les protéines, incluant notre protéine d'intérêt. Après l'élimination des débris cellulaires, les protéines sont purifiées par chromatographie d'affinité. Le suivi de la purification est effectué grâce à la lecture de l'absorbance à 280 nm. Le profil du chromatogramme (Figure 3.5-3 A) montre un unique et fort pic au niveau des fractions éluées 3, 4 et 5. Cela laisse donc fortement supposer que notre protéine est présente dans ces fractions. La présence d'un unique pic avec une absorbance aussi élevée laisse aussi suggérer qu'il y a beaucoup de protéine.

Afin de vérifier la localisation de notre protéine, toutes les fractions éluées ainsi que les échantillons contrôles (culot, *flow-through*, lavage), sont analysées par SDS-PAGE (Figure 3.5-3 B). Après révélation du gel, la présence de plusieurs bandes dans les fractions d'élution démontre que les fractions ne sont pas pures. De plus, l'absence de bande intense à 34 kDa signifie que notre protéine n'est que faiblement produite, voire qu'elle n'est tout simplement pas produite. Cependant, il est aussi à considérer que la protéine peut présenter un poids moléculaire (PM) légèrement plus grand et pourrait correspondre à la bande vers 37 kDa.

Dans le but de vérifier l'expression de la protéine, un test au WB avec deux anticorps, respectivement anti-étiquette hexahistidine et anti-PilE, a été effectué (Figure 3.5-3 C). L'observation d'un signal confirme la présence de notre protéine mais sa faible intensité atteste que la protéine est faiblement produite. De plus, la présence d'une deuxième bande révélée plus bas indique la présence de produits de dégradations, ce qui pourrait expliquer le faible rendement de purification.

Afin d'augmenter la pureté des fractions et le rendement, une deuxième purification a été effectuée sur chromatographie d'exclusion stérique superdex 200 (SEC 200). Ainsi, les fractions les plus pures (4, 5 et 6) ont été sélectionnées et purifiées (Figure 3.5-4 A). En raison d'un grand nombre de fractions éluées, les fractions présentant un pic sont analysées, à raison d'1 éluât sur 2 sur SDS-PAGE, à l'exception des fractions 31, 32 et 33, qui sont les fractions qui ont le plus de probabilité de contenir la protéine d'intérêt (Figure 3.5-4 B). Le gel montre très peu de protéines d'intérêts présentes au niveau de la bande à 34 kDa et beaucoup de protéines sont dégradées. Les causes de ces dégradations peuvent être la présence d'une protéase périplasmique au sein de la bactérie qui dégrade la protéine d'intérêt. Pour vérifier cette hypothèse, une souche bactérienne déficiente en protéases périplasmiques, PAP5198, a été utilisée pour la suite.

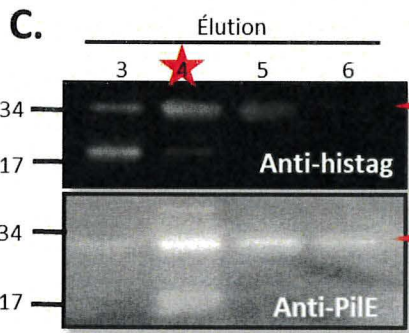
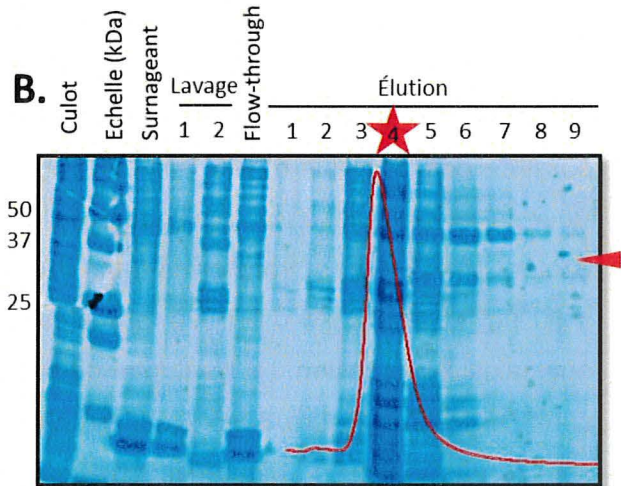
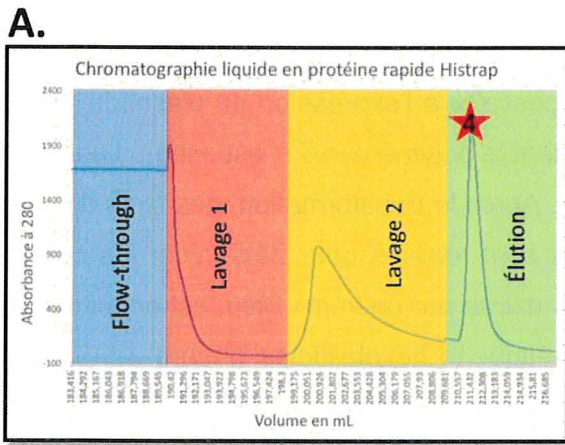


Figure 3.5-3 : Purification sur chromatographie d'affinité de la protéine d'intérêt à partir d'une souche *E. coli* BL21(DE3)

L'expression des plasmides est induite à 200 μ M d'IPTG O/N puis les cellules sont lysées par sonication. (A) Le surnageant de sonication est injecté dans la chromatographie d'affinité (A) pour être purifié. Les protéines, qui n'ont pas d'affinité avec la colonne, sont directement éluées (*flow-through*). Celles, qui ont une faible affinité, sont lavées avec 2% v/v de tampon B1 (lavage 1) puis avec 5% v/v (lavage 2) et enfin éluées avec 100% v/v de B1 (éluion). Les éluions sont collectées par fraction de 1 mL. (B-C) Le culot, le surnageant de sonication ainsi que les fractions de collectes sont analysées sur SDS-PAGE (B) et en WB avec les anticorps anti-PiIE et anti-étiquette hexahistidine (C). L'étoile représente le pic d'éluion. La flèche rouge indique la bande à 34 kDa.

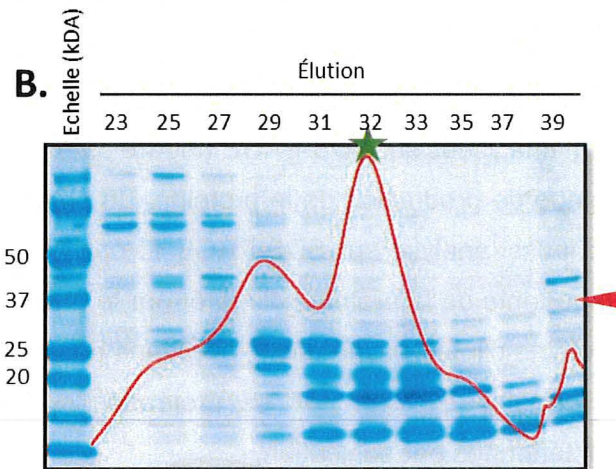
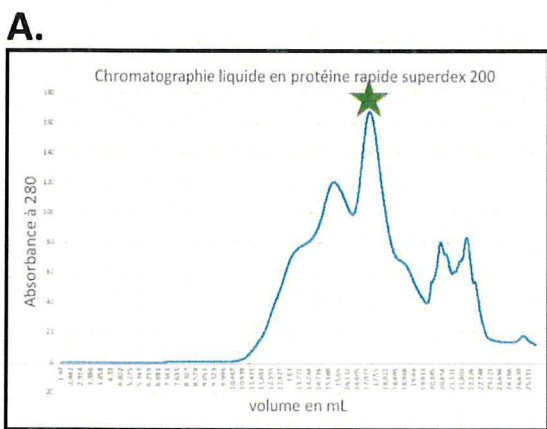


Figure 3.5-4 : Purification au SEC 200 à partir de la purification sur chromatographie d'affinité

(A) Les fractions, contenant la protéine d'intérêt, sont concentrées à 1 mL et injectées dans la colonne d'exclusion stérique Superdex 200 (SEC 200) pour être séparées en fonction de leur volume hydrodynamique. (B) Les éluions sont collectées par fraction de 1 mL et analysées sur SDS-PAGE. La flèche rouge indique la bande à 34 kDa.

3.5.3 Utilisation d'une souche déficiente en protéases périplasmiques

Contrairement à la souche BL21(DE3), la souche PAP5198, déficiente en gène *DegP* (gène régulateur des protéines de choc thermique ; *HSP*), ne peut être cultivée qu'à 30 °C. Elle ne possède pas non plus d'ARN polymérase T7 nécessaire à l'expression du plasmide pET-22b. Pour pallier cette absence, le plasmide PCS6 portant la polymérase T7, est extrait d'une souche bactérienne DH10B et transformé dans PAP5198. Après la transformation, des tests d'induction à 50 µM et à 200 µM d'IPTG à différents temps sont réalisés pour déterminer les conditions optimales d'expression. Le lysat total de bactérie, extrait par Laemmli Bleu, est ensuite analysé sur SDS-PAGE (Figure 3.5-5 A) et par WB anti-étiquette hexahistidine (Figure 3.5-5 B). Il ne semble pas y avoir de différence significative entre les conditions contrôles et induites, ce qui suggère que l'induction de la production de la protéine est faible. Les résultats du WB montrent que les conditions optimales sont à 2 h d'induction puisque la production de la protéine n'est pas plus élevée après une nuit d'expression et le profil de dégradation semble plus marquer après une nuit d'expression. Il est aussi à noter que la concentration d'IPTG ne semble pas avoir d'effet significatif sur la production de la protéine.

Après ces tests, les conditions optimales sont utilisées pour la culture de la bactérie dans les tests de purification de la protéine d'intérêt sur colonne d'affinité. A la différence du protocole « standard » de BL21(DE3), ici l'élution se fait selon un gradient croissant du tampon d'élution B1 (Figure 3.5-6 A). Deux pics sont présents lors de l'élution et ont été analysés, fraction 0 et 2, 3 et 4. La probabilité que PilE se trouve dans la fraction 0 est très faible car le pourcentage d'imidazole est encore très bas à ce stade.

Toutes les fractions ainsi que les échantillons contrôles (prélevés à chaque étape de purification) sont analysées sur SDS-PAGE (Figure 3.5-6 B) et par WB (Figure 3.5-6 C). Il est à noter qu'après l'étape de production de la protéine, un précipitât est observé dans le surnageant. Cet agrégat est aussi analysé sur SDS-PAGE et par WB. Les résultats du WB démontre une dégradation importante de la protéine d'intérêt par la présence d'une inhibition de signal à 17 kDa et peu de protéine d'intérêt. Une des explications possibles de cette dégradation est la reconnaissance de la protéine d'intérêt par les protéases cytoplasmiques lors de la rupture des membranes bactériennes par sonication.

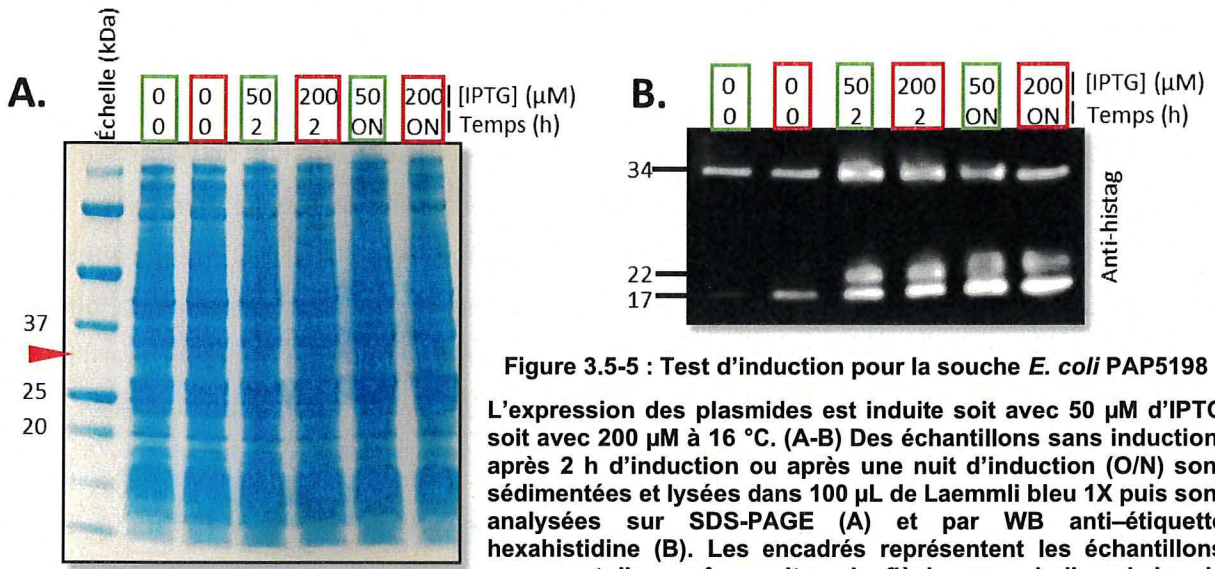


Figure 3.5-5 : Test d'induction pour la souche *E. coli* PAP5198
 L'expression des plasmides est induite soit avec 50 μM d'IPTG soit avec 200 μM à 16 $^{\circ}\text{C}$. (A-B) Des échantillons sans induction, après 2 h d'induction ou après une nuit d'induction (O/N) sont sédimentés et lysés dans 100 μL de Laemmli bleu 1X puis sont analysées sur SDS-PAGE (A) et par WB anti-étiquette hexahistidine (B). Les encadrés représentent les échantillons provenant d'une même culture. La flèche rouge indique la bande à 34 kDa.

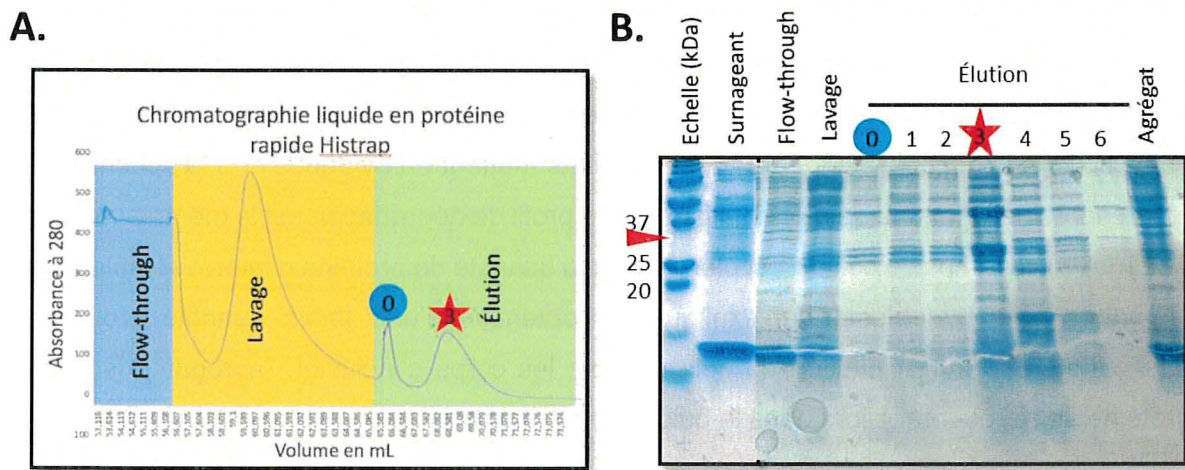


Figure 3.5-6 : Purification sur chromatographie d'affinité de la protéine d'intérêt à partir d'une souche *E. coli* PAP5198

L'expression des plasmides est induite à 50 μM d'IPTG 2 heure à 16 $^{\circ}\text{C}$ puis les cultures sont lysées par sonication. (A) Le surnageant de sonication est injecté dans la chromatographie d'affinité (A) pour être purifié. Les protéines, qui n'ont pas d'affinité avec la colonne, sont directement éluées (Flow-through). Celles, qui ont une faible affinité, sont lavées avec 5 % v/v (lavage) puis elles sont éluées avec 100 % v/v de B1 (éluion). Les éluions sont collectées par fraction de 1 mL. (B-C) Le culot, le surnageant de sonication ainsi que les fractions sont analysées sur SDS-PAGE (B) et par WB avec les anticorps anti-PilE et anti-étiquette hexahistidine (C). Les symboles représentent les pics d'éluions. La flèche rouge indique la bande à 34 kDa.

3.5.4 Comparaison des deux souches bactériennes : BL21(DE3) et PAP5198

Les 2 souches ont été étudiées dans les mêmes conditions, que ce soit au niveau de la culture ou au niveau des analyses sur SDS-PAGE et par WB (conditions et quantités de dépôt sur le même gel). Un contrôle positif est ajouté dans ces tests pour vérifier le bon fonctionnement de l'IPTG et pour comparer les quantités qui sont induites normalement. Sur SDS-PAGE (Figure 3.5-7 A), la surproduction de la protéine contrôle (puit 11-14) est clairement visible entre les conditions non induites (puit 12) et les conditions induites (puit 14). Cela permet de confirmer que l'IPTG est fonctionnel. Ce contrôle permet aussi de donner une idée de la quantité de protéines obtenue lorsque les conditions sont optimales pour l'expression.

Un autre point à noter sur ce gel est l'absence de bande à 34 kDa dans le contrôle positif mais présente dans le contrôle négatif (puit 1 et 6). Cela suggère que la protéine d'intérêt est produite dans les souches en dehors de toute induction par l'IPTG. Dans les WB anti-PilE et anti-étiquette hexahistidine (Figure 3.5-7 B), la différence entre BL21(DE3) et PAP5198 n'est pas significative dans les profils de dégradations pour la protéine d'intérêt. Cette protéine semble, cependant, être produite en plus grande quantité (présence de zone d'inhibition de signal, Figure 5B puit 13 et puit 14) dans la souche BL21(DE3). Ces résultats mettent en évidence que la souche déficiente ne présente pas d'avantage à être utilisée car le profil de dégradation est le même avec la souche BL21(DE3), le temps de culture est plus long et la quantité de protéine d'intérêt semble être moins importante. Une hypothèse, qui expliquerait l'obtention d'une faible quantité protéine après purification, est la précipitation de celle-ci dans les corps d'inclusion (agrégats insolubles). La protéine se retrouverait alors dans le culot de lysat bactérien.

3.5.5 Purification des protéines périplasmiques

La polymyxine B est un antibiotique qui perméabilise la ME des bactéries. Cela relargue les protéines périplasmiques sans libérer les protéines cytoplasmiques. Cette méthode a pour principal intérêt de ne pas libérer les protéases cytoplasmiques. Après incubation de la souche PAP5198 avec la polymyxine B, le surnageant est purifié sur chromatographie d'affinité (Figure 3.5-8A) et analysé sur SDS-PAGE (Figure 3.5-8B). L'extraction avec la polymyxine B ne semble pas libérer notre protéine d'intérêt puisque aucune bande n'est observée à 34 kDa ou que la purification est trop faible pour être détectée sur SDS-PAGE. De plus, lors de l'incubation avec la polymyxine B, un agrégat blanchâtre est observé dans le lysat, il semblerait donc que les protéines d'intérêt s'agrègent lorsqu'elles sont libérées dans le milieu de culture.

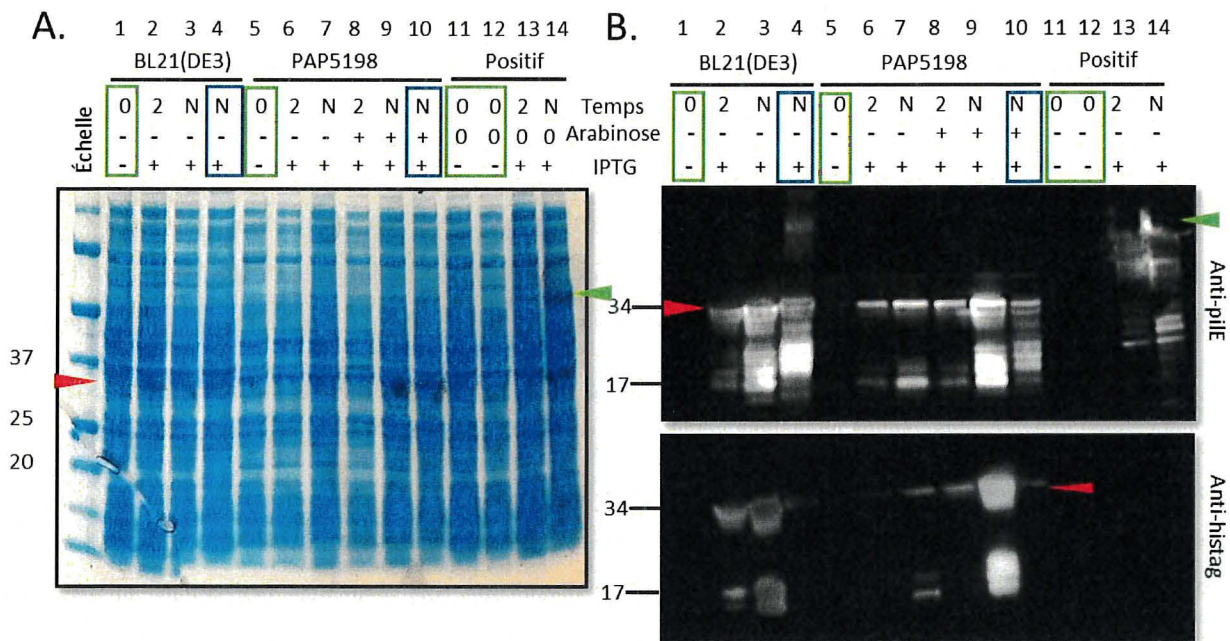


Figure 3.5-7 : Comparaison de la production de la protéine d'intérêt dans les souches PAP5198 et BL21(DE3)
 L'expression des plasmides est induite avec 200 μ M d'IPTG et/ou avec 200 μ M d'arabinose. (A-B) Des échantillons sont prélevés sans induction, après 2 h (2) ou après une nuit d'induction (N). Les bactéries sont lysées dans du Laemmli bleu 1X pour l'extraction de protéines totales. Ces protéines sont analysées sur SDS-PAGE (A), par WB anti-PIIE et par WB anti-étiquette hexahistidine (B). La flèche rouge indique la bande à 34 kDa. La flèche verte indique le bande MBP.

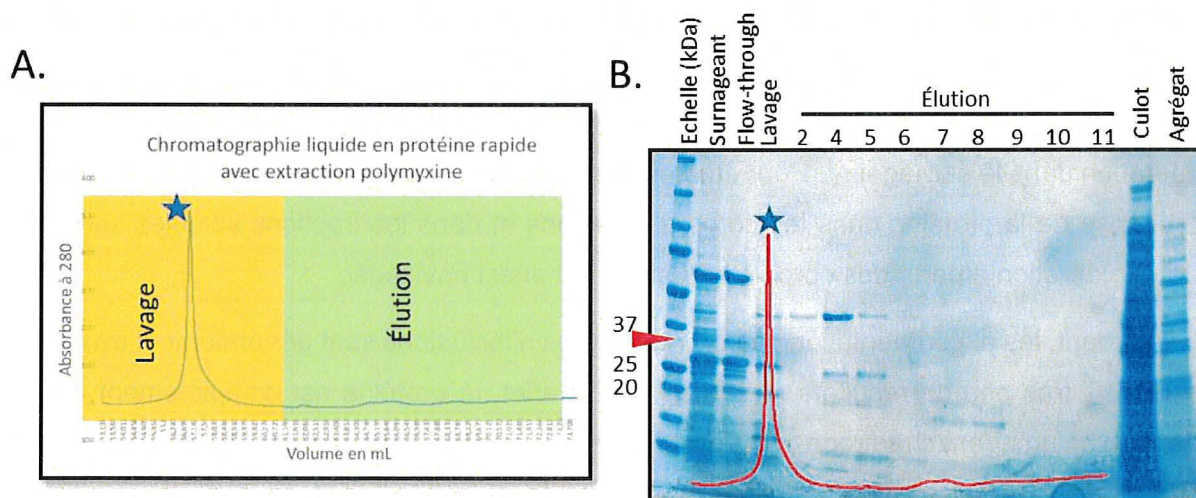


Figure 3.5-8 : Purification de la protéine d'intérêt à partir de la souche PAP5198 avec une extraction des protéines périplasmiques à la polymyxine B

L'expression des plasmides est induite avec 50 μ M d'IPTG 2 h. Les protéines périplasmiques sont extraites par l'utilisation de l'antibiotique polymyxine B. (A) Le surnageant d'extraction est purifié dans la chromatographie d'affinité. (B) Les fractions collectées (1 mL chacune) sont analysées sur SDS-PAGE. L'étoile représente le pic collecté pendant le lavage. La flèche rouge indique la bande à 34 kDa.

3.6 Discussion et conclusion

Les études sur le *tip* de T4P dans les mécanismes d'adhésions peuvent être déterminant dans l'exploration de nouvelles solutions de lutte contre *Nm*. Pour comprendre cela, étudier les protéines, intervenant dans ce mécanisme, est donc essentielle. L'hypothèse que le *tip* du T4P soit directement impliqué dans ce mécanisme semble être probable mais des études supplémentaires doivent être menées. Pour cela, le premier objectif est l'obtention d'une protéine pure ne comportant que des PilE et mimant le *tip* du pilus est nécessaire et en quantité suffisante.

Les expérimentations menées jusqu'à lors n'ont pas donné de résultats satisfaisants. En effet, malgré l'utilisation d'une souche déficiente pour une protéase périplasmique, l'extraction de protéines périplasmiques uniquement ou la purification sur chromatographie d'affinité, la quantité obtenue de protéine recombinante était loin d'être suffisante pour mener des études postérieures. Plusieurs raisons de cette faible obtention sont possibles. La première possibilité serait que la structure de notre protéine n'est pas favorisée par la bactérie. En effet, nous rappelons que notre protéine est une protéine chimérique, composé d'une PilE entier + une tête globulaire de PilE, le tout relié par un *linker*. Ainsi, il se pourrait que lors de la production, la protéine soit directement dégradée à cause de son caractère chimérique ou tout simplement que l'expression de la protéine soit tronquée. Cette possibilité pourrait expliquer la présence de bande dégradation observée sur les WB puisque l'étiquette est située au niveau Nter. La deuxième possibilité est que la conformation tertiaire de la protéine n'est pas bien adoptée au niveau du périplasma et la protéine précipite lors de la lyse bactérienne. La troisième possibilité est que la protéine n'est pas transportée au niveau du périplasma et reste au niveau du cytoplasme, précipitant lors de sa libération dans le surnageant. Pour étudier ces possibilités, une comparaison de la proportion de présence de la protéine dans les corps d'inclusions et dans les fractions solubles seront faites. La récupération à partir des corps d'inclusions est aussi envisagée.

Cependant, les expérimentations à partir des corps d'inclusions sont généralement très variables et donne très peu de résultats satisfaisants. En effet, la protéine est complètement dénaturée dans avec un agent chaotrope puis repliée dans sa conformation tertiaire *in vitro*. La protéine va cependant adopter sa conformation la plus stable et celle-ci peut ne pas correspondre à la conformation native (Machuca & Roujeinikova, 2017). Mais une étude de reconstruction, à partir des corps d'inclusions sur le domaine de liaison périplasmique du ligand dCACHE du chémorécepteur Tlp3, a permis une purification efficace de celui-ci. Étant donné que ce chémorécepteur a une structure similaire à notre protéine d'intérêt, leur protocole pourrait être testé pour la purification de notre protéine. Si le repliement et la conformation tertiaire

correspondent à la structure souhaitée, la protéine pourra être produite dans le cytoplasme puisque les MPTs ne seront plus nécessaires.

D'autres voies d'explorations sont aussi à considérer si la récupération à partir des corps d'inclusions n'est pas efficace. Par exemple, le remplacement de plusieurs éléments sur l'insert sont possibles. D'une part, le déplacement de l'étiquette hexahistidine au niveau Cter permettrait d'obtenir des protéines complètement traduites. D'autre part, le changement de l'étiquette hexahistidine par un tag maltose binding protein (MBPtag) est aussi une possibilité. Le MBPtag est grosse protéine d'environ 30 kb très bien produite par les *E. coli*. Mais à cause de son volume, elle peut aussi être une gêne dans la bonne structuration de la conformation quaternaire de notre protéine. La modification du linker reste aussi une possibilité. Une stratégie d'expression de la protéine recombinante dans le cytoplasme dans une souche mutée pour la formation de ponts disulfures est aussi à considérer. De cette façon, l'expression de la protéine sera beaucoup plus élevée.

Une fois que la protéine est produite en quantité suffisante les étapes postérieures pourront être menées. Dans un premier temps, la structure de la protéine doit être déterminée par cristallographie aux rayons X. Cette méthode requière des quantités très important de protéine, de l'ordre du milligramme de protéine. Elle permet d'obtenir la conformation tri-dimensionnelle de la protéine en passant par des processus de cristallogénèse. Une fois le cristal formé, il est soumis à diffraction des rayons X.

L'autre grande méthode d'étude en émergence est la cryo-microscopie électronique. Cette méthode fige la structure tri-dimensionnelle de la protéine dans leur état natif par une chute brutal de la température à -160 °C dans de l'éthane liquide. Puis une visualisation en microscopie électronique permet l'acquisition d'image 2D de la protéine. Cette méthode requiert beaucoup moins de protéine et augmente la durée de vie des échantillons.

Enfin une fois que la structure souhaitée est obtenue, des études fonctionnelles seront menées. Ces études comprennent notamment l'incubation de la protéine avec des cellules endothéliale pour voir si elle a ou non la capacité d'adhérer sur celle-ci. Cela permettra de répondre à la question de savoir si PilE intervient directement dans les processus de l'adhésion ou est-ce un autre complexe se situant sur la partie proximale. S'il s'avère que PilE intervient directement dans l'adhésion, des études de balayage (screening) de molécules pourront être faite pour inhiber l'adhésion par PilE.

4. CHAPITRE 2 : *MYXOCOCCUS XANTHUS*

Mes travaux portant sur *Myxococcus xanthus* ont été réalisés lors de ma deuxième année de maîtrise au sein du laboratoire du Dr. Charles Calmettes à l'Institut National de Recherche Scientifique.

4.1 Introduction

Les microorganismes (organismes unicellulaires eucaryotes (Gulli *et al.*, 2019), bactéries (Marshall & Whitworth, 2019)...) utilisent un grand éventail d'interactions sociales, qui inclut la coopération et la motilité. La coopération est un mécanisme de partage réciproque entre les différents acteurs qui interviennent. Les comportements individualistes mènent le plus souvent à la défection du groupe entier. La motilité permet un approvisionnement en nutriments et permet ainsi la survie. Au niveau bactérien, un large éventail de systèmes de motilité, environnement-dépendants, existent. Cela inclut la motilité effectuée grâce à une machinerie visible ou invisible à la surface. Ces deux aspects, coopération et motilité, sont notamment retrouvés chez la bactérie *Myxococcus xanthus* (*M. xanthus*), ce qui fait d'elle un excellent modèle d'étude.

Les caractéristiques clés de la vie communautaire de ce modèle, incluant la motilité et le développement multicellulaire, ont été mises à jour par un grand nombre d'études, faisant de lui « l'*Escherichia coli* de la biologie développementale ». *Myxococcus xanthus* est aussi l'une des rares bactéries dont le pattern phylogénétique (évolution à partir d'un ancêtre commun) est très bien connu (Shimkets, 1990). Aussi, au travers de ce modèle, les études sur la régulation des gènes ainsi que les interactions cellules-cellules ont eu de grands avancées notamment grâce à son cycle de vie complexe (Hodgkin & Kaiser, 1979b).

En plus de ces avantages, *M. xanthus* est aussi une bactérie prédatrice qui possède deux systèmes de motilité lui permettant de se déplacer sur des surfaces solides ou humides. Ces systèmes sont respectivement appelés la motilité aventurière (A-motilité) utilisant le système de *gliding*, et la motilité sociale (S-motilité) utilisant le système de l'extension et la rétractation du T4P (Hodgkin & Kaiser, 1979b). De nombreux mécanismes de ces systèmes ont été étudiés afin de comprendre leur fonctionnement mais beaucoup d'autres restent encore à explorer. Ces systèmes sont complémentaires l'un de l'autre : l'un est une motilité individuelle (A-motilité) activée préférentiellement sur des surfaces dures, l'autre (S-motilité) est plutôt activée sur des surfaces moles pour faciliter l'expansion des essaims entières.

Les machineries utilisées par ces 2 systèmes sont différentes mais les deux types de motilité montrent des rôles importants pour les polysaccharides sécrétés. Ces sucres sont importants puisqu'ils constituent un point d'ancrage autour des cellules pour les T4P pendant la S-motilité, et ils sont retrouvés dans le sillon des bactéries où ils démontrent des propriétés adhésives dans la motilité de type *gliding*. La résolution du mécanisme de sécrétion des polysaccharides est donc un point important à étudier (Ducret *et al.*, 2013; Islam *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2003).

4.2 Revue de la littérature

4.2.1 *Myxococcus xanthus* : Caractéristiques

Myxococcus xanthus est une bactérie bacillaire non-pathogène, faisant partie de la classe des Delta Proteobacteria et de la famille Myxococcaceae, retrouvée majoritairement dans les sols (Singh, 1947) et dans les sédiments marins (Iizuka *et al.*, 1998). Elle a été décrite pour la première fois en 1941 par J.M BEEBE et appartient à la catégorie des bactéries à Gram-négatif (Beebe, 1941). *Myxococcus xanthus*, comme les autres Myxobactéries, est une bactérie prédatrice capable de chasser un large panel de microorganismes. Cela inclut les bactéries à Gram négatif et les Gram positif, pathogènes ou non, mais aussi les cellules eucaryotes isolées ainsi que des fungi (Livingstone *et al.*, 2017; Morgan *et al.*, 2010). Elle présente aussi plusieurs autres caractéristiques qui font d'elle une bactérie unique. Elle possède, d'une part, deux systèmes de motilité lui permettant de se déplacer sur des surfaces dures, et d'autre part, un cycle de vie complexe et particulier qui dépend de son environnement.

4.2.2 *Myxococcus xanthus* : Cycle de vie

Le cycle de vie de *M. xanthus* comporte 2 phases environnement-dépendantes : d'une part le développement végétatif et la prédation coopérative (« *wolf pack* ») et, d'autre part, le développement multicellulaire (Figure 4.2-1).

En effet, en présence d'un environnement riche en nutriments (présence de proies), *M. xanthus*, en tant que bactérie sociale et coopérative, utilise une stratégie de « *wolf pack* ». Elle est permise notamment par la coordination de plusieurs cellules végétatives pour former un groupe multicellulaire dynamique qui se réfère à un essaim, « *swarm* ». Elle augmente ainsi l'efficacité de chacune des individus pour les activités comme la lyse des proies et dégradation de la biomasse relarguée par la lyse au sein du groupe.

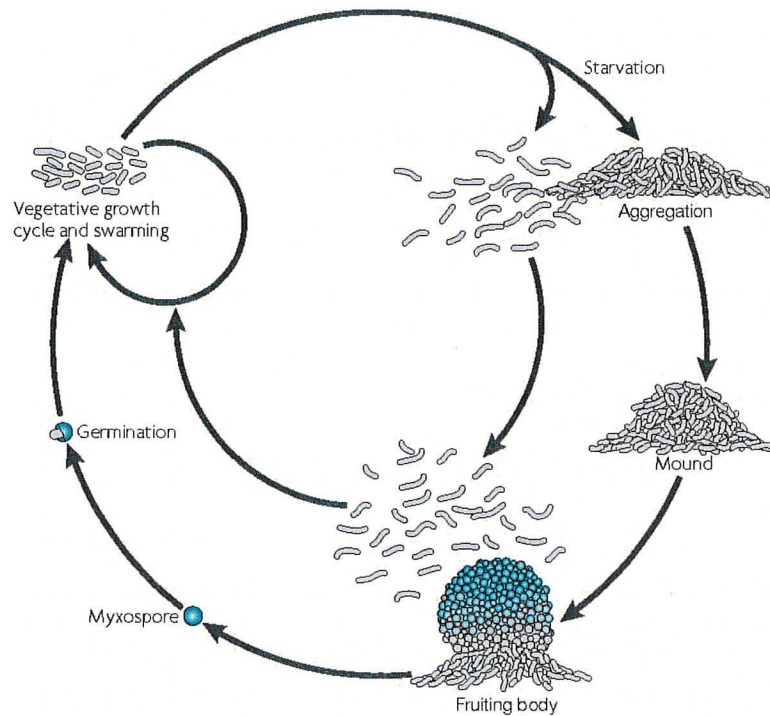


Figure 4.2-1 : Cycle de vie complexe environnement-dépendant de *Myxococcus xanthus*

Le cycle de vie de *M. xanthus* dépend de son environnement, en l'occurrence de la présence ou non de nutriment nécessaire pour développement. Dans un environnement riche, les bactéries se développent et se divisent. Des essaims se forment aussi pour aller chercher d'autres nutriments comme des proies ou des macromolécules. En cas de famine, ils se rassemblent pour former des corps fructifères contenant des myxospores. Cette forme sphérique est métaboliquement inactive et permet d'être partiellement résistant à la dessiccation et à la chaleur. Les bactéries périphériques se dispersent pour aller chercher les ressources nécessaires. Une fois trouvées, les spores germent et les cellules, qui s'ensuivent, migrent vers ce nouveaux environnement. Schéma tiré de (Zusman *et al.*, 2007).

Cette efficacité est dépendante de la densité cellulaire du groupe en question, car plus cette densité est importante, plus la dégradation de la biomasse est efficace. La dégradation de cette biomasse est utilisée pour le développement végétatif (Rosenberg *et al.*, 1977). De plus, l'augmentation de la densité cellulaire permet aussi d'augmenter indirectement son pouvoir prédateur puisque la dispersion des bactéries, à la recherche de proies, sera plus importante.

L'une des premières étapes de la prédation réside dans la capacité de motilité de *M. xanthus*. En effet, pour pouvoir traquer efficacement sa proie, *M. xanthus* a besoin d'être au contact de sa proie pour la lyser (McBride & Zusman, 1996; Pan *et al.*, 2013). Pour cela, elle commence le repérage des proies par A-motilité de gliding, qui est le déplacement d'une cellule individuelle, permettant ainsi une couverture plus grande du terrain de chasse. Une fois que la proie est repérée, les autres bactéries se regroupent et convergent vers cette proie par la S-motilité. Le contact de l'essaim sur la proie enclenche la sécrétion de métabolites secondaires ainsi que des enzymes hydrolytiques, issues de vésicules de la ME. Cela hydrolyse les proies, relarguant ainsi

leur contenu. Ce type de stratégie permet à la bactérie d'avoir l'accès le plus rapide pour l'obtention des ressources nécessaires à son développement (Berleman *et al.*, 2014; Hodgkin & Kaiser, 1979b). Un autre phénomène est aussi observé lors de la destruction des proies, celui de la formation d'ondulations, qui augmente la surface de contact avec les proies et, par conséquent, l'efficacité de la prédation. Ce phénomène d'ondulation est aussi observé lorsque la bactérie est dans un état de famine (Berleman *et al.*, 2006; Gronewold & Kaiser, 2001).

Dans un milieu pauvre en nutriments, les bactéries se regroupent et commencent un processus de survie en mettant en place un développement multicellulaire qui mènera à la formation de ce qui est appelé un corps fructifère (*fruiting body*). Cette structure pourrait être comparée à la structuration d'une tumeur métastatique. En effet, une partie des bactéries forme le corps principal, composé de myxospores (forme résistante), et l'autre partie est formée de bactéries qui vont entrer dans une mort cellulaire programmée (Lee *et al.*, 2012), permettant ainsi le maintien de l'apport nutritionnel au corps principal jusqu'à ce que des conditions plus favorables soit atteintes. De l'autre côté, des bactéries scouts continuent leur recherche pour un environnement plus favorable à son développement. Lorsque les myxospores rencontrent un environnement plus riches en nutriments, ils germent pour démarrer leur cycle végétatif (O'Connor & Zusman, 1991; Shimkets & Seale, 1975).

La transition de la forme unicellulaire à la forme multicellulaire requiert des composants structuraux extracellulaires, comme l'exopolysaccharide (EPS) qui permettent la cohésion des cellules entre elles (Berleman *et al.*, 2016). La formation de ces structures est sous le contrôle de gènes, dont *frizzy* (*Frz*) (Weinberg & Zusman, 1989), et de machineries de piliation impliquées dans la S-motilité.

4.2.3 Motilité sociale

La S-motilité met en jeu la coopération de plusieurs cellules, que ce soit dans le cadre de la prédation ou celui de la formation du corps fructifère. En effet, les bactéries qui ne possèdent que les gènes permettant la motilité sociale ($A^- S^+$), sont capables de se mouvoir en groupe, mais reste non-motiles individuellement (Hodgkin & Kaiser, 1979b). Cette motilité fait intervenir, comme dans le cas de la motilité de *twitching*, T4P ainsi que la machinerie de piliation (voir chapitre 1) (Wu & Kaiser, 1995). Ici, les noms des différentes sous-unités sont différents, mais les mécanismes de piliation et de rétractation restent les mêmes. Cependant, les sites de fixation des pili sont complètement différents par rapport à la motilité de *twitching*. En effet, dans la S-motilité, le T4P ne se fixe pas sur une surface pour effectuer le mouvement et se déplacer, mais

sur les polysaccharides d'une autre myxobactérie. Une fois ancrée, la bactérie rétracte alors son T4P, ce qui génère une force l'attirant vers l'avant. Il a aussi été montré que cette rétraction pouvait atteindre une puissance considérable, atteignant des centaines de piconewtons (Clausen *et al.*, 2009). Les sites de fixations du pilus ne se font ni sur des composants aléatoires à la surface des myxobactéries, ni sur celui de la membrane externe. Elles se font sur les fibrilles extracellulaires, composées de polysaccharides (Li *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2005).

4.2.4 Polysaccharides sécrétés : caractéristiques et voies de synthèse

Les polysaccharides sécrétés de haute poids moléculaire (PM) sont omniprésents chez les bactéries. Ces structures peuvent être retrouvées attachées à la surface externe de la cellule ou excrétées dans le milieu extérieur sous forme soluble ou insoluble et offre plusieurs propriétés indispensables à la survie des bactéries (Kenne & Lindberg, 1983). Elles sont notamment un moyen de défense contre les substances anti-microbiales, les bactériophages ou encore contre les antibiotiques. Outre ces propriétés, elles offrent aussi un moyen d'adhésion lors de l'agrégation des bactéries pendant la formation du corps fructifère ou lors de la S-motilité. De plus, la pathogénicité des microorganismes est aussi corrélée au niveau de la production et de la sécrétion de ces polymères. En effet, la perte de l'expression diminue le pouvoir pathogène des bactéries pathogènes (Suresh Kumar *et al.*, 2007).

Chez *M. xanthus*, plusieurs polysaccharides sécrétés sont connus :

- Antigène O : un des composants de la lipopolysaccharide qui est typiquement constituée du lipide A, de corps oligosaccharidiques et de l'antigène O (Raetz & Whitfield, 2002). Il n'est pas essentiel pour le croissance des bactéries (Reeves & Wang, 2002) mais il intervient dans plusieurs autres mécanismes chez *M. xanthus* comme la motilité (aussi bien la S-motilité que celui du *gliding*) ou encore la formation du corps fructifère (Perez-Burgos *et al.*, 2019)
- *Slime* : son rôle n'est pas encore très bien connu mais il semble avoir une utilité dans la motilité de *gliding* notamment en fluidifiant le mouvement (Islam & Mignot, 2015)
- Exopolysaccharide (EPS) : intervient dans plusieurs fonctions notamment la S-motilité, la formation de corps fructifères et du biofilm, l'adhésion des cellules entre-elles, la protection des cellules contre les environnements hostiles etc... (Islam *et al.*, 2020; Pan *et al.*, 2013; Zhou & Nan, 2017)
- Biosurfactant polysaccharide (BPS) : joue aussi un rôle dans la S-motilité et dans le développement de *M. xanthus* (Islam *et al.*, 2020)

- *Major spore coat* (MASC) polymère : nécessaire pour former la couche extérieure des myxospores (Muller *et al.*, 2012)

Il existe trois voies principales pour synthétiser les polysaccharides sécrétés chez les bactéries: la voie ABC (ATP-binding cassette) transporteur dépendant (Greenfield & Whitfield, 2012), la voie synthase-dépendante (Keenleyside & Whitfield, 1996) et la voie Wzx/wzy dépendante (Islam & Lam, 2013). Ces voies sont décrites dans la Figure 4.2-2.

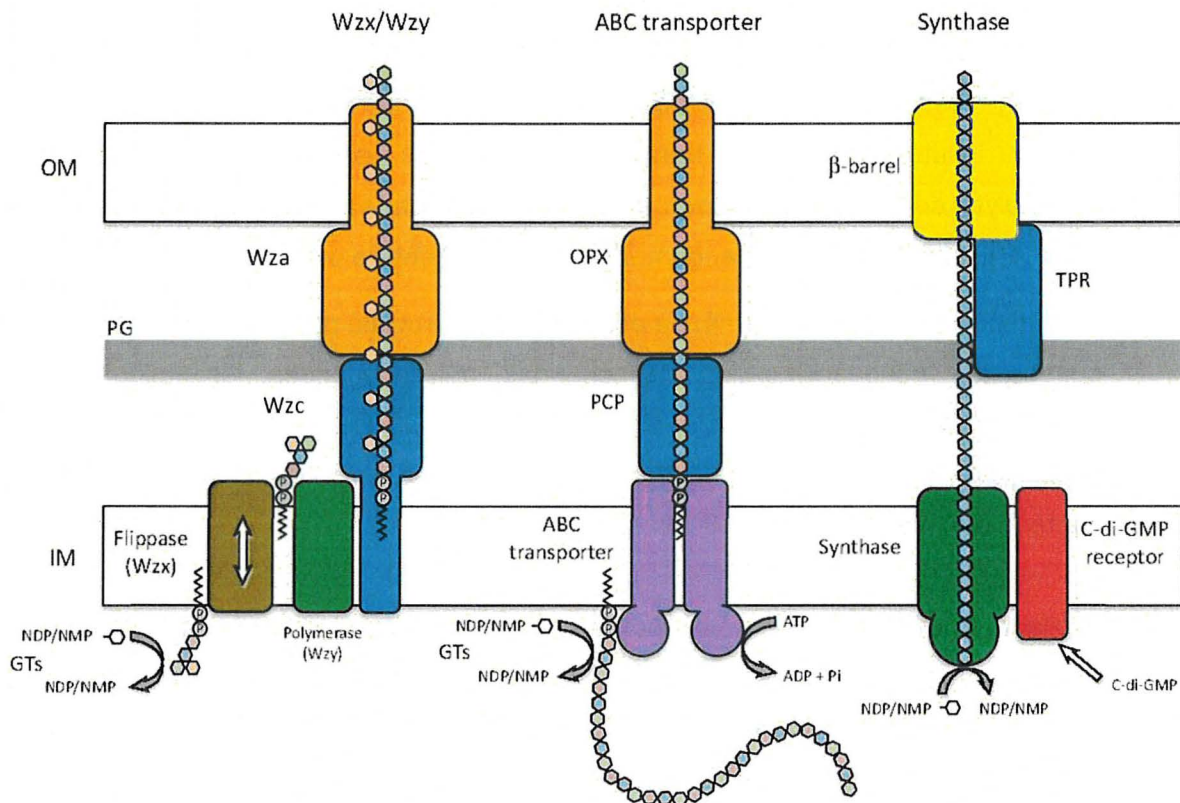


Figure 4.2-2 : mécanisme de sécrétions de polysaccharides. Représentation schématique des voies de biosynthèse et d'export de Wzx/wzy dépendante, ABC transporteur dépendante et synthase-dépendante

Wzx/Wzy : la translocation du polysaccharide depuis la membrane interne côté cytoplasme vers côté périplasma est assurée par Wzx. Dans le périplasma, elles sont assemblées par Wzy en polysaccharide mature et exportées à travers la ME par Wzc et Wza. **ABC transporteur** : à la différence de la voie Wxy/Wxz, la maturation se fait dans le feuillet interne de la membrane interne, la translocation par l'ABC transporteur et l'exportation par OPX et PCP. **Synthase-dépendante** : la polymérisation et la translocation sont simultanées dans la membrane interne. L'export est assuré par un beta-barrel et TPR. Abréviations: OPX, export polysaccharidiques de la ME; PCP, polysaccharide co-polymerase; TPR, tetratricopeptide repeat proteins; MI, membrane interne; PG, peptidoglycan sacculus; ME, membrane externe; c-di-GMP, bis-(30-50)-cyclic dimeric guanosine monophosphate; ABC transporter, ATP-binding cassette transporter. Image modifiée de (Whitney & Howell, 2013)

4.2.4.1 Voie ABC transporteur dépendante

Les protéines, peptides, polysaccharides et autres molécules qui sont synthétisés dans le cytoplasme de la bactérie doivent traverser une ou plusieurs membranes pour atteindre leur destination finale. Ils utilisent ainsi pour la plupart du temps le voie Sec-dépendant (Pugsley, 1993). Cependant, les molécules non protéiques, ou ceux qui sont excrétés dans l'environnement extérieur, ne sont pas toujours capable d'utiliser cette voie et doivent se tourner vers d'autres voies d'exportation comme les ABC transporteurs dépendants (Fath & Kolter, 1993).

Les ABC transporteurs peuvent être classés en 3 groupes majeurs : l'importeur bactérienne, le transporteur (ou exporteur car il n'y a pas d'importeur) eucaryotique et l'exporteur bactérienne (Fath & Kolter, 1993). Les importeurs et les exporteurs sont différenciés par la polarité de mouvement du soluté déplacé. Ces transporteurs sont des pompes actifs, c'est-à-dire qu'ils utilisent l'hydrolyse de l'ATP comme source énergie ce qui permet de changer la conformation du transporteur (Wilkins, 2015). Ce changement induit alors l'entrée ou la sortie du soluté.

- ABC importeur : est une perméase périplasmique, cruciale pour l'assimilation des solutés comme les monosaccharides, disaccharides, polysaccharides, les amino-acides, les phospholipides, les cholestérols, les nucléosides, les ions métalliques et les vitamines. Cette voie peut être impliquée dans l'assimilation d'ion ferrique chez *NM* lorsque la bactérie est privée de cet ion (Fath & Kolter, 1993)
- ABC exporteur : appartient à la voie de sécrétion de protéines de type 1 chez les bactéries (Holland, 2004). Ce type de transporteur est généralement composé de 3 parties : ABC exporteur, protéine de fusion de membrane, et un facteur de la membrane externe, respectivement ABC transporteur, PCP et OPX sur la Figure 4.2-2. Cette voie est responsable de la synthèse de l'antigène O et de l'agrégation développemental chez *M. xanthus* (Islam & Mignot, 2015; Ward *et al.*, 1998)

4.2.4.2 Voie synthase-dépendante

La voie synthase-dépendante diffère des deux voies notamment par sa capacité à fonctionner en présence ou non d'un accepteur de lipide (ici le lipide A par exemple). Dans ces conditions, il est donc plus simple pour la transférase de transférer le polysaccharide depuis le compartiment cytoplasmique à travers la membrane interne. Durant son passage dans le périplasma, la protéine répétée de tetratricopeptide (TPR) protège le polysaccharide de la dégradation jusqu'à ce qu'il ne soit exporté à travers une beta-barrel de la membrane externe vers l'environnement extérieur (Whitney & Howell, 2013).

Les EPSs qui ont été classifiés utilisant cette voie inclus : alginate, poly- β (1,6)-N-acetyl-d-glucosamine (PNAG), cellulose, cellulose acétylé, et plus récemment le Pel polysaccharide. Cependant cette voie n'a pas encore été identifié chez *M. xanthus* (Low & Howell, 2018).

4.2.4.3 Voie Wzx/Wzy dépendante

L'assemblage des monomères grâce à la voie Wzx-Wzy-dépendante (Figure 4.2-3) est très bien conservé entre les différents organismes qui l'utilisent.

Cet assemblage est initié par une liaison pyrophosphate d'un monomère de sucre sur une molécule transporteur, appelée undecaprenyl pyrophosphate (UndPP), grâce à un glycosyltransférase au niveau du feuillet interne de la MI. D'autres monomères de sucres sont alors ajoutés par des glycosyltransférases spécifiques par la suite formant une unité répétée de polysaccharides UndPP-lié. Cette unité est ensuite transloquée à travers la MI par une flippase Wzx. Une fois dans le périplasme, ces monomères sont polymérisés grâce au Wzy par un mécanisme putatif *catch-and-release*. La longueur de la polymérisation est contrôlée par la protéine périplasmique Wzz/Wzc, désignée comme un polysaccharide co-polymérase (Feldman *et al.*, 1999; Islam *et al.*, 2011; Islam & Lam, 2013; Liu *et al.*, 1996; Woodward *et al.*, 2010). Wzc, pour être active, a besoin d'une autophosphorylation ainsi qu'une déphosphorylation par Wzb (essentiel pour la synthèse)(Paiment *et al.*, 2002). Une analyse biochimique a mis en évidence que Wzc interagissait aussi avec un complexe, utilisé lors du transport des polysaccharides à travers la ME depuis le compartiment périplasmique vers le milieu extérieur, Wza (Collins *et al.*, 2007; Islam & Lam, 2014; Nesper *et al.*, 2003; Reid & Whitfield, 2005).

En plus de permettre l'assemblage de l'EPS, elle permet aussi la maturation des sucres qui interviennent dans la formation du MASC (sécrété lors de la transition de la forme végétative à l'état de spore/ forme de résistance) (Holkenbrink *et al.*, 2014), des capsules polysaccharidiques, des antigènes communs aux entérobactéries et d'un nouveau polysaccharide putatif intervenant dans le renforcement de l'adhésion cellule-surface de la bactérie, le BPS (Islam *et al.*, 2020).

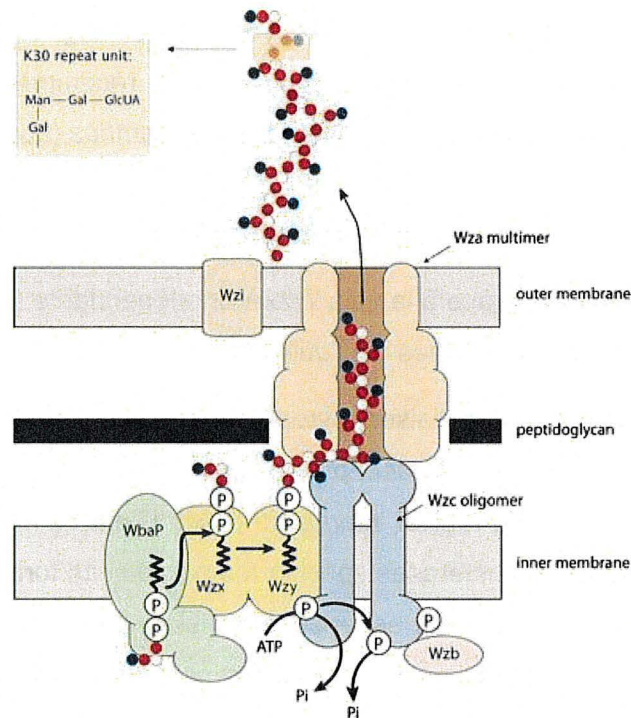


Figure 4.2-3 : représentation en cartoon de la synthèse et d'export de la voie Wzx/wzy dépendante chez *E. coli*

L'ancrage des polysaccharides est assuré par WbaP sur le feuillet interne de la MI. La translocation est faite par Wzx puis les polysaccharides sont maturés (assemblés) par Wzy. La transphosphorylation de Wzc et sa déphosphorylation assurée par Wzb permet de maintenir un niveau de constant de polymérisation et son export. En Wza, une protéine de la ME est essentiel pour l'export (Collins et al., 2007).

4.2.1 Translocon WZA : protéines sécrétaires de la membrane externe chez *Escherichia coli*

Chez la bactérie *E. coli*, Wza est une lipoprotéine formant un pore dans la ME. Les études de microscopie électronique ont montré que Wza se présente sous la forme d'une structure octamérique en anneau qui forme un canal transmembranaire à travers la ME. En marquage négatif de cryo-microscopie électronique (cryo-EM), ce canal présente une forme de champignon, de dimension 90 Å x 90 Å x 100 Å avec une large cavité centrale, mais ces images de microscopie ne donnent aucune information concernant le mécanisme de transport (Beis *et al.*, 2004; Nesper *et al.*, 2003). Une étude de cristallographie aux rayons X, menée par (Dong *et al.*, 2006), a permis par la suite de préciser la structure de cet octamère et d'identifier le pore de sécrétion. Puis, une étude biochimique a montré que la polymère capsulaire passait bien par l'intérieur de ce canal (Nickerson *et al.*, 2014).

D'une part, la résolution de la diffraction du cristal obtenu par cristallographie aux rayons X confirme que Wza se présente bien sous la forme d'un octamère mais plutôt sous la forme d'une vase « amphore » avec une base deux fois plus large que le « col » (Figure 4.2-4). D'autre part,

elle révèle aussi des structures qui n'ont pas été visualisées en cryo-EM. Ainsi, Wza, chez *E. coli* est une protéine octamérique de 340 kDa composée d'une partie périplasmique et d'une partie intégrée dans la ME de la bactérie.

La partie de Wza située dans le périplasma correspond assez bien aux données issues de la cryo-EM. Elle est notamment composée de monomères comportant 3 domaines, 1 pour la base (R1 Figure 4.2-4), 1 pour le milieu (R2) et 1 pour celui près de la ME (R3). Chacun des domaines assemblés forme des anneaux, mais leurs structures sont différentes malgré le fait qu'elles aient les mêmes dimensions. Plus précisément, le domaine 1 est différent des deux autres, qui sont similaires entre eux (Dong *et al.*, 2006). Cette différence de structuration s'explique notamment par l'interaction de Wza avec Wzc (Collins *et al.*, 2007).

Les structures qui ne sont pas visibles en cryo-EM concernent celles qui sont intégrées à la membrane externe (R4 de la Figure 4.2-4). Ces structures ont été montrées comme dynamiques car elles possèdent une conformation ouverte et une fermée (Collins *et al.*, 2007; Reid & Whitfield, 2005). C'est cette instabilité qui rend ces structures non visibles en cryo-EM. Le changement de conformation est par ailleurs sous le contrôle de la protéine Wzc, permettant la libération du polysaccharide. Naturellement, l'absence de Wza mène à l'absence de capsule ou encore de production de polymère à la surface de la bactérie, mais plus étonnamment, elle mène aussi à l'absence de polymère intracellulaire. Cela laisse suggérer que les voies de synthèse et d'export sont associées (Collins *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 2007).

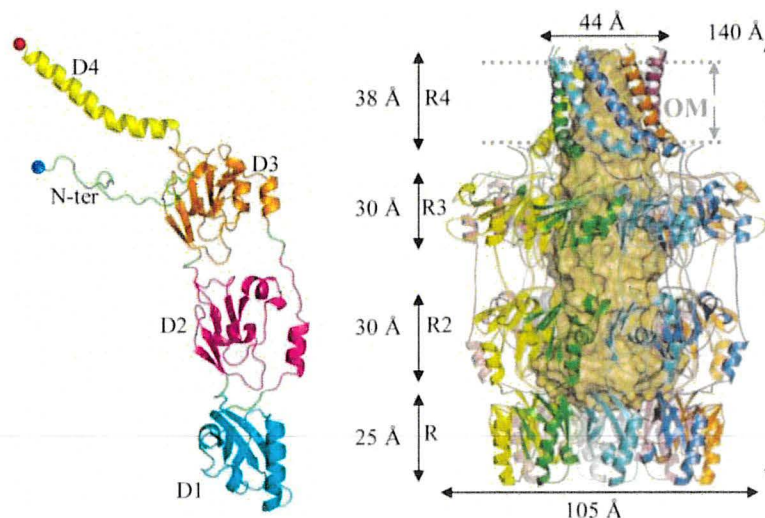


Figure 4.2-4 : Structure cristallographique de Wza chez *E. coli*

Les quatre domaines d'une sous-unité de Wza est ici annoté de D1 à D4. Le N-terminal est représenté par la boule bleu et le C-terminal par la boule rouge (à gauche). Chacune des domaines de l'octamère Wza forment un forme circulaire, noté de R1 à R4. R1 représente la base et R4 le « neck » qui est ancré à la ME Structures issus de (Dong *et al.*, 2006).

Une étude récente de (Niu *et al.*, 2020), a démontré que Wza possède aussi des effets de contrôle indirect sur l'expression des différents gènes qui interviennent dans les voies de synthèse Wzy. En effet, lorsque Wza est éteint (KO) sur le chromosome de la bactérie, des évidences ont montré qu'elle va diminuer l'expression des gènes de Wzc, Wzb et de Wzi (protéine essentielle dans l'initiation de l'ancrage du polysaccharide capsulaire à la surface de la cellule, chez *E. coli*). D'un autre côté, pour éviter l'accumulation de polysaccharides au niveau de son périplasme qui est toxique pour la bactérie, elle doit diminuer l'expression des gènes impliqués dans la voie de polymérisation. Cela laisse donc suggérer que Wza contrôle aussi les gènes de Wzx, Wzy et de Wzz/Wzc même si aucune preuve n'a encore été rapportée. Elle va ainsi affecter l'assemblage, l'export ainsi que la fixation extracellulaire des polysaccharides.

4.2.2 Trois translocons Wza différents chez *Myxococcus xanthus*

Chez *M. xanthus*, il existe à ce jour trois complexes Wza connus. Deux d'entre eux sont connus depuis longtemps et interviennent dans l'export de l'EPS et celui du MASC (Holkenbrink *et al.*, 2014). Le dernier a été découvert récemment et est notamment impliqué dans le transport du BPS. Ces trois complexes semblent indépendants les uns des autres (Figure 4.2-5). En effet, lorsqu'une mutation est effectuée sur l'un des complexes, la fonctionnalité des deux autres complexes n'est pas affectée. De plus, une étude génomique a montré que les gènes impliqués dans leur transcription sont séparés d'au moins deux loci chromosomiques (Islam *et al.*, 2020). Ces résultats montrent clairement une différence entre le complexe Wza d'*E. coli* et celui de *M. xanthus*. De plus, cela laisse présager que les structures de ces différents Wza seront aussi différentes, que ce soit inter-espèces ou intra-espèces. Cela mène alors à l'un des objectifs mené dans la présente étude, à savoir la résolution de la structure des trois systèmes Wza présents chez *M. xanthus*, grâce à des études de diffraction de cristallographie aux rayons X.

La résolution de la structure permettra par la suite la résolution des mécanismes de fonctionnement au niveau moléculaire. Cela mènera à une grande avancée dans la compréhension des transporteurs de sucre et tout particulièrement celui du BPS, qui semble être impliqué dans l'A-motilité.

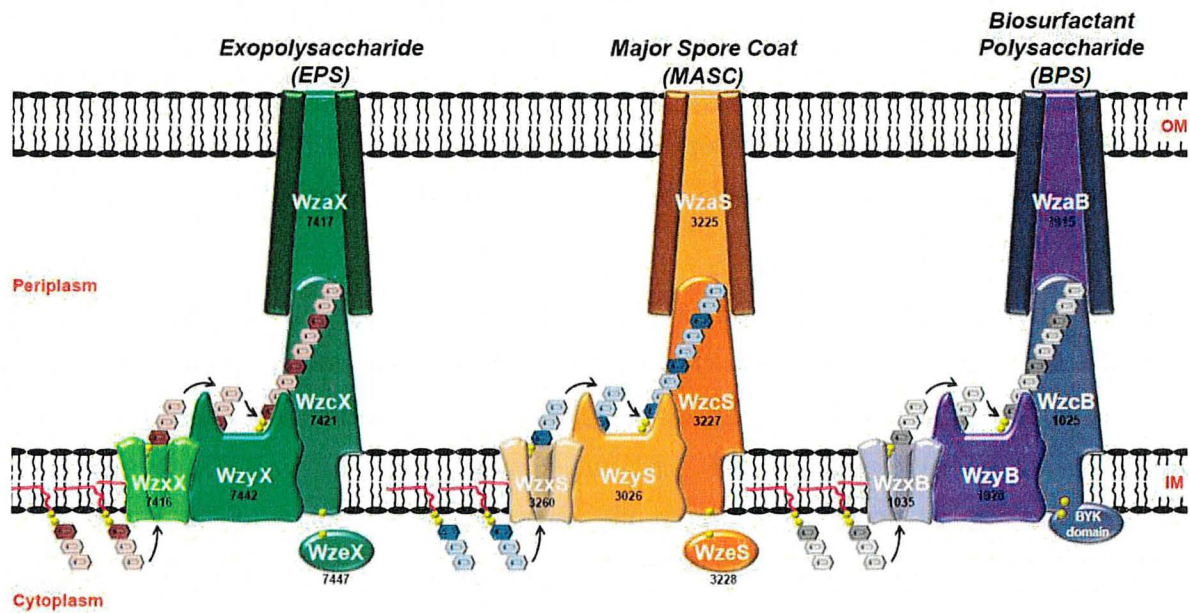


Figure 4.2-5 : Représentation schématique des différents sécréteurs de sucres chez *M. xanthus*

La synthèse du polymère de sucres commence dans le cytoplasme. Les monomères de sucres sont transloqués à travers la membrane interne grâce à une flippase, Wzx. Puis l'élongation est assurée par Wzy et contrôlée par Wzc. Enfin une fois la sécrétion est assurée par Wza. Illustration tirée de (Islam *et al.*, 2020).

4.2.3 Motilité aventurière

L'A-motilité est une motilité permettant à une cellule individuelle de glisser sur une surface dure, sans présence d'appendice extracellulaire. Cette motilité est plus favorisée sur les surfaces solides, fermes et sèches à l'instar de la S-motilité qui est préférée dans un environnement plus humide et plus mou (Shi & Zusman, 1993). Cette motilité est possible grâce à un système de *gliding*, composé de plusieurs complexes protéiques, ainsi que par le contrôle de plusieurs gènes (Luciano *et al.*, 2011; Youderian *et al.*, 2003; Youderian & Hartzell, 2006), dont notamment le système *Frz*, qui est aussi impliqué dans la formation du corps fructifère (pour le rôle des différents gènes et de leurs régulations, consultez (Islam & Mignot, 2015)).

Le système *Frz* est notamment impliqué dans la fréquence d'inversement du mouvement chez la bactérie (Blackhart & Zusman, 1985). Quand la bactérie change de sens, le front de migration, celui qui conduit le mouvement, devient le pôle arrière ou *lagging pole*. Les périodes de réversion dépendent de plusieurs facteurs environnementaux comme les substances attractantes et repoussantes, mais aussi la densité cellulaire (Kearns & Shimkets, 1998; Shi *et al.*, 1996). Le contrôle de la direction de réversion chez *M. xanthus* est analogue aux complexes de contrôle de la chimiotaxie chez *E. coli*.

Chez *E. coli*, les signaux sont captés par le récepteur *methyl-accepting chemotaxis proteins* (MCP) qui, en interaction avec une protéine de couplage CheW, induit CheA, une histidine kinase, à son autophosphorylation sur un résidu histidine conservé. Le groupe phosphate est par la suite transféré sur un résidu aspartate du régulateur protéique cytoplasmique, CheY. Enfin, CheY est lié sur le moteur d'échange flagellaire protéique, ce qui cause une réorientation directionnelle (Boyd & Simon, 1982).

Chez *M. xanthus*, la voie de signalisation Frz comprend une protéine cytoplasmique équivalente à MCP, FrzCD, une fusion de CheA-CheY (FrzE) et un homologue CheW (FrzA). De plus, elle possède aussi des complexes protéiques supplémentaires comme FrzB, une autre homologue de CheW, une méthyltransférase, FrzF, ainsi qu'une méthyl-estérase FrzG (Trudeau *et al.*, 1996). Cette voie de signalisation est très importante puisqu'elle va interagir par FrzCD avec AglZ, une protéine versatile, indispensable aux mécanismes de *gliding* et à la sporulation (Faure *et al.*, 2016; Mauriello *et al.*, 2009; Wartel *et al.*, 2013).

4.2.4 Modèle slime gun

Par le passé, de nombreux modèles ont été proposés pour expliquer le fonctionnement du *gliding* motility puis modifiés avec les nouvelles études qui étaient publiées. L'un d'entre eux concerne le modèle de sécrétion de slime aux pôles arrière des cellules, ou *slime gun* (Figure 4.2-6). Ce modèle a été proposé par l'équipe de Jahn, car des traînées de slimes ont été observées sur les plaques d'agar (Jahn, 1924; Yu & Kaiser, 2007). Ces traînées sont présentes chez les bactéries capables ou non de S-motilité. Il a été proposé que *M. xanthus* se propulsait grâce à ces sécrétions à travers des pores complexes, appelés des *nozzles*. Ces pores sont présents tout le long de la bactérie, mais ils sont particulièrement concentrés au niveau des pôles (Wolgemuth *et al.*, 2002). Des observations, faites par les Dr. Yu et Kaiser, démontrent aussi que les sécrétions sont retrouvées au niveau des deux pôles lorsque la bactérie est mutée pour l'A-motilité (Yu & Kaiser, 2007). De plus, il semblerait que les bactéries préfèrent suivre une traînée préexistante plutôt que d'en former une nouvelle (Burchard, 1982). Malgré l'incapacité de l'A-motilité, l'observation de sécrétion infirme l'hypothèse que ces sécrétions interviennent dans la propulsion de la bactérie. Aussi le comportement d'utilisation d'une traînée préexistante démontre que ces sécrétions ne sont pas utilisées dans la propulsion.

Ces slimes devrait cependant avoir un rôle essentiel dans l'A-motilité puisqu'elles sont sécrétées continuellement. Une des hypothèses émises est qu'elles pourraient avoir des propriétés biosurfactantes, qui permettraient à la bactérie de glisser plus facilement sur les surfaces solides.

L'autre hypothèse serait que ces éléments serviraient comme point d'ancrage à la bactérie pour s'y accrocher (Ducret *et al.*, 2012). Dans ces deux cas, il y a une dépense importante d'énergie pour la production et la sécrétion de slimes sauf si la bactérie suit un chemin préexistant. Ce phénomène de suivi est notamment observé lorsqu'une source d'énergie est trouvée (Burchard, 1982). Pour étudier ces hypothèses, des analyses sur la composition de ces sécrétions ont été menées. Malheureusement, la diversité des composants n'a pas permis d'identifier celui qui contribue à l'adhésion. En effet, des polysaccharides combinés avec des sécrétions vésiculaires sont présents, ce qui représente un grand nombre d'éléments du microenvironnement (Ducret *et al.*, 2013).

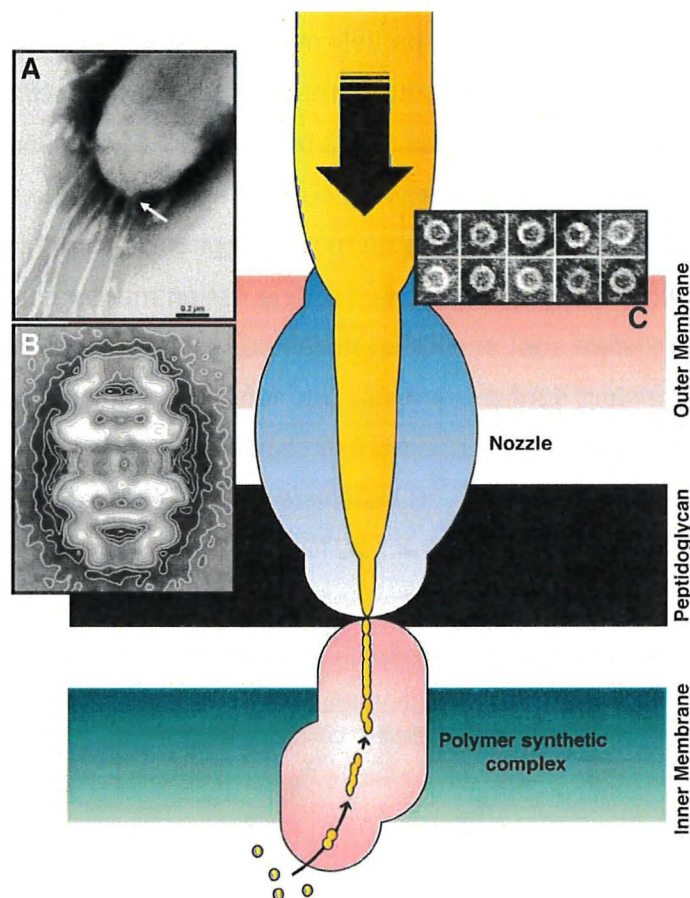


Figure 4.2-6 : Modèle de la sécrétion de slime de l'A-motilité chez les Myxobactéries

Le slime, en jaune, est produit dans le compartiment cytoplasmique et synthétisé au sein d'un complexe putatif de la membrane interne, en rose. L'eau présente dans le milieu extérieur se combine avec le slime dans les nozzles, en bleu, et crée un hydrogel. L'expulsion de l'hydrogel donne une force de propulsion à la bactérie. (A) Image de microscopie électronique de *M. xanthus*. (B) Nozzle chez *Phormidium*. (c) anneau observé dans la membrane externe de *M. xanthus* (Mauriello *et al.*, 2010).

4.2.5 Modèle de point d'adhésion focal : Agl

L'autre modèle concerne le point d'adhésion focal (Figure 4.2-7). Il a commencé par la découverte d'AgIZ, une protéine essentielle dans la régulation spatiale du complexe Agl-Glt. Le moteur Agl, est un canal proton-conductant, homologue au moteur qui permet la rotation des flagelles chez les bactéries. Il est constitué de 3 protéines membranaires internes, AglR, Q et S (Nan *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2011). Le complexe Glt est constitué de 11 protéines (GltA-K), dont la localisation est répartie dans les différents compartiments de l'enveloppe, dont le cytoplasme, MI et ME ainsi que le périplasme (Nan *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2011). Ces protéines sont détaillées dans la section 4.1.11.

Le mécanisme de propulsion n'est que partiellement caractérisé. Ce complexe, en association avec d'autres protéines, est retrouvé sous forme de *cluster*. Ces *clusters* sont retrouvés de manière ordonnée et hélicoïdale tout le long de la bactérie. Lorsque la bactérie bouge vers l'avant, les *clusters* sont maintenus fixés au niveau du contact avec la surface solide. Plus exactement, les *clusters* tournent dans le sens inverse du mouvement effectué par la bactérie, ce qui donne l'impression qu'ils sont immobiles lorsque la bactérie est en mouvement (Figure 4.2-8). Le seul emplacement où les *clusters* sont encore capables de mouvement se trouve au niveau du front de migration, où les *clusters* sont assemblés. Une fois que les *clusters* arrivent à l'arrière de la cellule, ils se désassemblent pour permettre à la cellule de continuer le mouvement. Le point de contact avec la surface est aussi celui où les *clusters* sont en plus grande nombre, il est appelé le site d'adhésion focal (FA) (Faure *et al.*, 2016; Mignot *et al.*, 2007; Nan *et al.*, 2011). Une protéine additionnelle connue intervient dans le contrôle spatial au niveau des FAs : MglA.

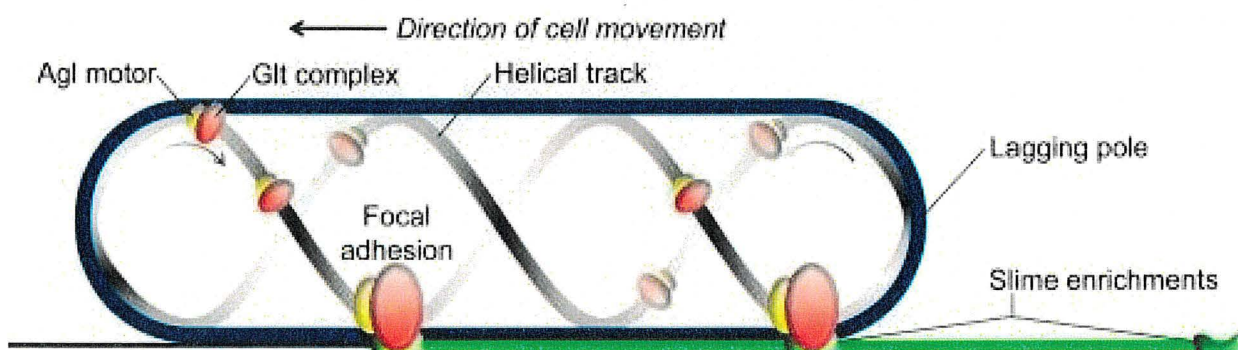


Figure 4.2-7 : modèle des points d'adhésion focaux

Le moteur Agl-Glt bouge le long de la bactérie suivant un chemin hélicoïdal lorsque la bactérie n'est pas mobile. Lorsque la bactérie se met en mouvement, les composants Glt sont retrouvés fixés au niveau du substrat, formant une adhésion focale (Islam & Mignot, 2015).

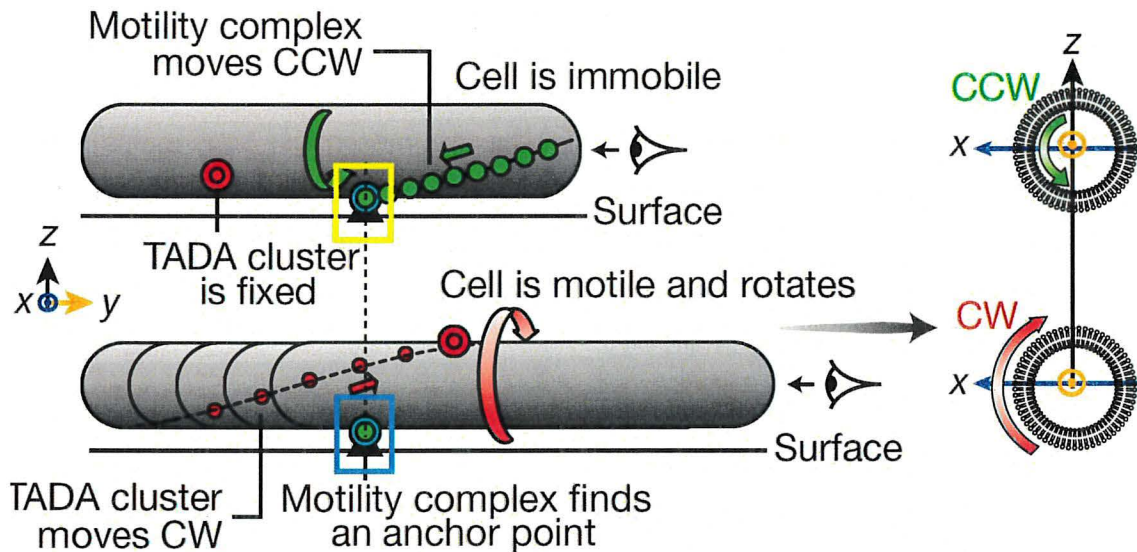


Figure 4.2-8 : prédiction du mouvement des moteurs durant le mouvement de *M. xanthus*

Le TADA cluster permet de traquer le mouvement de rotation de *M. xanthus*. En point vert, est représenté l'adhésion focale. Lorsque la cellule se met en mouvement, TADA tourne dans le sens horaire et donc est immobile sur la bactérie. Contrairement aux adhésions focales qui restent au point d'ancrage donc qui doivent tourner dans le sens horaire anti-horaire. (Faure *et al.*, 2016)

4.2.6 Modèle de point d'adhésion focal : MglA

MglA est une petite protéine G Ras-like, absolument nécessaire aux mécanismes de *gliding* (Hodgkin & Kaiser, 1979a). Comme la plupart des protéines de la superfamille Ras, MglA est active lorsqu'elle est dans l'état phosphorylée GTP et inactive dans l'état déphosphorylée GDP (Leonardy *et al.*, 2010). MglA-GTP s'accumule au niveau du *leading pole* alors que MglA-GDP est diffus dans tout le cytoplasme.

MglA a aussi été repérée au niveau des points d'adhésion focaux et son rôle est de réguler la direction du moteur Agl par son interaction avec AglZ (Nan *et al.*, 2015; Patryn *et al.*, 2010). Plus précisément, MglA fait partie intégrante de la machinerie Agl-Glt puisqu'elle stimule son assemblage. L'assemblage se fait au niveau du front de migration sur une structure homologue à l'actine, MreB (Hodgkin & Kaiser, 1979a; Treuner-Lange *et al.*, 2015). Le rôle de MreB n'est pas encore clair, mais il semblerait qu'elle fournisse un support pour les moteurs de *gliding* tandis que les machineries de *gliding* entraînent le mouvement des filaments de MreB (Fu *et al.*, 2018). A travers MreB, MglA-GTP-Agl-Glt peut arriver jusqu'à l'arrière de la cellule, où le complexe est désassemblé par MglB, une GTPase spécifique de MglA (Treuner-Lange *et al.*, 2015).

Pour finir, MglA, en interaction avec RomR et RomX, intervient aussi dans les mécanismes de réversion de la bactérie (Galiccia *et al.*, 2019; Szadkowski *et al.*, 2019). Cependant, le mouvement ne sera pas possible sans le complexe de *gliding* sous-adjacent, Glt.

4.2.7 Modèle de point d'adhésion focal : Glt

Les 12 protéines putatives qui constituent la machinerie de *gliding* (Agl-Glt) sont codées par 2 *clusters* appelés G1 et G2 (Luciano *et al.*, 2011). Ils sont rassemblés sous le nom Glt (*gliding* transducteur) pour éviter la confusion avec les autres protéines qui interviennent dans le système de *gliding*. La fonction de la plupart de ces gènes est aussi homologue aux gènes *nfs*, qui sont nécessaires pour la sporulation (Wartel *et al.*, 2013). La machinerie Glt est constituée depuis le compartiment cytoplasmique vers la ME de :

- GltI (cytoplasme) : interagit avec AglZ et semble avoir un rôle de support dans la mise en place de la plateforme MreB-AglZ
- GltG et GltJ (MI), interagit probablement directement avec GltI et affecte son assemblage
- GltC, GltD, GltE et GltF (périplasma) : GltD est une protéine essentielle pour l'assemblage de la machinerie du *gliding*. GltF est une protéine essentielle, mais son rôle ainsi que sa localisation restent très mystérieux. En effet, parfois il est retrouvé dans le périplasma, MI, ME ou encore à la surface des cellules
- GltA, GltB, GltH, GltK (ME) (Faure *et al.*, 2016; Islam & Mignot, 2015; Jakobczak *et al.*, 2015)

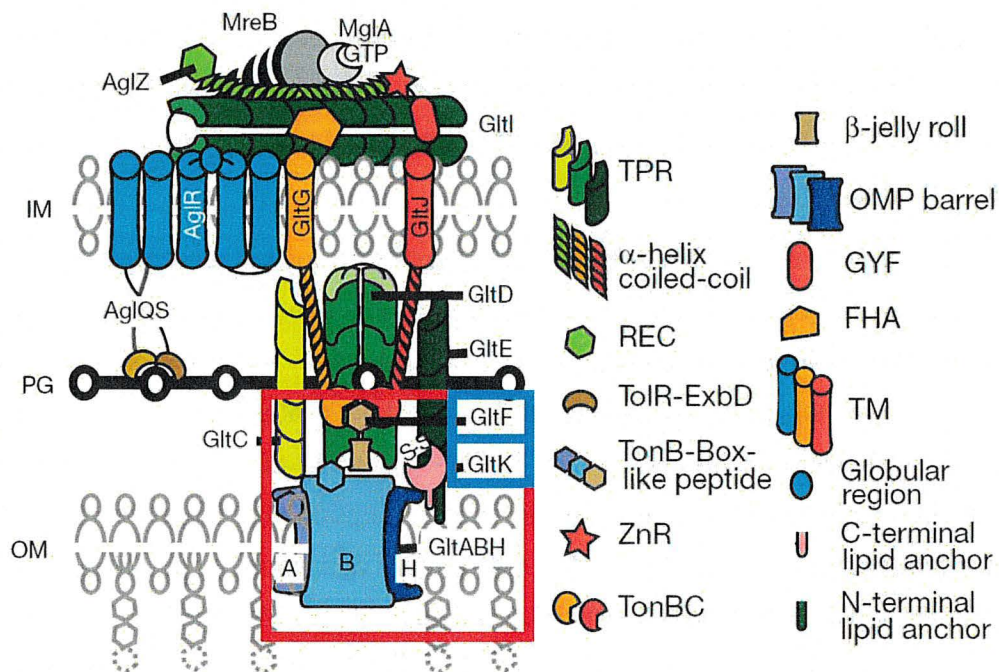


Figure 4.2-9 : Représentation en cartoon de la machinerie Agl-Glt

En encadré rouge représentée les structures GltA, GltB et GltH qui sont en interaction avec les substrats ou qui joue un rôle de régulation. Les protéines indiquées en bleu jouent un rôle de stabilisation sur GltA, GltB et GltH (Faure *et al.*, 2016)

Même si le rôle de chacune de ces protéines n'est pas encore très clair, la prédiction structurale de certaines protéines permet d'apprécier leur fonction. Par exemple, les protéines *gltA*, *GltB* et *GltH* ont été assignées comme des β -barrel de la ME. Plus précisément, ils s'apparentent à la classe des *OmpA* (Islam & Mignot, 2015). Chez les autres bactéries, *OmpA* joue plusieurs rôles, incluant notamment l'adhésion cellulaire (Smith *et al.*, 2007). Ces protéines sont donc potentiellement impliquées dans les mécanismes d'adhésion focaux. En effet, la localisation de *GltA* et *GltB* a été montrée au niveau des sites d'adhésion focaux. Cependant, si le recrutement sur les sites est inhibé, ces protéines ne sont pas retrouvées sous forme de points ponctuels, mais sous forme diffuse à travers toute la ME (Jakobczak *et al.*, 2015). Il a aussi été montré dans cette étude que *GltA* et *GltB* interagissaient directement avec *GltC* pour le stabiliser, mais se stabilisaient aussi mutuellement. *GltC* semble aussi être le candidat parfait pour faire le lien entre les structures périplasmiques-MI-cytoplasmiques avec ceux de la ME (Islam & Mignot, 2015; Jakobczak *et al.*, 2015).

L'assemblage de ces protéines de la ME est facilité par *GltK*, une lipoprotéine insérée dans la ME et orientée vers le périplasme, même si son rôle au sein du mécanisme entier reste encore peu clair (Jakobczak *et al.*, 2015). Récemment, l'équipe de recherche dirigée par Pr. ST. Islam (équipe INRS-IFSB) a découvert que la protéine *CglB* fonctionne comme l'adhésine qui ancre le complexe *Agl-Glt* à des sites d'adhésions focaux (Salim T. Islam, 2020).

4.2.8 Modèle de point d'adhésion focal : *CglB*

CglB est essentiel pour la motilité de *gliding* chez *M. xanthus* (Hodgkin & Kaiser, 1979a; Rodriguez & Spormann, 1999). Les récentes études du laboratoire de Pr. ST. Islam, ont aussi montré que l'absence de *CglB* n'avait pas d'incidence directe sur la formation de la machinerie *Agl-Glt* (Salim T. Islam, 2020). En effet, son absence ne gêne pas le suivi du moteur *AglZ* comme chez les souches mutantes *GltA*, *GltB*, et *GltH* (Faure *et al.*, 2016). Au contraire, le suivi d'*AglZ* montre que la machinerie se déplace comme s'il n'y avait pas d'adhésion. Le rôle de *CglB* intervient plutôt au niveau de l'ancrage de la cellule, au niveau des sites d'adhésion focaux et sa localisation a été montrée au niveau de la ME (Rodriguez & Spormann, 1999).

L'accès de *CglB* à la surface de la cellule dépend de l'état dans lequel se trouve la bactérie. Si elle est statique, *CglB* n'est pas exposé à la surface alors que lorsque la bactérie est en mouvement, elle s'engage avec le substrat aux sites d'adhésion focaux pour ancrer un complexe *Agl-Glt*. Sa translocation à la surface de *M. xanthus* est médiée par le complexe *GltA*, *GltB* et *GltH* et ce complexe régule sa sécrétion à travers la ME. *CglB* est aussi régulé par le protéine

GltK mais son rôle n'est pas encore clair. GltK pourrait avoir un rôle d'assistance dans le repliement de la protéine CglB et de régulation de son association avec la plateforme de la ME (Salim T. Islam, 2020).

Pour mieux comprendre comment ces mécanismes se déroulent au sein de la cellule, nous avons ici tenté d'obtenir les structures à l'échelle atomique de chacune des protéines qui interviennent dans la translocation de CglB, à savoir GltK, GltA, GltB, GltH et GltF et bien sûr CglB.

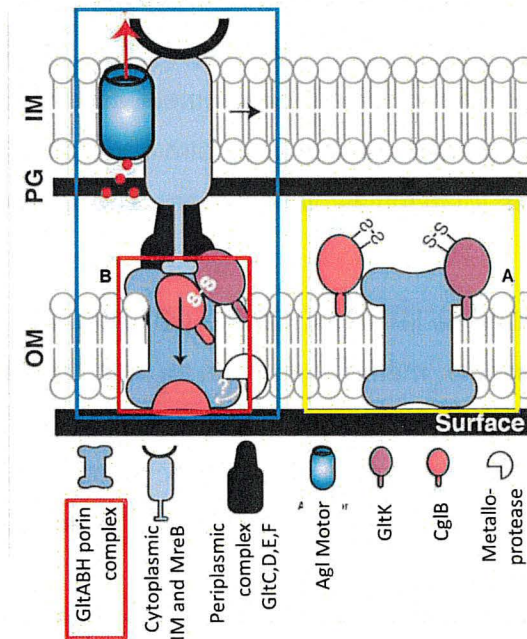


Figure 4.2-10 : représentation du mécanisme de translocation de CglB

Encadré bleu : complexe Agl-Glt en mouvement. Encadré rouge : Porine GltA, GltB et GltH complexe. Encadré jaune : bactérie non motile (Salim T. Islam, 2020).

4.3 Objectifs des travaux

L'objectif principal de ces deux projets est d'obtenir la structure cristallographique des différentes protéines qui interviennent dans les mécanismes de motilité. Une fois cet objectif atteint, les études de résolution des mécanismes d'interactions au niveau moléculaire entre les différents acteurs pourront être faites.

Concernant le projet sur les complexes Wza, nous essayons de comprendre comment les sucres sont transportés à travers les complexes et si les machineries sont similaires entre elles. Aussi, nous comparerons les structures obtenues avec celles qui sont présentes chez *E. coli* pour voir les différences entre elles.

Pour le projet sur le CglB, une fois que nous aurons obtenu les structures, nous confirmerons dans un premier temps les domaines d'interactions entre les protéines présentes dans la plateforme de la ME (GltA, GltB et GltH) pour ainsi confirmer que CglB est capable d'être transloquée à travers cette plateforme. Dans un second temps, les protéines régulatrices seront étudiées avec cette plateforme.

Les résultats qui sont présentés ici sont les protéines dont les travaux ont eu de grandes avancées dans les processus de purification et cristallisation.

4.4 Matériels et méthodes

4.4.1 Amorces et Clonage PCR

Les différentes amorces qui ont été synthétisées pour cette étude sont présentées dans le tableau 4.5-1. Le clonage est effectué grâce à la méthode de *restriction-free cloning* (RF cloning)(Van Den Ent & Löwe, 2006). Les amorces ont été commandées chez MilliporeSigma® et les plasmides qui ont été utilisés sont pET-15MHL et pET-20b. Ici, la PCR 1 permet de générer des méga-amorces (gène + régions flanquantes). La PCR 2 permet d'intégrer le gène dans le plasmide, grâce à l'hybridation des régions flanquantes.

Après la deuxième PCR, les produits sont incubés à température ambiante pendant 4 h ou toute la nuit avec l'enzyme Dpn1. Ces produits sont ensuite introduits dans une souche bactérienne de conservation *E. coli* MM294 par transformation (choc thermique).

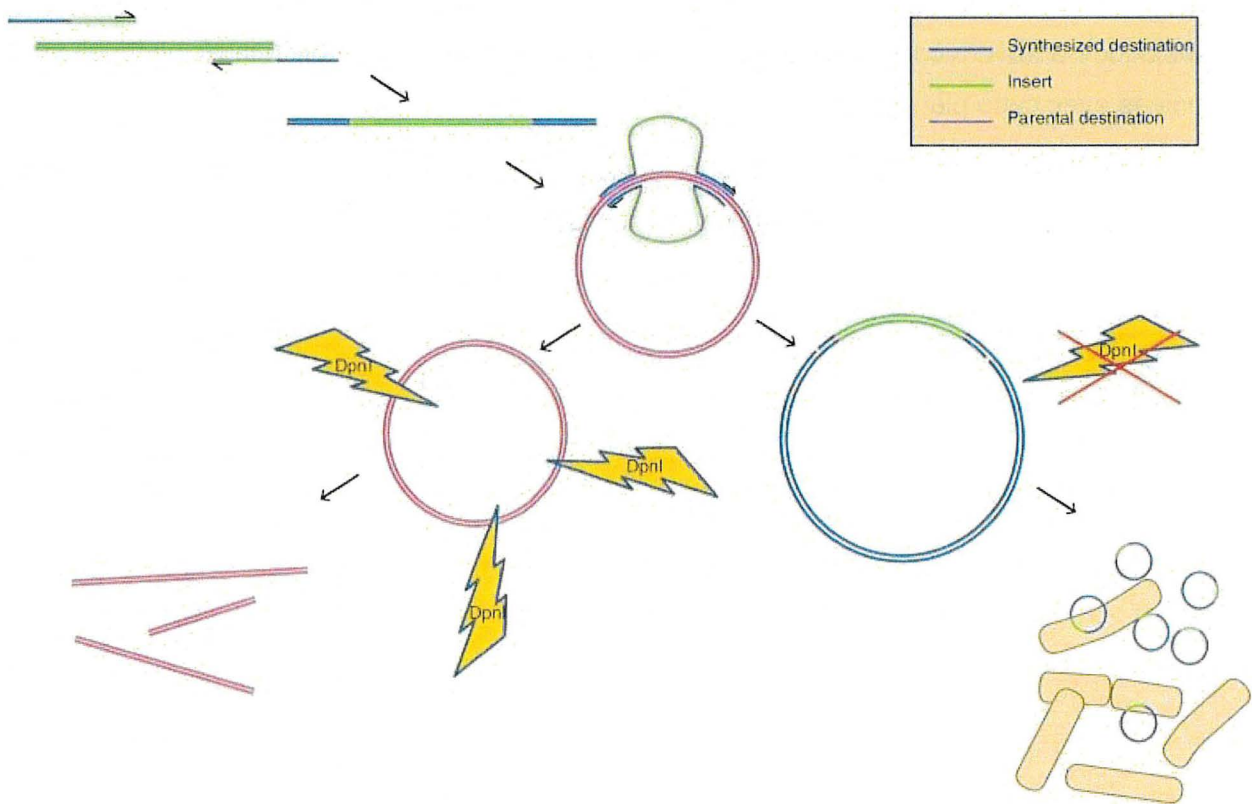


Figure 4.4-1 : Représentation schématique d'un protocole classique de RF-cloning

Les amorces hybrides sont conçues en étant complémentaires à l'insert désiré (vert) et au plasmide destinataire (bleu). Dans un premier temps, la première PCR permet l'obtention de méga-amorces (insert flanqué par les séquences complémentaires du plasmide destinataire). Ensuite, la méga-amorce initie la réplication du plasmide destinataire. Une fois que la réplication du plasmide destinataire est terminée, les méga-amorces n'étant pas capable de reconnaître les produits de réplication car ils ne présentent pas de 3' terminal libre pour la polymérase, les produits de réplication restent linéaires. Le plasmide destinataire est ensuite éliminé par la Dpn1 qui laisse les produits non méthylés de réplication intact. Ces produits peuvent ensuite être utilisés pour la transformation dans les bactéries compétentes (<https://www.rf-cloning.org/QandA.php>).

Pcr 1 composants			Thermal Cycler Conditions			
5 X	Tampon PCR	10 µL	Denaturation	98 °C	30 s	1X
10 mM	dNTP mix	1 µL	Denaturation	98 °C	8 s	35X
10 µM	Amorce Sens	2,5 µL	Hybridation	X	20 s	
10 µM	Amorce Anti-Sens	2,5 µL	Extension	72 °C	15-30 s/kb	
<1 µg	ADN Matrice	1 µL	Extension Finale	72 °C	5 min	1X
2 U/µl	Q5 Polymérase	0,5 µL				
	H ₂ O	33,5 µl				

Tableau 4.4-1 : Paramètres utilisés pour les cycles de PCR.

La première PCR est réalisée dans 50 µL de réaction et la deuxième dans 25 µL. Les températures d'hybridation dépendent des amorces conceptualisées pour la PCR1. La PCR2 est réalisée avec les conditions avec une température de 67 °C.

4.4.2 Cartes des plasmides

Les deux plasmides utilisés dans cette étude sont cartographiés ci-contre (Figure 4.4-1). Le plasmide pET-20b+ a été utilisé pour l'expression des protéines d'intérêts périplasmiques ou de la ME. Le plasmide pET-15MHL a été utilisé pour la production de protéines dans le cytoplasme. La différence majeure entre ces deux plasmides est la présence de la séquence codant pour PelB sur le plasmide pET-20b+. Cette séquence est un signal d'adressage des protéines au niveau du périplasme. Trois autres sites sont aussi à noter : l'étiquette hexahistidine, la séquence codant pour la protéase TEV et le gène de résistance (AmpR). L'étiquette hexahistidine présente une affinité particulière pour le nickel et la séquence TEV est une site de restriction pour la protéase TEV. AmpR permet une sélection des bactéries clonées.

4.4.1 Souches bactériennes et conditions de culture

Pour les études menées ici, trois souches bactériennes ont été utilisées. La première : MM294 est une souche de conservation, qui permet d'obtenir une bonne concentration de plasmide lors de l'extraction. Le deuxième : BL21(DE3), provenant de chez SigmaAldrich®, est utilisée pour la production de protéine au niveau du cytoplasme et pour l'expression de tout plasmide contenant comme promoteur T7. Le troisième : C41(DE3) OverExpress™, est optimisé pour l'expression de protéine toxique et membranaire.

Ces trois souches sont cultivées à 37 °C dans du milieu liquide ou solide LB classique. Le milieu est supplémenté avec 0.1 mg/mL ampicilline (Amp) si un plasmide est inséré. Ces souches sont conservées à 80 °C avec 15 % v/v de glycérol.

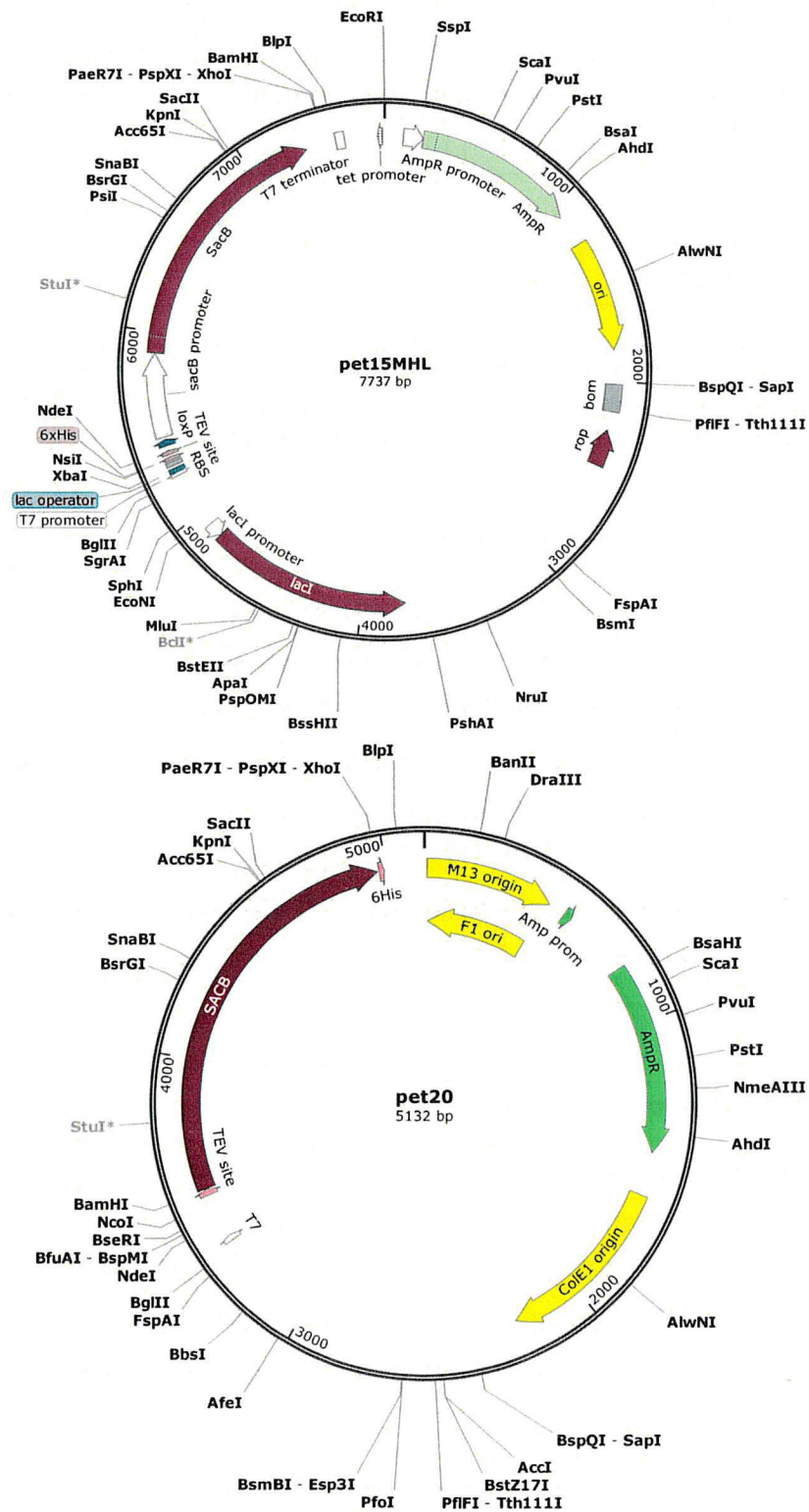


Figure 4.4-2 : cartes des plasmides utilisées pour la production des protéines

Les gènes de résistances sont représentés en vert, les gènes d'intérêt en bordeaux, les origines en jaune et les étiquettes hexahistidines en rose.

4.4.2 Préparation de souche compétente et Transformation

Préparation de 5 mL de préculture à 4 °C O/N. Prélèvement d'1 mL de la préculture et réensemencement dans 10 mL de LB liquide. Après une DO_{600} de 0.6-0.8, récupération du culot avec une centrifugation à 2 000 g pendant 10 min. Lavage du culot avec PBS et resuspension dans du $CaCl_2$. L'induction de la compétence des bactéries est faite grâce à 50 mM $CaCl_2$. La conservation se fait dans 50 mM de $CaCl_2$ et 15% de glycérol.

Pour la transformation, 100 μ L de bactéries compétentes sont incubées pendant 30 min avec 100 ng de plasmide à 4 °C. Un choc thermique à 42 °C puis 2 min dans la glace sont nécessaires pour la pénétration des plasmides dans les bactéries. Les bactéries sont ensuite cultivées pendant 1 h sous agitation. Enfin, les bactéries transformées sont sélectionnées sur boîtes de Pétri contenant de l'ampicilline.

4.4.3 Condition d'induction et de production

Pour la production des protéines, une préculture de 50 mL est effectuée la veille. Cette préculture est répartie équitablement dans 4 L de LB supplémentée en antibiotique. Après atteinte d'une DO_{600} de 0.6 à 0.8, les cultures sont refroidies à 4 °C puis 200 μ M d'IPTG est ajouté dans le milieu pour l'induction. Les températures et le temps d'inductions varient selon la protéine. Pour les protéines solubles, l'expression est effectuée à 16 °C O/N, et pour les protéines membranaires, 21 °C O/N. Les milieux de culture, ou de préculture, sont supplémentés avec 0.1 mg/mL d'Amp.

4.4.4 Migrations SDS-PAGE et agarose

La migration sur SDS-PAGE commence par la préparation des échantillons. 12 μ L de protéines ont été mélangées avec 4 μ L de 4X Laemmli Sample Buffer de chez Biorad®. Les mélanges sont chauffés à 95 °C pour les protéines cytoplasmiques et 60 °C pour les protéines membranaires. 10 μ L d'échantillon sont déposés sur le gel acrylamide 12 % ou 20 % puis migrés à 180 V pendant 1 heure. Une fois la migration finie, les gels sont colorés avec du bleu de coomassie puis décolorés avec 30 % v/v de méthanol et 10 % v/v d'acide acétique glaciale. Les images sont capturées par l'imageur ImageQuant LAS 500 de chez GEHealthcare®.

Pour la migration sur gel agarose, 0,5 g d'agarose est dissout dans 50 mL de TAE. 1 μ L de gel-stain free de chez Biorad® est ajouté pour la révélation. 5 μ L de produits de PCR sont mélangés avec 1 μ L de tampon de migration 6X. Ce mélange est déposé sur le gel et migré à 100 V pendant 90 min. Le gel est ensuite révélé avec l'imageur Geldoc de chez Biorad®.

4.4.5 Extraction et purification plasmidique

L'extraction et la purification des plasmides ont été effectuées avec le kit EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep Kit (BioBasic©) ou QIAprep Spin Miniprep Kit de chez Qiagen©. L'extraction des plasmides à partir de gel agarose est effectuée grâce au QIAquick Gel Extraction Kit de chez QiaGen© et la purification des produits de PCR est effectuée grâce à EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit de chez Biobasic©. Les protocoles sont faits selon les recommandations des vendeurs.

4.4.6 Extraction et purification des protéines solubles

4.4.6.1 Extraction des protéines par sonication et lysozyme (à froid)

L'expression de la protéine d'intérêt a été induite avec l'IPTG à 16 °C. La culture est sédimentée pendant 30 min à 2 350 g à 4 °C. Le culot est resuspendu dans le tampon A composé de HEPES 20 mM, de 200 mM ou 500 mM de chlorure de sodium (NaCl) à pH 8, 1 mg/mL de lysozyme (Euromedex©), 200 µM de MgCl₂ et 10 µg/mL de Dnases. Les paramètres utilisés pour la sonication, sont les suivants : sonication pendant 3 min avec une force 9 et une amplitude de 50 %. La sonication est fait pendant 5 cycles et à 4 °C. Les débris sont éliminés par sédimentation à 17 000 g à 4 °C pendant 1 h et le surnageant est filtré avec un filtre de 0.22 µm.

4.4.6.2 Purification par chromatographie d'affinité et d'exclusion stérique

La purification des protéines solubles par chromatographie d'affinité est effectuée soit par gravité soit avec le système ÄKTA™ pure (GE Healthcare©). Les colonnes utilisées sont les colonnes d'affinité (Histrap™ 1 mL de GE Healthcare©), IMAC Nickel Resin for Affinity Capture (Biorad©) et les colonnes d'exclusion stérique (Superdex™ 200 et 75 de GE Healthcare©).

Pour la purification sur Histrap, le système, la colonne ainsi que toute les pompes sont nettoyées avec de l'eau ultrapure (eau milliQ). Les pompes A1, S1 ainsi que la colonne Histrap sont équilibrées avec le tampon A1 (HEPES 20 mM, NaCl 200 mM ou 500 mM, pH 8). Le pompe B1 est équilibrée avec le tampon B1 (HEPES 20 mM, NaCl 200 mM ou 500 mM, pH 8 et 1 M d'imidazole). Le surnageant issu de l'étape d'extraction protéique est injecté dans la colonne grâce à la pompe d'échantillon S1. Les composants non retenus par la résine de nickel sont éliminés par lavage avec 50 mL du tampon A1. Les fractions sont ensuite éluées avec une concentration croissante d'imidazole. Plus précisément, 40 mM, 100 mM, 250 mM, 500 mM et 1

M. Chaque fraction ainsi que celle du lavage sont collectées pour les études de vérification ultérieures.

Pour la purification par gravité sur résine d'affinité, le surnageant issu de la sonication est filtré et incubé avec la résine de nickel à 4 °C pendant 1 heure. Puis la résine et le surnageant sont versés dans la colonne. Après sédimentation, la résine est lavée avec 50 mL tampon A, puis les fractions sont éluées avec une concentration croissante d'imidazole (40 mM, 100 mM, 250 mM, 500 mM et 1 M).

Pour la purification sur Superdex, les fractions contenant théoriquement la protéine d'intérêt sont regroupées et concentrées dans un volume de 1 mL grâce à un filtre à centrifugation (Amicon Ultra-15 de Merckmillipore©). La colonne est équilibrée avec 30 mL d'eau puis 30 mL de tampon A. 1 mL d'échantillon est injecté dans une boucle de 2 mL. Les échantillons sont élués avec 30 mL de tampon A.

4.4.7 Extraction et purification des protéines membranaires

4.4.7.1 Extraction avec un détergeant

L'induction des protéines est faite à 21 °C O/N. Les cultures sont sédimentées pendant 30 min à 2 350 g avec le rotor JA 9.1. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 350 mL de tampon A1 dans lequel est ajouté du 2.5% v/v d'Elugent 50%. 1 mg/mL de lysozyme (Euromedex©), 200 µM de MgCl₂ et 10 µg/mL de Dnases y est aussi ajouté. Cette mixture est agitée pendant toute la nuit à 4 °C. Le lendemain, la résine de nickel est ajoutée et incubée pendant 1 h avant de procéder à la purification.

4.4.7.2 Extraction des membranes externes uniquement

Après collecte de la centrifugation, le culot est resuspendu dans 75 mL de tampon A supplémenté en 1 mg/mL de lysozyme (Euromedex©), 200 µM de MgCl₂ et 10 µg/mL de Dnases. Cette préparation est lysée par sonication avec les mêmes paramètres que l'extraction des protéines solubles. Le lysat est ensuite sédimenté avec le JA 20 à 9 500 g, 15 min à 4 °C. Le culot de centrifugation est jeté et le surnageant est ultracentrifugé à 100 000 g, 1 h à 4 °C. Le surnageant est jeté et le culot est resuspendu à l'aide d'un glass Teflon Potter dans 50 mL de tampon A supplémenté avec 2 % v/v de LauroylSarcosine (solubilise les membranes internes). La mixture est incubée sous agitation toute la nuit à 4 °C. Le mélange est à nouveau ultracentrifugé à 100 000 g, 1 h, à 4 °C. Puis le surnageant est jeté et le culot est resuspendu et homogénéiser

avec le glass Teflon Potter dans 40 mL de tampon, dans lequel est ajouté le détergeant d'intérêt (1% v/v Elugent 50%). Le mélange est agité à 4 °C O/N. Le lendemain, le mélange est filtré avec un filtre 0.22 µm et incubé avec la résine de nickel pour l'étape de purification.

4.4.7.3 Purification des protéines membranaires à la chromatographie d'affinité.

Le protocole de purification des protéines membranaires est sensiblement la même que celui des protéines soluble. A la différence de que du détergeant est ajouté dans les tampons. La concentration finale des détergents est à 1 % v/v.

4.4.8 Western-Blot

Les protéines sont séparées sur SDS-PAGE à 180 V pendant 1 h. Les protéines sont ensuite transférées sur des membranes de polyvinylidène fluoride (ThermoFisher™) soit par la méthode semi-liquide pendant 20 min à 15 V par électro-transfert (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell de Biorad®), soit par la méthode complètement liquide pendant 1 h à 100 V. Les membranes sont ensuite saturées dans la solution de blocage (5% v/v de lait + PBS + 0,1% v/v de Tween®) et incubées pendant 1 h avec l'antisérum spécifique (1/1000), dirigé contre l'étiquette hexahistidine, dilué dans l'albumine de sérum bovin (5% v/v). Les membranes sont incubées pendant 1 h avec les anticorps secondaires (1/5000), dirigé contre l'anticorps spécifique, couplés au peroxydase de raifort dans la solution de blocage. L'activité de la peroxydase est détectée par l'augmentation de la chemiluminescence (Pierce™ ECL Plus ; ThermoFisher™) et enregistrée par un imageur Chemidoc (Biorad®).

4.4.9 Dichroïsme circulaire

Pour les études de dichroïsme circulaire, le tampon HEPES interfère avec le détecteur et nécessite donc son changement par du Tris. Le changement est effectué grâce à Zeba™ Spin Desalting Column de chez ThermoFisher®. Différentes concentrations de protéines sont testées. 160 µL sont mises dans les cuves d'analyses, qui sont préalablement lavées avec de l'eau et du tampon dans lequel se trouve la protéine. Un blanc est fait sur la machine *Circular Dichroism Spectropolarimeter (Jasco J-715)*. Les longueurs d'ondes utilisées sont situées entre 200 et 250 nm. L'accumulation est réglée sur 4. Pour les paramètres de dénaturations, les températures sont situées entre 25 °C et 95 °C.

Composants	Volume	Volume pour 96 puits
Tampon : Protein Thermal Shift	5,0 µL	480 µL
Tampon Testé	10 µL	
<i>Protein Thermal Shift</i> colorant fraîchement dilué (8X)	2,5 µL	240 µL
Protéine (1 - 2 µg)	2,5 µL	240 µL
Volume Finale pour chaque puit	20 µL	

Tableau 4.4-2 : mélange par puits pour la *protein thermal shift*

4.4.10 *Protein Thermal Shift*

27 conditions sont testées en triplicata. La mixture de réaction est indiquée dans le tableau 4.4-2.

Une fois cette mixture préparée, ils sont répartis dans une plaque MicroAmp Optical Reaction Plate puis la plaque est scellée avec MicroAmp Optical Adhesive Film. La plaque est sédimentée pour enlever les bulles puis mise dans la machine à RT-PCR. Choisir le mode : melt curve. Les températures de dénaturation sont réglées de 25 °C à 95 °C.

4.4.11 MALDI-TOF, SEC-MALS et RMN 1D

Les expériences de *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight* (MALDI-TOF), Size exclusion chromatography Multiangle light scattering (SEC-MALS) et de résonance magnétique nucléaire à une dimension (RMN1D) sont confiés à des organismes tiers.

4.4.12 SAXS

Les expériences de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS de l'anglais : *Small Angle X-rays Scattering*) sont aussi faites par un organisme tiers. Les analyses sont effectués avec les logiciels RAW, ATSAS (Franke *et al.*, 2017) et DENSS. Les protocoles d'analyses sont présents à l'adresse suivant : <https://bioxtas-raw.readthedocs.io/en/latest/tutorial.html>.

4.4.13 Cristallogenèse

Les essais de cristallogenèses sont réalisés dans des plaques 96 puits en gouttes assises (Figure 4.4-3) en utilisant 768 conditions de précipitations. Ici, nous avons utilisé la technique de diffusion de la vapeur. Ainsi, le réservoir est rempli avec du précipitant et la goutte est constituée avec un volume équivalent de solution précipitant et de protéine purifiée. La chambre est fermée hermétiquement pour ne pas sécher les gouttes et permettre les échanges gazeux entre le réservoir et la goutte. Les dépôts dans le réservoir sont effectués par le robot de criblage GRYPHON et les gouttes sont soit faites avec le robot de stœchiométrie (0.5 : 0.5 μ L) ou à la main (1 : 1 μ L).

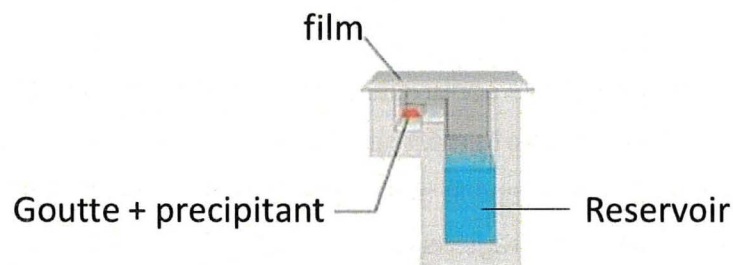


Figure 4.4-3 : schéma un puit de cristallogenèse en goutte assise

Image modifiée et tirée de www.gbo.com/bioscience

4.5 Résultats

Les travaux de ce mémoire de maîtrise portent essentiellement sur les protéines, qui ont pu être produites en grandes quantités, à savoir les complexes Wza des systèmes d'EPS, BPS, et MASC. Les autres protéines ont été clonées et leurs insertions dans les plasmides ont été confirmées par séquençage Sanger, mais elles n'ont pas encore été testées. Ce mémoire est le fruit de 6 mois de travail et, par conséquent, est moins développé qu'un mémoire classique (maîtrise canadienne : deux ans plein temps en laboratoire).

4.5.1 Homologie des protéines à cloner

Avant de procéder au clonage des protéines d'intérêt et à la surproduction de celles-ci, il est important de vérifier si les structures cristallographiques ou si des structures homologues existent déjà. Pour cela, le serveur XtalPred a été utilisé (Slabinski *et al.*, 2007). Ici, la majorité des protéines n'ont aucun homologue et ceux qui en possèdent, ne présentent que 20 % d'identité. C'est, notamment, le cas des protéines intervenant dans le complexe Wza. Pour faciliter la compréhension de ce mémoire, les différentes parties du complexe Wza seront nommées en fonction de leur nom de gène si la dénomination n'est pas encore définie.

4.5.2 Conception des amorces et clonage

Cette étude est un nouveau projet de cristallographie aux rayons X qui nécessite la mise en place des gènes qui seront utilisés. La sélection des gènes d'intérêt est issue des études du laboratoire de Pr. ST. Islam (Islam *et al.*, 2020). Ces gènes sont clonés dans un organisme qui permet la surproduction des protéines, *E. coli*. Plus exactement des souches de BL21(DE3). Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser la méthode de *Restriction-Free Cloning* (Van Den Ent & Löwe, 2006) pour cloner nos gènes d'intérêts. Chacune des amorces est unique et personnalisée pour le gène d'intérêt. Il est donc nécessaire de faire du design d'amorce. La conception de ces amorces a été soumise à plusieurs logiciels de bio-informatique pour la prédiction de signal peptide (SignalP) ou de structure (XtalPred, Boctopus). Ces informations permettent d'éliminer tous les domaines qui ne sont pas utiles à la cristallographie aux rayons X et de produire la protéine dans le bon compartiment (périplasmique ou cytoplasmique). De plus, pour construire ces amorces, plusieurs autres facteurs sont à prendre en compte. Par exemple, la température d'hybridation sur le gène, le chevauchement de nucléotides entre l'amorce-gène et l'amorce-plasmide, la spécificité des amorces, etc. La construction doit aussi tenir compte du compartiment de production de la protéine.

Si la protéine est soluble et ne possède pas de pont disulfure, l'expression cytoplasmique est favorisée pour avoir une production protéique plus élevée. Pour les protéines membranaires ou périplasmiques avec des ponts disulfures, elles sont envoyées dans l'espace périplasmique avec une séquence signal, appelé PelB. De ce fait, il est nécessaire de savoir où produire la protéine pour ne pas les retrouver dans les corps d'inclusion. Toutes les informations, sur les amorces et sur les gènes, sont regroupées dans le tableau 4.5-1.

L'ADN génomique de la souche sauvage de *M. xanthus* a été utilisé comme matrice pour cloner les méga-amorces. Cette étape de la PCR a été réalisée avec, au début, les températures optimales théoriques. Mais en raison de difficulté à cloner certains gènes, plusieurs autres températures ont été utilisées. Lorsqu'il n'y avait pas de produit de PCR, la température d'hybridation est baissée pour que l'hybridation des amorces soit moins spécifique et pour que la probabilité d'hybridation soit plus élevée. Dans le cas contraire, lorsqu'il y avait beaucoup de bandes non-spécifiques, du DMSO y était ajouté. Une fois que ces méga-amorces sont clonées, une deuxième étape de PCR, réalisée à 67 °C et sans DMSO, est effectuée pour insérer le gène dans le plasmide d'intérêt à la place du gène *SacB*.

Les plasmides matrices sont éliminés par l'action de la DpnI. Ces plasmides présentent des sites de méthylation puisqu'ils ont été extraits à partir de bactéries. Or la DpnI clive le plasmide lorsqu'un site de méthylation est reconnu. Dans les étapes de PCR, il n'y a pas de méthylation sur le plasmide donc les plasmides nouvellement synthétisés ne présentent pas de sites de méthylation.

Les plasmides sont ensuite clonés dans les souches MM294. Les bactéries qui n'ont pas intégré le plasmide sont sélectionnées par l'action de l'ampicilline présente dans la boîte de Pétri car elles ne présentent pas de gène de résistance. De même, les bactéries qui ont intégré un plasmide vide (dont il y a encore le gène *SacB*) sont sélectionnées par l'action du sucrose. En effet, l'activation du gène *SacB* produit une protéine toxique pour la bactérie. Son activation n'est possible qu'en présence de sucrose dans l'environnement (site de clonage dans le gène suicide *SacB*).

Amorce	Nom-gène	Cloné
cagcggcaga gaaaactgtatttccagggc <u>CGGGGCCTGGGCAAGTAC</u>	MXAN_7417 (WzaX-EPS)	Correct
gcagcggcaga gaaaactgtatttccagggc <u>GCGCGCGTCGACTCGC</u>	MXAN_7418	Attente
caccatcaccat gaaaactgtatttccagggc <u>GCGCGCGTCGACTCGC</u>	MXAN_7418	Correct
gcggcagaga gaaaactgtatttccagggc <u>GCGCACCAGTCGCAGGTGAA</u>	MXAN_3225 (WzaS-MASC)	Correct
gcggcagaga gaaaactgtatttccagggc <u>GCGACGATATGGGAACCCCG</u>	MXAN_3226	Attente
caccatcaccat gaaaactgtatttccagggc <u>GCGACGATATGGGAACCC</u>	MXAN_3226	Attente
cagcggcaga gaaaactgtatttccagggc <u>TTCGGCACGTTCGACGCGC</u>	MXAN_1915 (WzaB-BPS)	Correct
gcggcagaga gaaaactgtatttccagggc <u>CAGGGCATCGCGACGCCTC</u>	MXAN_1916	Attente
caccatcaccat gaaaactgtatttccagggc <u>CAGGGCATCGCGACGCCT</u>	MXAN_1916	Attente
gcggcagaga gaaaactgtatttccagggc <u>GAGGTGGCCAGCGAGATTGG</u>	MXAN_2538 (GltK)	Correct
caccatcaccat gaaaactgtatttccagggc <u>CAGAGCCAGGAAGGCATG</u>	MXAN_2539 (GltB)	Correct
caccatcaccat gaaaactgtatttccagggc <u>CAGACCACCGAAGAGGCG</u>	MXAN_2540 (GltA)	Correct
caccatcaccat gaaaactgtatttccagggc <u>CAGCCCACCACTGCCAG</u>	MXAN_4866 (GltH)	Correct
gcggcagaga gaaaactgtatttccagggc <u>CAGACGTACGACTTCGAGCC</u>	MXAN_3060 (CglB)	Correct
gcggcagaga gaaaactgtatttccagggc <u>CAGGACGAGGGCTCGAACCC</u>	MXAN_4868 (GltF)	Correct

Tableau 4.5-1 : Conception des amorces utilisés pour le clonage RF

La partie bleue du tableau regroupe les gènes des différents complexes Wza et en blanc les gènes du *gliding motility*. Les séquences nucléotidiques représentées en bleu sont les sites de restrictions pour la protéase TEV. En majuscule et soulignée, ce sont les séquences qui se lient sur le gène. Les noms des gènes en rouge sont les protéines qui seront exprimées dans le périplasma (pET-20b+) et en noir, ceux exprimées dans le cytoplasme (pET-15MHL)

La vérification de l'insertion dans la souche, et du bon gène inséré dans le plasmide, est confirmée par plusieurs méthodes :

- D'une part, l'insertion de gène est confirmée par leurs tailles, grâce à une PCR colonie ou une extraction de plasmide suivi d'une PCR, sur un gel d'agarose 1% v/v
- D'autre part, les plasmides sont envoyés au séquençage Sanger pour vérifier qu'il n'y ait pas de mutation ponctuelle dans la séquence clonée (clonage réussi Tableau 4.5-1)

4.5.3 Test d'expression des protéines

Après que les plasmides aient été vérifiés, ils sont à nouveau transformés dans des bactéries d'expression BL21(DE3) ou C41(DE3), respectivement pour l'expression de protéines dans les compartiments cytoplasmique et périplasmique. Ces bactéries sont dans un premier temps utilisées pour des tests d'expression protéique. Pour cela, le kit BugBuster a été utilisé pour l'extraction des protéines à partir de bactéries, dont l'expression des plasmides a été induite avec de l'IPTG pendant tout la nuit à 16 °C. Le surnageant et le culot sont tous les deux déposés et migrés sur un gel polyacrylamide 12 ou 20 % v/v. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane pour les essais de WB. La révélation de la membrane du WB grâce aux anticorps primaires et secondaires montre plusieurs signaux (Figure 4.5-1). Ici, la présence de bandes dans

les surnageants de WzaX (MXAN_7417) et WzaB (MXAN_1915) laissent supposer que les protéines exprimées sont solubles dans la solution de lyse du BugBuster. D'un autre côté, la présence de signal des protéines MXAN_7418, GltK (MXAN_2538) et GltB (MXAN_2539) dans le culot laisse supposer que les protéines sont dans la membrane interne ou dans les corps d'inclusion. Ces protéines sont prédites comme étant des protéines membranaires (Islam & Mignot, 2015), ce qui n'est pas étonnant de les retrouver dans les fractions insolubles.

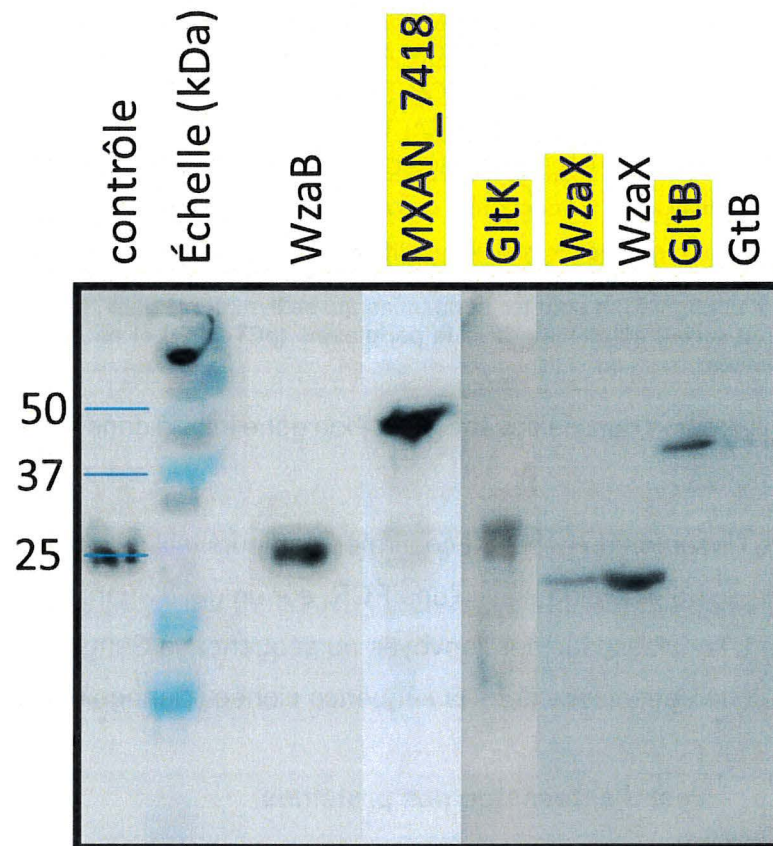


Figure 4.5-1 : Western-Blot des tests d'expression des gènes séquencés

La production des protéines est induite avec 500 μ M d'IPTG puis lysées avec le kit BugBuster®. Les culots et les surnageants sont déposés séparément sur gel et transférés sur membrane. L'anticorps primaire utilisé est dirigé contre l'étiquette hexahistidine. Seules les souches pour lesquelles un signal a été observé sont représentés ici. Les protéines retrouvées dans le culot sont ici représentées en jaune surligné et les protéines dans le surnageant en noir.

4.5.4 WzaX : partie soluble du translocon Wza intervenant dans la sécrétion de l'EPS

4.5.4.1 Purification de la protéine

Les premiers tests d'expression à grande échelle ont été faits sur la partie soluble du complexe WzaX qui est exprimé d'après les tests d'expression. Cependant, les études de cristallographie aux rayons X nécessitent une grande quantité de protéines, de l'ordre du milligramme. Ainsi, une bonne expression de la protéine est nécessaire dès le début. Par la suite, une augmentation de la quantité de bactéries cultivées (plusieurs litres) permet d'atteindre cette quantité. Pour cela, les bactéries sont cultivées dans du LB, l'expression est induite avec de l'IPTG et enfin les cellules sont lysées par sonication. A chaque étape de purification, un échantillon est prélevé pour être analysé sur SDS-PAGE et quantifié au nanodrop (Figure 4.5-2 A). Deux bandes sont particulièrement intéressantes ici, celles des fractions à 250 mM et 500 mM d'imidazole. Ces bandes sont comprises entre 20 kDa et 25 kDa. Sachant que le PM de notre protéine est d'environ 20 kDa, auquel s'ajoute les séquences de l'étiquette hexahistidine et de la protéase TEV, il semble que cette bande corresponde à notre protéine d'intérêt. L'épaisseur de la bande indique aussi que la protéine est produite en grande quantité. Enfin, ces fractions semblent très pures puisqu'elles ne présentent qu'une bande unique. Ces résultats sont encourageants pour commencer les essais de cristallogénèses.

Cependant, pour maximiser les chances de générer des cristaux, un niveau supérieur de pureté est requis. En effet, que ce soit en cristallogénèse ou en cristallographie aux rayons X, les domaines flexibles défavorisent la génération de cristaux et peuvent interférer avec la diffraction de celui-ci. Dans la construction de notre protéine, un domaine est notamment non essentiel pour la suite des expérimentations et concerne l'étiquette hexahistidine. Par conséquent, l'étiquette hexahistidine est clivée par la protéase TEV et le clivage de l'ensemble des protéines est confirmé par SDS-PAGE (Figure 4.5-2 B). L'écart de PM entre les protéines coupées ou non est généralement significatif et visible à l'œil nu. Ici, le décalage confirme le clivage de l'étiquette hexahistidine.

Pour éliminer les protéases TEV, les étiquettes hexahistidines coupées et les protéines qui ne sont pas d'intérêt, une sédimentation suivie d'une purification à la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) sont effectuées. Le volume d'injection étant limité dans la SEC, il est nécessaire de concentrer au préalable la protéine. Une fois concentrée, la protéine est séparée des contaminants et de la protéase TEV grâce à une colonne de Superdex 75 (SEC 75). La présence d'un unique pic sur le chromatogramme confirme la pureté de la protéine produite (Figure 4.5-3

C). Ce résultat montre aussi que la protéine ne se présente que sous une seule forme multimérique et qu'elle est assez stable. Une quantification de la WzaX pure donne environ 60 mg au total, soit 12,5 mg de protéine produite par litre de culture.

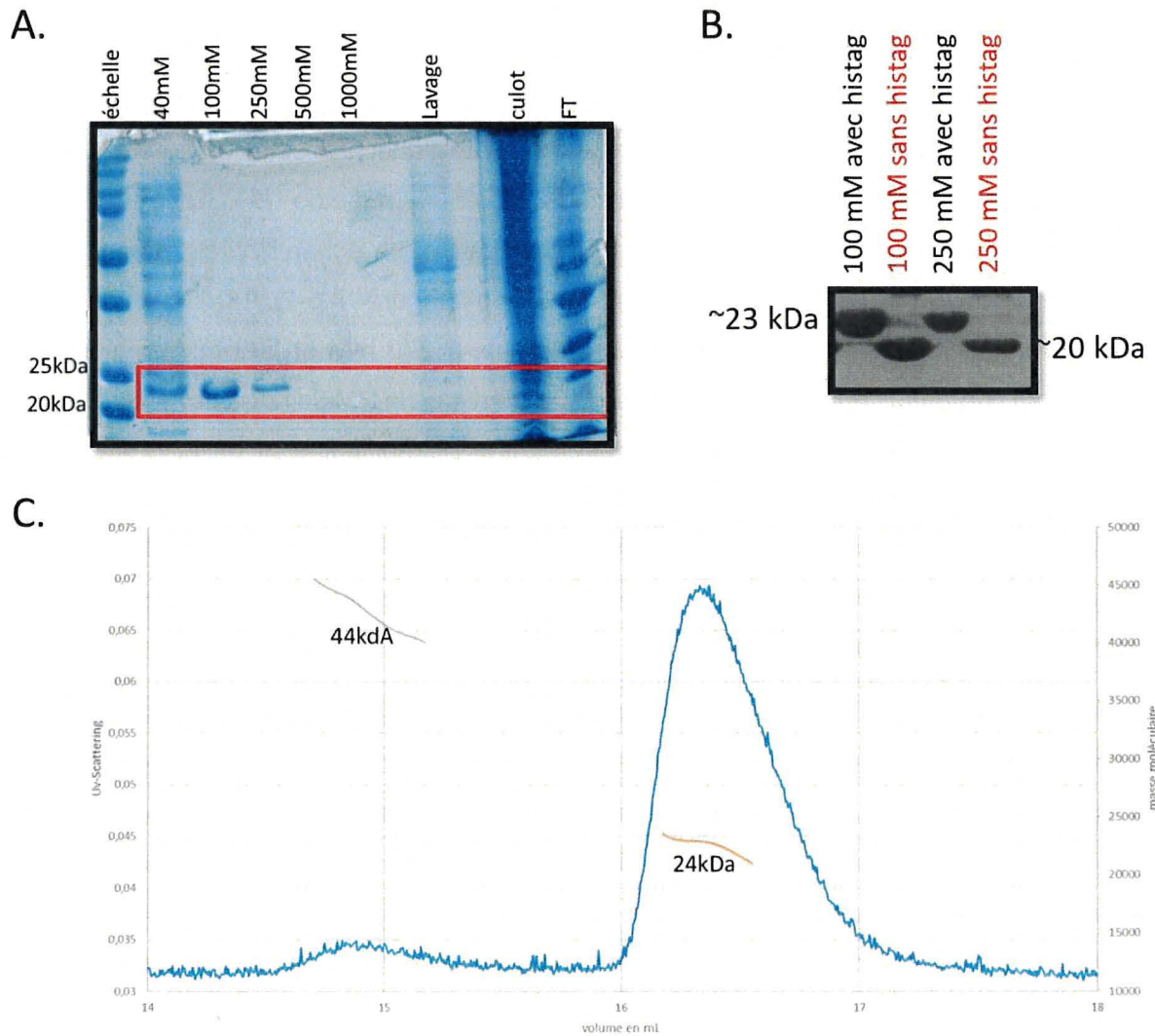


Figure 4.5-2 : SDS-Page, Western-Blot et SEC-MALS de la protéine WzaX

La souche BL21(DE3) est induite avec 500 μ M d'IPTG pendant toute la nuit puis lysé par sonication. (A) Purification sur chromatographie d'affinité. Les protéines qui n'ont pas d'affinité avec la colonne de nickel sont retrouvées dans la fraction *flow-through* (FT). Ceux qui ont une très faible interaction sont retrouvés dans les fractions de lavage. Les fractions d'éluions contiennent de façon croissante 40 mM, 100 mM, 250 mM, 500 mM et 1 M d'imidazole. L'encadré rouge représente la zone de la protéine d'intérêt. (B) Vérification de la coupure par la protéase TEV des fractions 100mM et 250mM. (C) Purification sur SEC 75 avec un analyse multiangle light scattering.

4.5.4.2 Cristallogenèse

La cristallogenèse est l'étape limitante et clé pour les études de cristallographie aux rayons X. C'est à travers cette étape que la qualité des jeux de données est déterminée. La génération de cristaux ainsi que leur qualité dépendent de plusieurs paramètres tels que la température, le pH, la pureté ou encore la force ionique. La cristallogenèse correspond au passage d'une structure protéique soluble désordonnée à une structure solide hautement ordonnée. Ici, pour réaliser la formation des cristaux, nous avons choisi d'utiliser la méthode de vapeur diffusion. Dans cette méthode, un goutte contenant un mélange de solutions précipitantes et de protéine est scellé dans une chambre avec du précipitant pur (Figure 4.4-3). La diffusion entre la goutte et le précipitant s'effectue jusqu'à ce que l'osmolarité entre la goutte et le précipitant soit équivalente. La déshydratation progressive de la goutte provoque une lente concentration des protéines et de précipitant jusqu'à ce qu'un équilibre soit atteint, idéalement dans la zone de nucléation des cristaux dans le diagramme de phase (Figure 4.5-3). Cet équilibre dépend, entre autres, de la composition du précipitant mais aussi du temps.

Sept cent soixante-huit conditions de précipitation ont été utilisées pour les tests de cristallogenèse. Dans un premier temps, les gouttes ont été faites à la main, avec une stœchiométrie protéine-précipitant 1 μ L : 1 μ L avec une concentration protéique de 4 mg/mL. Dans un second temps, les gouttes sont faites avec le robot de screening avec une concentration 6,5 mg/mL de ratio 0,5 μ L : 0,5 μ L. Sur les 768 conditions, seule une condition a donné des cristaux (Figure 4.5-4 A). Ces cristaux sont de petite taille et ont une forme plus ou moins rectangulaire. Ces formes régulières mais non parfaites laisseraient supposer que ces cristaux ne sont pas des cristaux de sel ou des composants de la condition de cristallisation.

Afin de vérifier que ces cristaux sont effectivement des protéines structurées, du bleu de méthylène a été ajouté dans la goutte. Après 24 heures, les cristaux sont à nouveau observés et comparés avant coloration (Figure 4.5-4 B). Les cristaux, ici, ne se sont pas colorés, ce qui indique que ce ne sont pas des cristaux de protéines mais d'autre chose. Cependant cette coloration n'est pas toujours fiable, seule une diffraction aux rayons X permettrait de confirmer ou d'infirmer l'observation.

La concentration de 4 mg/mL a été choisie pour les tests de cristallogenèse car il a été observé que WzaX commençait à précipiter lorsque sa concentration dépassait 7 mg/mL. Pour passer ce seuil de précipitation, la concentration de NaCl a été augmentée pour passer de 200 mM à 500 mM. Après purification, le seuil de précipitation reste sensiblement le même avec cette nouvelle condition. Dans le même but, nous avons voulu connaître l'impact du pH et du tampon sur ce

seuil de précipitation. Ainsi, une méthode de test de la stabilité a été mise en place dans le laboratoire : le *Protein Thermal Shift*.

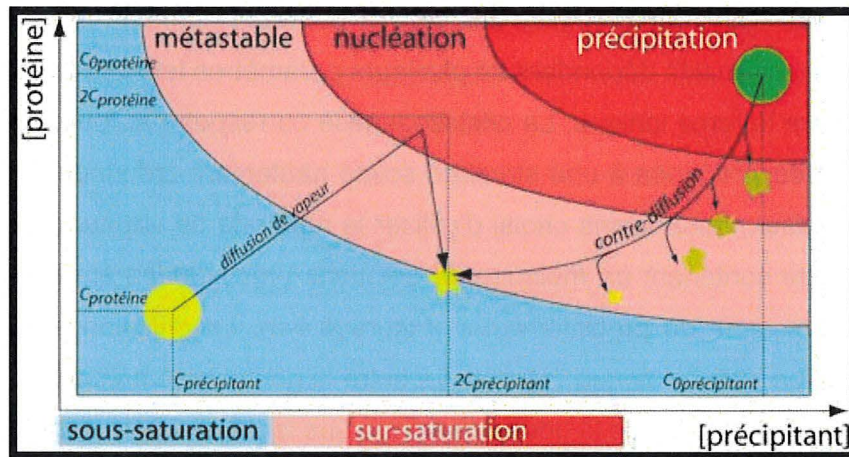


Figure 4.5-3 : diagramme de phase protéique

La cristallisation de la protéine commence dans la zone de sous-saturation. La diffusion de vapeur va équilibrer les concentrations entre la goutte et le réservoir. Cet équilibrage va faire croître la concentration en protéine et en agent précipitant au sein de la goutte et parcourir le diagramme de phase jusqu'à la zone de nucléation. C'est dans cette zone que la cristallisation se fait. La contre diffusion permet d'explorer le diagramme de manière plus exhaustive. Tiré de (Geoui, 2006).

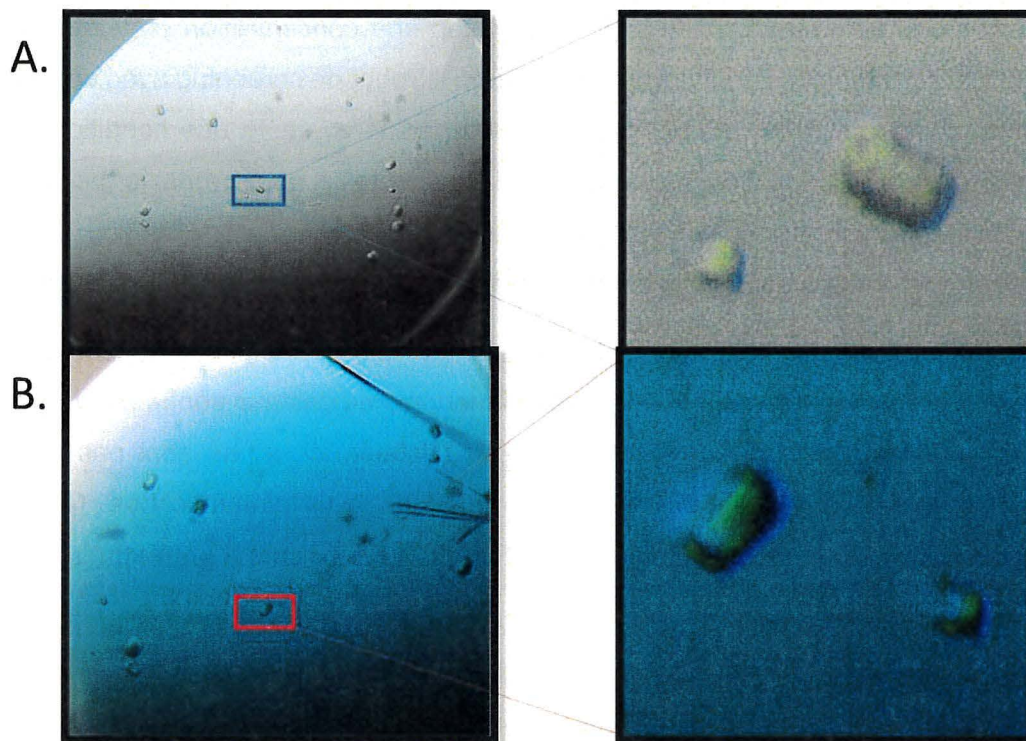


Figure 4.5-4 : Microscopie de cristaux

(A) Cristaux contrôles avant coloration au bleu de méthylène. (B) Cristaux après coloration de bleu de méthylène

4.5.4.1 Mise en place du Protein Thermal Shift

Le *Protein Thermal Shift*, aussi connu comme la fluorimétrie à balayage différentiel ou ThermoFluor™, est une méthode qui permet de tester la stabilité de la protéine avec des études de dénaturation. En principe, cette méthode utilise la température de dénaturation (T_m) pour déterminer la stabilité de la protéine. Elle va notamment scanner les changements de T_m sous de nombreuses conditions (tampons) dans lesquelles se trouve la protéine. Cette méthode peut aussi être utilisée pour étudier les interactions intra et intermoléculaires, que ce soit avec un médicament ou un ligand, mais aussi étudier les impacts d'une mutation.

Pour mettre en place cette méthode, une sélection des conditions qui seront utilisées a été faite. Ici, les principales conditions testées sont le pH, le tampon et la concentration de NaCl. Ainsi, une gamme de tampons est sélectionnée en fonction de leur capacité à tamponner. Chacune des conditions est faite en triplicata pour minimiser les écarts entre les mesures.

Avant de tester ces conditions sur nos protéines d'intérêt, des études de mise au point sur une protéine connue ont été préalablement réalisées sur le lysozyme (Figure 4.5-5). La T_m du lysozyme est prédite à 72 °C. La sonde utilisée ici (SYPRO Orange) reconnaît le corps hydrophobe lors de la dénaturation. Les résultats montrent que, peu importe la condition utilisée, la T_m du lysozyme est de 72 °C. Donc les tests peuvent être effectués sur nos protéines d'intérêts.

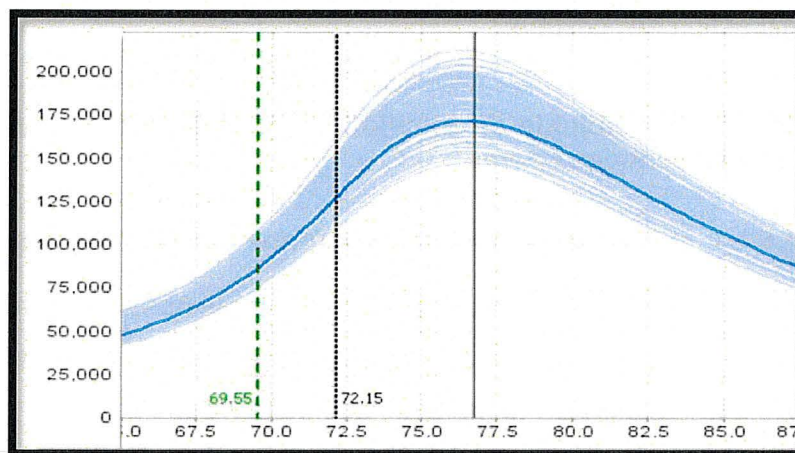


Figure 4.5-5 : Test du kit ThermoFluor™ avec du lysozyme

L'axe horizontal représente la température, l'axe vertical représente la fluorescence émise. La ligne en vert représente la T_m de Boltzmann et la ligne en pointillée la dérivée (la T_m qui doit être prise en considération)

4.5.4.2 Test de stabilité de la protéine WzaX

Les tests se sont ensuite dirigés vers WzaX. Dans un premier temps, les conditions, que nous avons préparées, ont été testées (Figure 4.5-6A). Chaque condition est représentée par couleur. D'un point de vue visuel, les couleurs sont assez hétérogènes et les courbes sont regroupées. En analysant les données, la T_m de WzaX avec les différentes conditions sont assez proches les uns des autres, environ 58 °C. Ainsi, que ce soit le pH, le type de tampon ou la concentration de NaCl, ils n'ont pas d'impact sur le seuil de stabilité de la protéine.

Dans un second temps, des tests avec différents additifs stabilisants pour la cristallogénèse ont été testés (Figure 4.5-6 B). Plusieurs conditions se démarquent et décalent la courbe vers la droite. Cette différence se remarque également sur les courbes des dérivés. Parmi ces conditions, le glycérol a l'effet le plus significatif et augmente le point de dénaturation de 58 °C à 64 °C. Cette augmentation de la température de dénaturation montre une capacité du glycérol à mieux stabiliser la protéine.

Par la suite, différentes concentrations de glycérol sont testées (0 % v/v à 40 % v/v ; les résultats ne sont pas disponibles à cause d'un concours de circonstance). Plus la concentration du glycérol augmente, plus la T_m de la protéine augmente et, par conséquent, plus sa stabilité augmente. L'effet du glycérol devient intéressant à partir de 30 % v/v. Cette concentration n'est pas recommandée pour les essais de cristallogénèses puisqu'elle défavorise le taux de cristallisation. Cependant, le glycérol est connu comme un bon cryo-protectant lors de la congélation de la protéine pour la diffraction des cristaux.

4.5.1 WzaS : partie soluble du translocon Wza intervenant dans la sécrétion du sucre de revêtement des spores

4.5.1.1 Dynamique entre une forme monomérique et dimérique

En raison de la similitude de cette protéine WzaS et de la protéine WzaX, le test d'expression n'a pas été effectué. De même, les conditions d'expression, de lyse et les tampons utilisés, sont les mêmes que dans le cas précédent. Les fractions d'élution sont déposées sur gel pour déterminer la pureté et la concentration de la protéine (Figure 4.5-7 A). Ici, des bandes sont observées dans les fractions 40 mM à 250 mM d'imidazole et se situent dans la zone de PM de la protéine avec les séquences d'étiquette hexahistidine, soit 19 kDa. Ainsi, ces bandes correspondent probablement à la protéine WzaS.

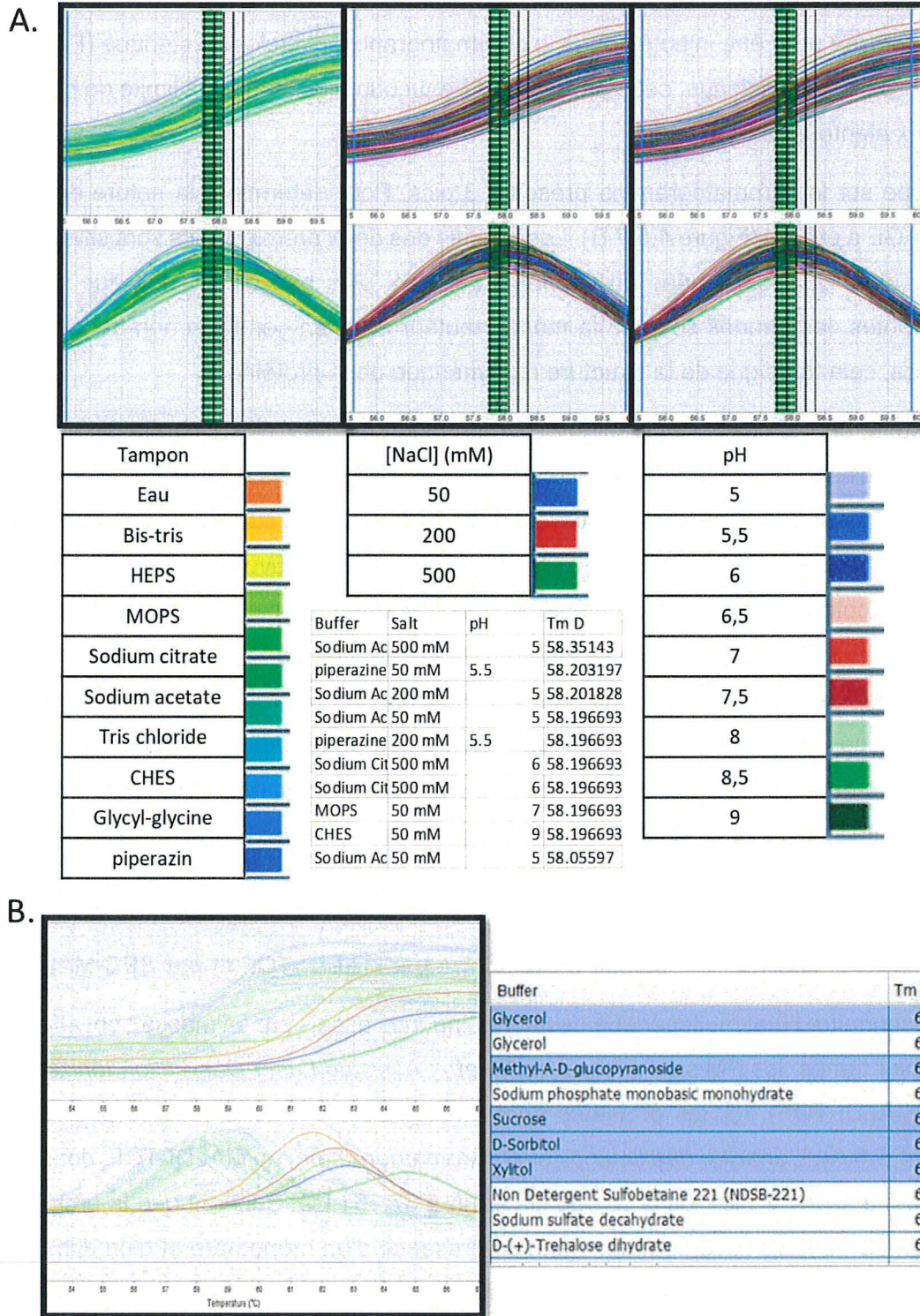


Figure 4.5-6 : Courbe de dénaturation de la protéine WzaX

La concentration total de la protéine utilisée est de 1,8 µg par réaction, la sonde est diluée juste avant les essais de *Protein Thermal Shift*. (A) *Protein Thermal Shift* en fonction du tampon, de la concentration en sel et du pH. (B) *Protein Thermal Shift* en fonction de différentes conditions de cristallogénèse. Les courbes foncées représentent les conditions en bleu dans le tableau. Seul les 10 premiers Tm de stabilisation sont représentés.

De même que précédemment, l'étiquette hexahistidine est coupé par la protéase TEV et WzaS est concentrée pour être injectée dans la chromatographie d'exclusion stérique (Figure 4.5-7 C). A l'instar de son homologue, cette protéine est beaucoup plus stable, sa limite de précipitation se situe aux alentours de 13 mg/mL.

La courbe sur le chromatogramme présente 3 pics. Pour déterminer la nature de ces pics, un SDS-PAGE a été fait (Figure 4.5-7 B). Les bandes des deux premiers pics sont situées à la même hauteur alors que les bandes du troisième pic sont plus basses. Du fait que, en conditions dénaturantes, les bandes soient à la même hauteur et qu'en condition non-dénaturante, il y ait deux pics, cela témoigne de la structure multimérique de la protéine.

Par la suite, pour étudier la dynamique oligomérique des deux pics, chaque pic est isolé. Après 24 h, les pics sont à nouveau concentrés pour être injectés dans la SEC 200. Cependant, seule une petite quantité de protéine est injectée cette fois-ci, 50 µL, pour avoir une bonne séparation entre les pics (Figure 4.5-7D). Lorsque le pic précoce est à nouveau élué, il n'y a pas deux pics sur le chromatogramme mais un unique pic. Contrairement au pic tardif, l'élué donne un profil avec deux pics. Ces expériences démontrent la dynamique de la protéine. Plus exactement, la protéine est capable de spontanément se multimériser pour former un multimère. Mais la séparation des multimères ne se fait pas. Ces informations sont intéressantes à prendre en compte lors de la cristallogénèse. En effet, la génération de cristaux n'est pas favorisée s'il y a plusieurs multimères dans la goutte. Cela va gêner la bonne structuration des cristaux. Il serait judicieux de prendre seulement les pics précoces.

4.5.1.2 Masse moléculaire par MALDI-TOF et par SEC-MALS

Afin de connaître l'état multimérique de la protéine, des essais sur sa masse sont effectués. Dans un premier temps, les PM sont évalués par *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - time of Flight* (MALDI-TOF). Ici, les protéines sont mélangées avec de la matrice pour être ionisées (Figure 4.5-8 A). L'analyse des deux pics du chromatogramme, au MALDI-TOF, donne des profils similaires, à savoir 2 pics, un à 18,488 Da et un à 37,161 Da. Sachant que la protéine a un PM d'environ de 19 kDa, nous sommes donc en présence d'un monomère et d'un dimère ($19 \text{ kDa} * 2 = 38 \text{ kDa}$). De plus, comme connu, les grosses molécules sont moins retenues dans la SEC 200, donc le premier pic représenterait le dimère et le second le monomère.

Pour confirmer cette hypothèse, une chromatographie analytique des pics avec une SEC 200 en *multiangle light scattering* (SEC-MALS) est effectuée (Figure 4.5-8 B). Sans surprise, le premier pic a un PM de 38 kDa environ et le second 19 kDa environ. Ainsi, par ces expériences nous

avons confirmé que la protéine est sous deux formes : dimère et monomère, avec une dynamique de la forme monomérique vers dimérique.

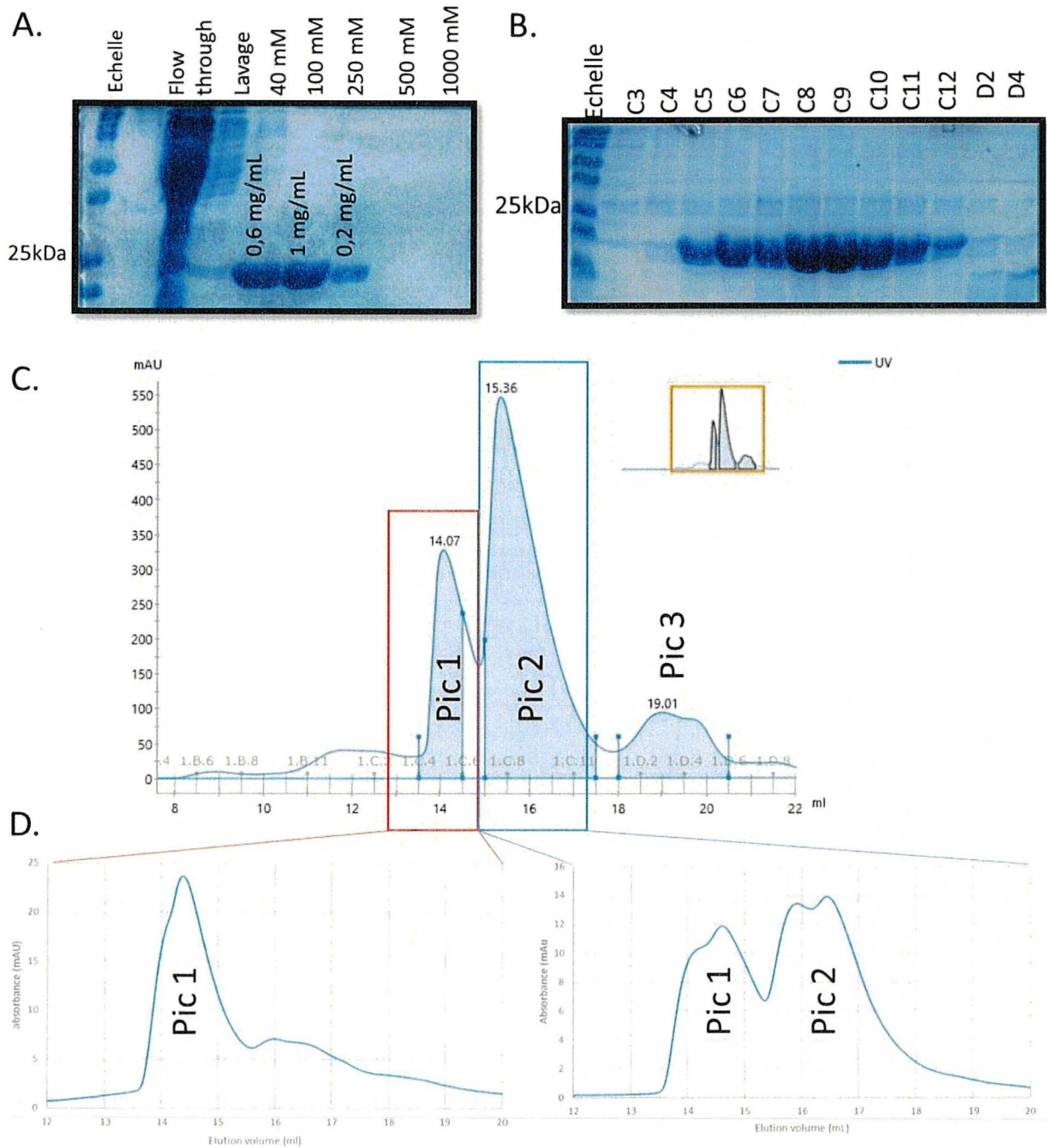
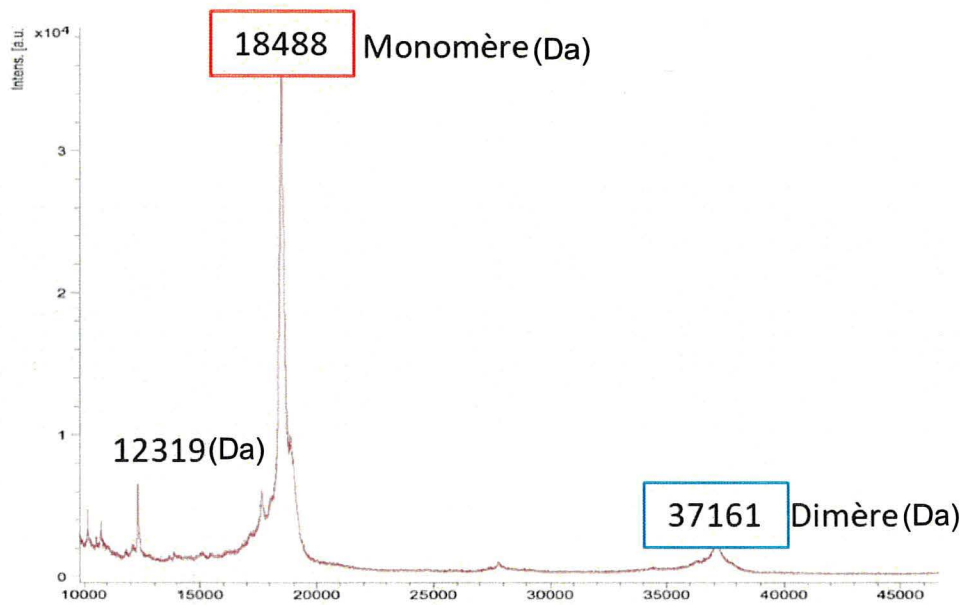


Figure 4.5-7 : SDS-Page et chromatographie d'exclusion stérique 200 de la protéine WzaS

Les souches sont induites avec de l'IPTG et lysées par sonication. Les protéines sont purifiées sur colonne de nickel et les puretés des fractions sont vérifiées sur SDS-PAGE (A). (B-C) Elimination des impuretés comme les étiquettes hexahistidines et la protéase TEV par SEC 200 et vérification de la nature des 2 pics et de la pureté sur SDS-PAGE. (D) Séparation des 2 pics pour passer à nouveau sur SEC 200 pour étudier la dynamique de la protéine. A droite se trouve la réinjection du pic 2 et à gauche celui du pic 1.

A.



B.

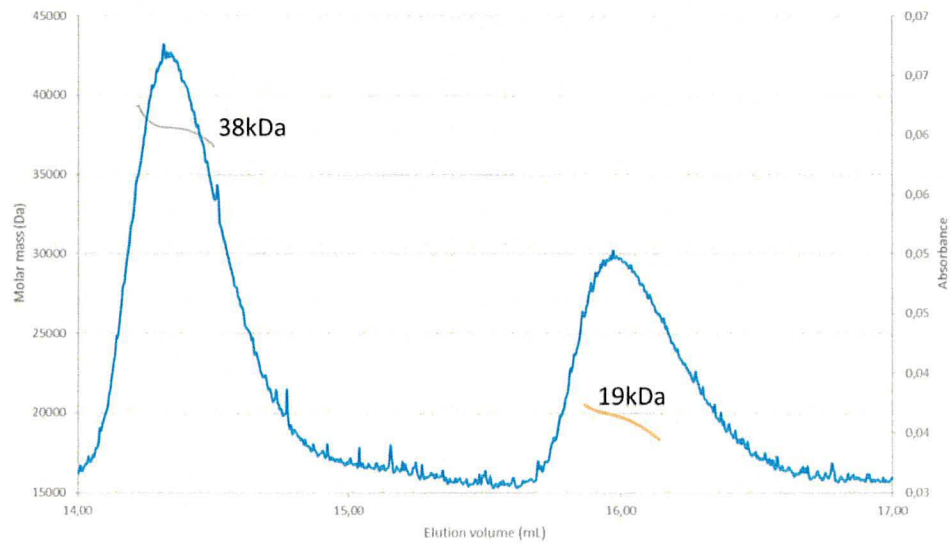


Figure 4.5-8 : Courbes de MALDI-TOF et de SEC-MALS 200 de la protéine WzaS

Détermination du poids moléculaire (PM) des différents pics observés sur SEC 200 au MALDI-TOF (A) et à la SEC-MALS 200 (B). Les PM sont en dalton sur MALDI-TOF.

4.5.1.3 Analyse structurale : Dichroïsme circulaire et RMN1D

En dehors de la cristallographie aux rayons X, qui est la technique par défaut pour avoir une bonne résolution de structure des macromolécules biologiques au niveau atomique, il existe des techniques moins complexes pour prédire la structure secondaire des protéines. Ici, nous avons utilisé le dichroïsme circulaire pour l'analyse de structure secondaire (Figure 4.5-9 A et B) et la RMN1D pour vérifier la structuration globulaire de la protéine (Figure 4.5-9 C).

Pour rappel, le dichroïsme circulaire est une méthode qui repose sur l'absorption spectroscopique de la lumière polarisée. Elle mesure notamment l'absorbance de la lumière polarisée causée par les molécules chirales. La différence d'absorbance entre les chiralités droite et gauche peut ainsi être mesurée et quantifiée. A partir de cette mesure, il est possible de déterminer la structure secondaire d'une protéine. Il est aussi possible d'étudier la stabilité de la protéine en couplant le dichroïsme circulaire avec un test de dénaturation. La RMN1D, quant à elle, repose sur les propriétés magnétiques du noyau de l'hydrogène. Plus exactement, lorsqu'un noyau atomique doté d'un spin est placé dans un champ magnétique, il va s'aligner dans la même direction ou dans la direction opposée. Ces alignements sont caractérisés par des énergies différentes et peuvent donc être différenciés.

Pour les tests de dichroïsme circulaire, plusieurs concentrations de protéines ont été testées mais les résultats restent sensiblement les mêmes. Les courbes de dichroïsme circulaire ne présentent pas de courbures caractéristiques d'un dominant de structure secondaire (feuillet β , hélices α ou coude) et les courbes de dénaturations ne présentent pas un saut significatif. Ces résultats laissent penser que la protéine est soit non structurée dès le départ, soit qu'elle présente un mélange de structures secondaires qui ne peut être détecté.

Pour tester ces hypothèses, des études de RMN1D ont été menées. La dispersion des lignes de résonance sont assez bien espacées sur ce spectre et ce dans les 3 régions. Les lignes sont également bien pointues mais l'intensité est assez faible. Avec seulement ce profil, aucune conclusion ne peut être tirée. Ainsi, une comparaison avec des profils connus est réalisée (Page *et al.*, 2005). Le profil de notre protéine n'est pas aussi net qu'un profil de protéine idéal pour la cristallographie aux rayons X mais elle n'a pas non plus le profil d'une protéine globulaire ou non structurée. Ces informations, en plus de celles du dichroïsme circulaire et du dimère observé en MS et au chromatographie d'exclusion stérique, suggèrent que cette protéine est structurée et qu'elle est propice à des études de cristallogenèse. Comme précédemment, 746 conditions de cristallogenèse ont été testées à 12 mg/ml de protéine. Malheureusement, aucun cristal n'a été produit.

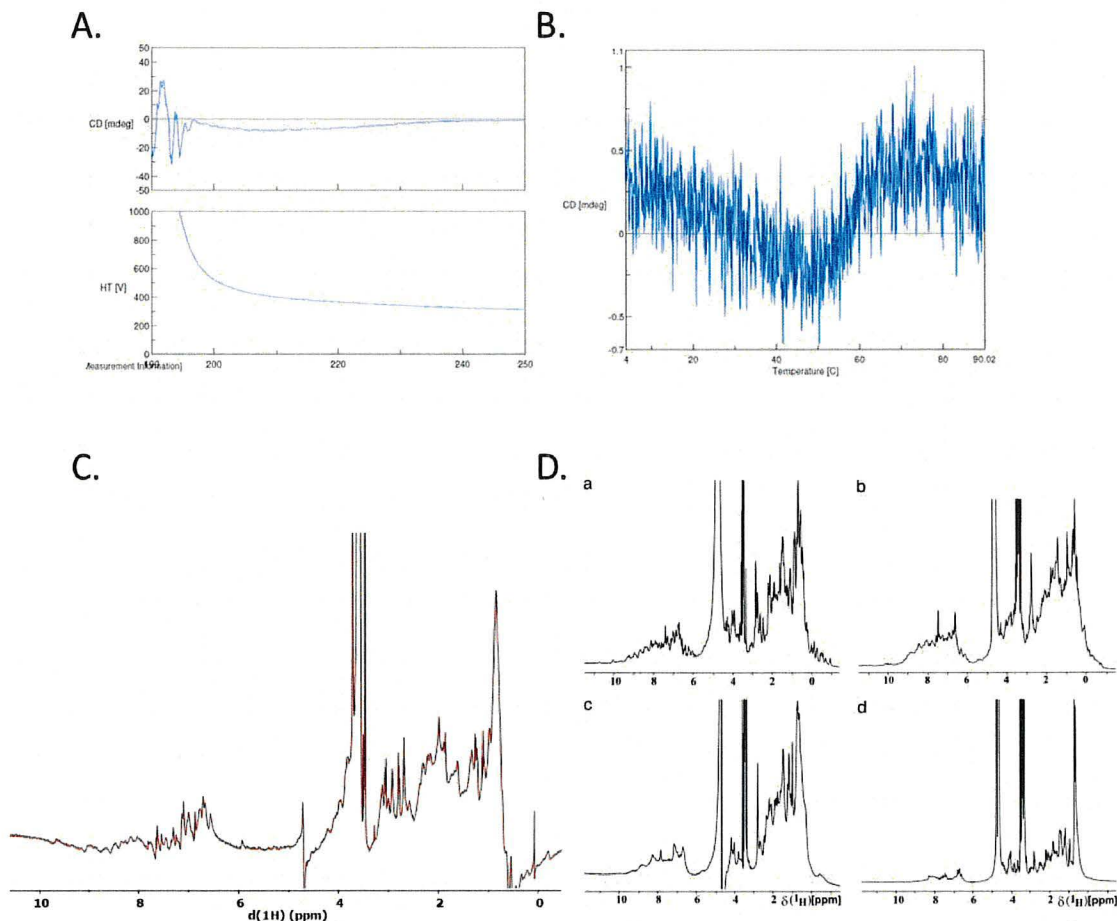


Figure 4.5-9 : courbes de Dichroïsme circulaire et RMN 1D

(A) Courbe de polarisation de la lumière au dichroïsme circulaire. (B) Courbe de dénaturation au dichroïsme circulaire. (C) RMN1D de la protéine 3225. (D) Exemples de profils de protéines aux RMN1D : (a) Protéine idéale pour la cristallogénèse, (b) Protéine de qualité moyenne, (c) protéine globulaire et (d) Protéine non structurée (Page *et al.*, 2005).

4.5.1.4 Reconstruction en 3 dimensions *ab initio* de WzaS aux SAXS

Pour aller plus loin dans les expériences d'évaluation du degré de repliement de WzaS et pour avoir une première approche dans la reconstruction en 3 dimensions (3D) de cette protéine, des tests de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS, de l'anglais *Small Angle X-rays Scattering*) a été faite. Le SAXS est une technique expérimentale qui permet d'avoir une première tentative de reconstruction en 3D d'une protéine à très faible résolution (1 – 100 nm). Cette technique utilise un rayonnement monochromatique qui interagit avec les nuages électroniques des molécules, présentes dans une solution de macromolécules, pour donner des informations sur la fluctuation de leur densité électronique.

Dans le but d'analyser individuellement les multimères de WzaS, nous avons utilisé le SEC-SAXS. Comme dans le cas du SEC-Mals, cela nous donne le pic 1 qui correspond au dimère (~38 kDa) et le pic 2 qui correspond au monomère (~18 kDa). A partir du SEC-SAXS, plusieurs opérations mathématiques sont appliquées, dont le plot de Guinier, la transformation de Fourier et le plot de Kratky (Figure 4.5-10). L'analyse de Guinier ouvre l'accès à toutes les autres opérations mathématiques en donnant le rayon de gyration ($I(0)$) et l'intensité de dispersion (R_g). La transformation de Fourier fournit le diamètre maximal de la particule (D_{max}) ainsi que son facteur de forme ($P(r)$). Grâce à ces données, une première estimation de la conformation en 3D de la protéine peut être faite. Enfin, les analyses de Kratky déterminent le degré de repliement de la protéine.

En ce qui concerne les résultats des analyses de Guinier, la présence d'une fonction linéaire, au niveau des faibles vecteurs de diffusion (q), confirme la présence d'une région de Guinier (Figure 4.5-10 A). C'est à partir de cette région que R_g et $I(0)$ sont calculés et les valeurs sont respectivement 34,11 angström (Å) et 0,0057 pour le pic 1 et 23,32 Å et 0,0024 pour le pic 2 (Figure annexe 4.7-1 et -2). Ici, nous pouvons aussi remarquer que les points suivent une tendance rectiligne, ce qui témoigne de la non-présence d'agrégation ou de répulsion au sein de la solution de macromolécules. Les résultats de R_g , couplé à un q faible, permettent le calcul de qR_g (degré de déviation). Ici les valeurs de qR_g sont proches de 1,3 ce qui indique que la molécule a un aspect plutôt sphérique qu'allongé.

Par la suite, la génération de structure 3D *ab initio* en modèle en atome permet de confirmer que la protéine a un aspect sphérique. De plus, grâce à la transformation de Fourier, les D_{max} calculés sont de 92 Å pour le pic 1 et 74 Å pour le pic 2. De même, pour le $P(r)$, les valeurs sont respectivement de 32 pour le pic 1 et 23 pour le pic 2 (Figure 4.5-10 B et C). Enfin, l'analyse du plot de Kratky montre que l'allure des 2 pics sont proches de celle d'une cloche, ce qui indique un bon degré de repliement de la protéine (Figure 4.5-10). Tous ces résultats combinés nous indiquent que le monomère de la protéine 3225 est mieux replié que le dimère, que ce soit sur le plot de Kratky ou sur le modèle en atome. De plus, les données liées à la taille de la protéine (R_g , D_{max} , $P(r)$) sont plus élevées dans le dimère que le monomère ce qui est concordant avec le fait qu'un dimère présente un volume plus grand.

La modélisation du modèle en atome en modèle cartoon (*bead* modèle) permet d'apprécier, avec un degré de précision plus élevé, la forme des protéines. Cependant, pour pouvoir discuter plus en profondeur de la structuration des protéines, une meilleure résolution est nécessaire. Ici, les résolutions sont de 34 Å pour le dimère et 28 Å pour le monomère (Figure annexe 7.1-3).

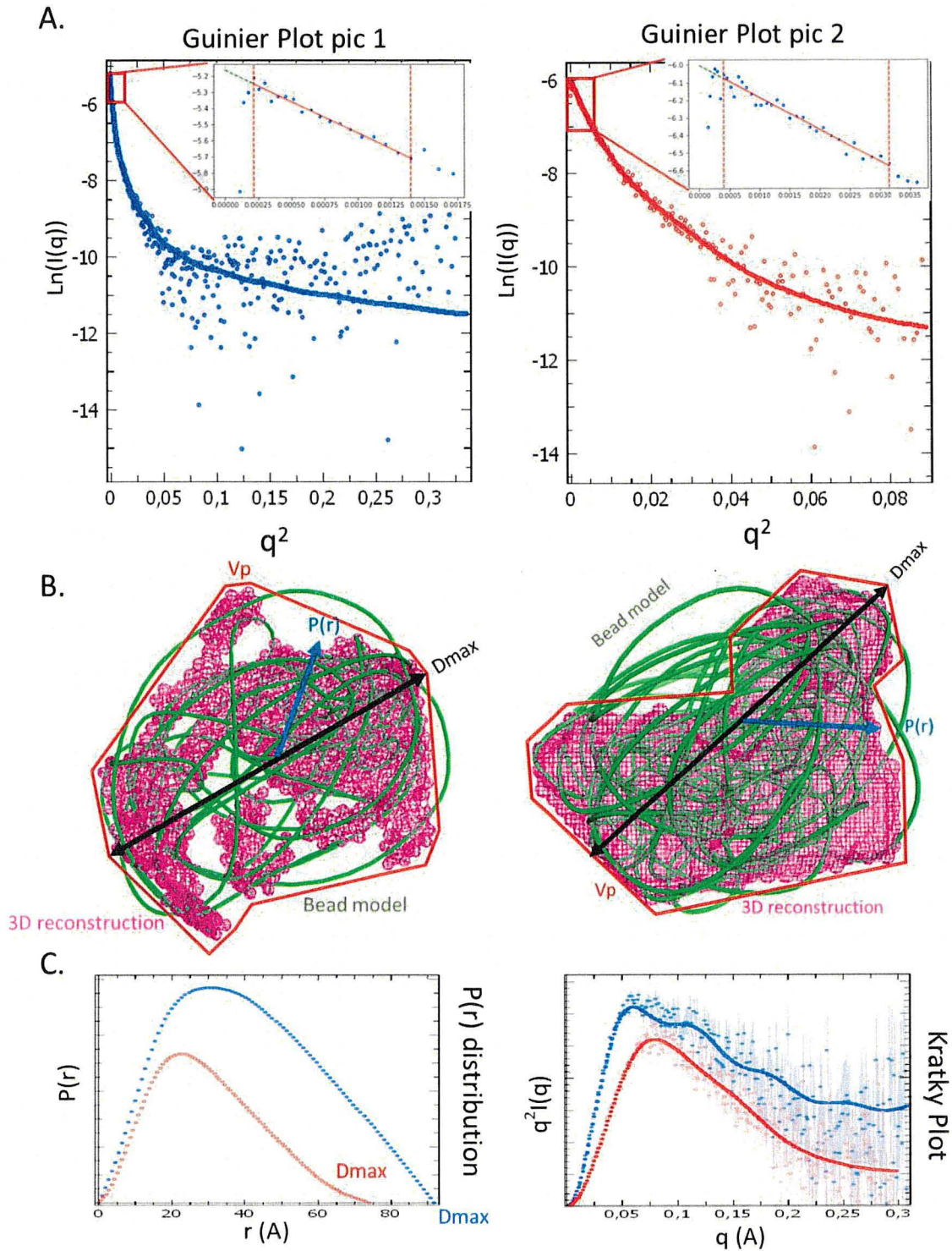


Figure 4.5-10 : analyse de SAXS de la protéine WzaS

A. Transformation linéaire de la région de Guinier : donne une estimation du rayon de gyration R_g . B. Reconstruction 3D en *bead* modèle de WzaS avec à droite le pic 1 et à gauche le pic 2 (position de sortie en SEC-MALS). C. Transformation de Fourier à droite : donne le rayon de forme, $P(r)$ avec la dimension maximale D_{max} / Kratky transformation à gauche : donne une évaluation qualitative du degré de repliement de la protéine grâce à la forme de la courbe (bleu = pic 1 et rouge = pic2). q = vecteur de diffusion

4.6 Discussions et conclusions

Les mécanismes qui régissent la motilité sont des étapes clé pour la compréhension des comportements bactériens. Dans un premier temps, il est connu que chez *M. xanthus*, un des composants majeurs qui intervient dans ses deux systèmes de motilités, *gliding* et S-motilité, est l'utilisation des polysaccharides. Ces polysaccharides sont par ailleurs aussi utilisés pour la cohésion des biofilms (Berleman *et al.*, 2016; Islam *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2005). Dans cette lancée, nous nous sommes donc focalisés sur la compréhension de leur mécanisme de sécrétion. Dans un second temps, le système de *gliding* est tout aussi important à étudier. En effet, la capacité qu'a la bactérie à pouvoir se mouvoir sur des surfaces solides, sans appendice extra-cellulaire, reste un mystère sur son fonctionnement. Ce n'est que récemment que des études ont fait des avancées majeures dans ce domaine (Faure *et al.*, 2016; Salim T. Islam, 2020). Ainsi, nous avons voulu résoudre au niveau moléculaire le fonctionnement de ces nouveaux mécanismes à travers la cristallographie aux rayons X.

Dans ce but, de nombreux clonages ont été effectués afin de cribler les protéines. Les protéines qui ont été sélectionnées pour être étudiées sont celles qui sont exprimées dans un premier temps. Celles qui sont exprimées en grande quantité sont ensuite soumises à des études plus poussées. Il y a aussi d'autres paramètres qui sont pris en considération, comme la qualité de la protéine dans les fractions ou encore la difficulté de la purification. En prenant en considération tous ces paramètres, deux protéines du complexe de sécrétion Wza ont été sélectionnées pour les études poussées : l'une intervient dans la sécrétion de l'exopolysaccharide, WzaX, et l'autre dans la sécrétion du *major spore coat*, WzaS.

La production de ces protéines se situe aux alentours de 12,5 mg par litre de culture ce qui est largement suffisant pour les études de cristallogénèse. Mais les étapes limitantes, dont la concentration et les conditions idéales ainsi que le temps nécessaire à la génération de cristaux, sont spécifiques à chaque protéine. Pour le moment, aucun cristal de protéine n'a été généré, seuls des cristaux de sel ou des pellicules ont été observés. Pour surmonter ces problèmes, des modifications des conditions de cristallisation sont envisagées. Par exemple, le changement de la concentration de la protéine, l'ajout de certains stabilisants comme le glycérol, etc.

La concentration de précipitation de WzaX étant assez basse (6.5 mg/ml), nous avons cherché ses meilleures conditions de stabilisation. Pour cela, la technique de *Protein Thermal Shift* a été développée au laboratoire. Cela a permis de montrer que le glycérol pouvait être un élément clé pour sa stabilisation. Il est connu que le glycérol a un rôle de stabilisant et de cryo-protectant pour les protéines. Mais il est aussi connu pour augmenter la solubilité des protéines et, plus important

encore, il est un agent anti-nucléateur lors de la cristallogenèse (Vera *et al.*, 2011). Cette dernière propriété est particulièrement problématique dans notre cas. Ainsi, un équilibre entre la concentration de glycérol et la nucléation doit être trouvé pour avancer dans la suite des études.

WzaS étant le candidat idéal pour la suite des expérimentations, nous avons essayé de résoudre ses structures secondaires dominantes à travers des études de dichroïsmes circulaires. Malheureusement, aucune information précise n'a pu en être obtenue, car la polarisation de sa lumière ne correspond à aucun des profils de structure secondaire pure. De plus, la courbe de dénaturation laisse penser que la protéine n'est pas bien structurée même si l'état dynamique de la protéine contredit cette observation.

Ainsi, pour départager ces deux hypothèses, des études de rayonnement à résonance magnétique à 1 dimension (RMN1D) et de cinétique de dénaturation (Tycho) ont été entreprises. Malheureusement, les expériences de Tycho n'ont donné aucune conclusion utile, mais la RMN1D confirme que la protéine est bien structurée. Les études de *Small angle X-rays scattering* (SAXS) ont permis d'apprécier une première reconstruction en 3D de WzaS. Ces reconstructions montrent que la protéine aurait un aspect sphérique mais la résolution n'est pas assez bonne pour tirer des conclusions définitives. En effet, il est attendu que la protéine soit capable de former plusieurs multimères (octamère) plutôt qu'un seul dimère, comme dans le cas du complexe Wza chez *E. coli*.

Les méthodes de purification et de cristallisation de la structure de Wza chez *E. coli* (Dong *et al.*, 2006) ne peuvent pas être appliquées ici, car chez *M. xanthus*, nous sommes en présence de deux parties, une membranaire et une périplasmique. Ainsi, nous avons décidé de les séparer et de réaliser deux processus de cristallographie aux rayons X.

Pour les protéines périplasmiques, les méthodes et les résultats ont été présentés dans ce mémoire. Pour les protéines membranaires, les méthodes de purification sont encore en cours de réalisation et sont en train d'être optimisées. Pour le moment, nous avons une méthode d'extraction à partir de cellules entières avec l'utilisation du détergent directement. Nous sommes aussi en train de développer une autre méthode, qui permet d'éliminer les protéines membranaires internes et cytoplasmique. Cependant, pour ces deux méthodes, la pureté des fractions de purification n'est pas encore assez bonne pour réaliser les plaques de cristallogenèses.

Concernant les protéines intervenant dans la motilité de type *gliding*, ce n'est que récemment que nous avons pu obtenir les clonages et les résultats des tests d'expression ne sont pas vraiment encourageants pour la suite des expérimentations. D'autres souches et stratégies doivent être considérées pour produire au mieux ces protéines. Cette étude n'est pour l'instant qu'une ébauche aux études de cristallographie aux rayons X qui vont suivre par la suite pour les systèmes de sécrétion de sucres et pour la machinerie de *gliding*. Elle n'en reste pas moins essentielle pour avoir de bons jeux de données pour l'obtention d'une bonne résolution de structure.

5. CONCLUSION GENERALE

Au travers de ces études, je me suis essentiellement concentré sur la production de protéines pures pour pouvoir cribler les conditions de cristallisation et obtenir des cristaux.

Malheureusement, dans le cas de l'extrémité de T4P, je n'ai pas réussi à avoir assez de protéines pour continuer les expérimentations. Un changement au niveau de la construction elle-même doit, à mon sens, être revue car la protéine produite ne semble pas être assez stable. D'autres conditions de purification peuvent aussi être testées comme le pH, lors de la purification ou encore changer la méthode de lyse, etc.

Dans le cas des protéines impliquées dans le complexe Wza, elles sont en bonne voie pour la suite des expérimentations pour les études de cristallogénèse. Concernant WzaX, la génération de cristaux sera faite en présence de glycérol dans la goutte. Concernant WzaS, beaucoup de précipités sont observés dans les gouttes. Pour résoudre ce problème, nous allons diminuer sa concentration dans les gouttes. A cause de la présence de multimères dynamiques dans les solutions de purification, il est aussi judicieux de séparer les dimères des monomères pour faire des gouttes séparément.

Nous sommes actuellement aussi sur la purification des protéines membranaires des complexes Wza. Une fois purifiées, des tests d'interactions seront faits pour voir leurs aptitudes à former le complexe entier. En effet, dans le cas de la protéine Wza chez *E. coli*, elle est sous forme d'un octamère (Beis *et al.*, 2004b). Il est donc fort probable que notre protéine se comporte de la même manière.

Une fois que ces protéines seront produites, nous pourrons envisager de faire des cristaux avec le complexe Wza entier. Aussi, si une interaction est observée et que le complexe formé est assez grand, des études de cryo-microscopie électronique pourront être envisagées.

Concernant les protéines du complexe de *gliding*, des études d'interaction sont aussi envisagées. Cependant, pour le moment, un effort sur la sélection de la bonne souche d'expression doit être fait. Une fois que ces protéines seront produites, les premières données de cristallographie aux rayons X pourront être générées. Cependant, la résolution complète de la structure de ces protéines nécessite la résolution du groupe d'espace et la détermination de l'emplacement des atomes. Or, malheureusement, aucun homologue n'a été répertorié pour ces protéines. Ainsi, pour résoudre ces problèmes, il est nécessaire de marquer ces protéines avec des métaux lourds ou de remplacer des méthionines par de la sélénométhionine.

Parmi les protéines présentes dans la machinerie de *gliding*, une protéine particulière a un PM très faible, GlTF (7 kDa). Cette protéine peut faire l'objet d'une résolution de structure à partir de la spectroscopie RMN 3D ou 4D. Cependant, pour réaliser cela, il est nécessaire de marquer les atomes avec des isotopes stables à l'azote 15 et au carbone 13.

6. BIBLIOGRAPHIE

- Beaussart A, Baker AE, Kuchma SL, El-Kirat-Chatel S, O'Toole GA & Dufrêne YF (2014) Nanoscale Adhesion Forces of *Pseudomonas aeruginosa* Type IV Pili. *ACS Nano* 8(10):10723-10733.
- Beebe JM (1941) The Morphology and Cytology of *Myxococcus xanthus*, N. Sp. *Journal of bacteriology* 42(2):193-223.
- Beis K, Collins RF, Ford RC, Kamis AB, Whitfield C & Naismith JH (2004a) Three-dimensional Structure of Wza, the Protein Required for Translocation of Group 1 Capsular Polysaccharide across the Outer Membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 279(27):28227-28232.
- Beis K, Nesper J, Whitfield C & Naismith JH (2004b) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Wza outer-membrane lipoprotein from *Escherichia coli* serotype O9a:K30. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 60(3):558-560.
- Berleman JE, Allen S, Danielewicz MA, Remis JP, Gorur A, Cunha J, Hadi MZ, Zusman DR, Northen TR, Witkowska HE & Auer M (2014) The lethal cargo of *Myxococcus xanthus* outer membrane vesicles. *Frontiers in microbiology* 5:474.
- Berleman JE, Chumley T, Cheung P & Kirby JR (2006) Rippling is a predatory behavior in *Myxococcus xanthus*. *Journal of bacteriology* 188(16):5888-5895.
- Berleman JE, Zemla M, Remis JP, Liu H, Davis AE, Worth AN, West Z, Zhang A, Park H, Bosneaga E, Van Leer B, Tsai W, Zusman DR & Auer M (2016) Exopolysaccharide microchannels direct bacterial motility and organize multicellular behavior. *The ISME journal* 10(11):2620-2632.
- Blackhart BD & Zusman DR (1985) "Frizzy" genes of *Myxococcus xanthus* are involved in control of frequency of reversal of gliding motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82(24):8767-8770.
- Boyd A & Simon M (1982) Bacterial Chemotaxis. *Annual Review of Physiology* 44(1):501-517.
- Burchard RP (1982) Trail following by gliding bacteria. *Journal of bacteriology* 152(1):495.
- Chang Y-W, Rettberg LA, Treuner-Lange A, Iwasa J, Søgaaard-Andersen L & Jensen GJ (2016) Architecture of the type IVa pilus machine. *Science* 351(6278):aad2001.
- Clausen M, Jakovljevic V, Sogaard-Andersen L & Maier B (2009) High-Force Generation Is a Conserved Property of Type IV Pilus Systems. *Journal of bacteriology* 191(14):4633-4638.
- Collins RF, Beis K, Clarke BR, Ford RC, Hulley M, Naismith JH & Whitfield C (2006) Periplasmic Protein-Protein Contacts in the Inner Membrane Protein Wzc Form a Tetrameric Complex Required for the Assembly of *Escherichia coli* Group 1 Capsules. *Journal of Biological Chemistry* 281(4):2144-2150.
- Collins RF, Beis K, Dong C, Botting CH, McDonnell C, Ford RC, Clarke BR, Whitfield C & Naismith JH (2007) The 3D structure of a periplasm-spanning platform required for assembly of group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. 104(7):2390-2395.
- Costa TRD, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M & Waksman G (2015) Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology* 13(6):343-359.

- Dobson CM (2004) Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Seminars in cell & developmental biology* 15(1):3-16.
- Dong C, Beis K, Nesper J, Brunkan-Lamontagne AL, Clarke BR, Whitfield C & Naismith JH (2006) Wza the translocon for *E. coli* capsular polysaccharides defines a new class of membrane protein. 444(7116):226-229.
- Ducret A, Fleuchot B, Bergam P & Mignot T (2013) Direct live imaging of cell–cell protein transfer by transient outer membrane fusion in *Myxococcus xanthus*. 2.
- Ducret A, Valignat M-P, Mouhamar F, Mignot T & Theodoly O (2012) Wet-surface–enhanced ellipsometric contrast microscopy identifies slime as a major adhesion factor during bacterial surface motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(25):10036-10041.
- Fath MJ & Kolter R (1993) ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiological Reviews* 57(4):995.
- Faure LM, Fiche J-B, Espinosa L, Ducret A, Anantharaman V, Luciano J, Lhospice S, Islam ST, Tréguier J, Sotes M, Kuru E, Van Nieuwenhze MS, Brun YV, Théodoly O, Aravind L, Nollmann M & Mignot T (2016) The mechanism of force transmission at bacterial focal adhesion complexes. *Nature* 539(7630):530-535.
- Feldman MF, Marolda CL, Monteiro MA, Perry MB, Parodi AJ & Valvano MA (1999) The Activity of a Putative Polyisoprenol-linked Sugar Translocase (Wzx) Involved in *Escherichia coli* O Antigen Assembly Is Independent of the Chemical Structure of the O Repeat. 274(49):35129-35138.
- Franke D, Petoukhov MV, Konarev PV, Panjkovich A, Tuukkanen A, Mertens HDT, Kikhney AG, Hajizadeh NR, Franklin JM, Jeffries CM & Svergun DI (2017) ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. *Journal of Applied Crystallography* 50(4):1212-1225.
- Fu G, Bandaria JN, Le Gall AV, Fan X, Yildiz A, Mignot T, Zusman DR & Nan B (2018) MotAB-like machinery drives the movement of MreB filaments during bacterial gliding motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(10):2484-2489.
- Galicia C, Lhospice S, Varela PF, Trapani S, Zhang W, Navaza J, Herrou J, Mignot T & Cherfils J (2019) MglA functions as a three-state GTPase to control movement reversals of *Myxococcus xanthus*. *Nature communications* 10(1):5300.
- Geoui T (2006) Contribution to the *Epstein-Barr* virus Structural Genomic Project: The Uracil-DNA Glycosylase and the Nucleic-Acid Metabolism Enzyme.
- Giancchetti E, Torelli A, Piccini G, Piccirella S & Montomoli E (2015) *Neisseria meningitidis* infection: who, when and where? *Expert Rev Anti Infect Ther* 13(10):1249-1263.
- Greenfield LK & Whitfield C (2012) Synthesis of lipopolysaccharide O-antigens by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydrate research* 356:12-24.
- Gronewold TM & Kaiser D (2001) The act operon controls the level and time of C-signal production for *Myxococcus xanthus* development. *Molecular microbiology* 40(3):744-756.
- Gulli JG, Herron MD & Ratcliff WC (2019) Evolution of altruistic cooperation among nascent multicellular organisms. *Evolution* 10.1111/evo.13727.
- Henrichsen J (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological Reviews* 36(4):478-503.

- Hodgkin J & Kaiser D (1979a) Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacteriales): Genes controlling movement of single cells. *Molecular and General Genetics MGG* 171(2):167-176.
- Hodgkin J & Kaiser D (1979b) Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacteriales): Two gene systems control movement. 171(2):177-191.
- Holkenbrink C, Hoiczky E, Kahnt J & Higgs PI (2014) Synthesis and assembly of a novel glycan layer in *Myxococcus xanthus* spores. *The Journal of biological chemistry* 289(46):32364-32378.
- Holland IB (2004) Translocation of bacterial proteins—an overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1694(1):5-16.
- Hospenthal MK, Costa TRD & Waksman G (2017) A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nature reviews. Microbiology* 15(6):365-379.
- Iizuka T, Jojima Y, Fudou R & Yamanaka S (1998) Isolation of myxobacteria from the marine environment. *FEMS microbiology letters* 169(2):317-322.
- Imhaus AF & Duménil G (2014) The number of *Neisseria meningitidis* type IV pili determines host cell interaction. *The EMBO journal* 33(16):1767-1783.
- Islam ST, Gold AC, Taylor VL, Anderson EM, Ford RC & Lam JS (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. 286(23):20600-20605.
- Islam ST & Lam JS (2013) Wzx flippase-mediated membrane translocation of sugar polymer precursors in bacteria. *Environmental microbiology* 15(4):1001-1015.
- Islam ST & Lam JS (2014) Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway. *Canadian journal of microbiology* 60(11):697-716.
- Islam ST & Mignot T (2015) The mysterious nature of bacterial surface (gliding) motility: A focal adhesion-based mechanism in *Myxococcus xanthus*. *Seminars in cell & developmental biology* 46:143-154.
- Islam ST, Vergara Alvarez I, Saïdi F, Guiseppi A, Vinogradov E, Sharma G, Espinosa L, Morrone C, Bresseur G, Guillemot J-F, Benarouche A, Bridot J-L, Ravicoularamin G, Cagna A, Gauthier C, Singer M, Fierobe H-P, Mignot T & Mauriello EMF (2020) Modulation of bacterial multicellularity via spatio-specific polysaccharide secretion. *PLoS biology* 18(6):e3000728-e3000728.
- Jahn E (1924) *Beiträge zur botanischen Protistologie*. Gebrüder Borntraeger,
- Jakobczak B, Keilberg D, Wuichet K & Sogaard-Andersen L (2015) Contact- and Protein Transfer-Dependent Stimulation of Assembly of the Gliding Motility Machinery in *Myxococcus xanthus*. *PLoS genetics* 11(7):e1005341.
- Kearns DB (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology* 8(9):634-644.
- Kearns DB & Shimkets LJ (1998) Chemotaxis in a gliding bacterium. 95(20):11957-11962.
- Keenleyside WJ & Whitfield C (1996) A Novel Pathway for O-Polysaccharide Biosynthesis in *Salmonella enterica* Serovar Borreze. 271(45):28581-28592.
- Kenne L & Lindberg B (1983) 5 - Bacterial Polysaccharides. *The Polysaccharides*, Aspinall GO (Édit.) Academic Press, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-065602-8.50010-8>. p 287-363.

- Kennouche P, Charles-Orszag A, Nishiguchi D, Goussard S, Imhaus AF, Dupré M, Chamot-Rooke J & Duménil G (2019) Deep mutational scanning of the *Neisseria meningitidis* major pilin reveals the importance of pilus tip-mediated adhesion. *The EMBO journal* 38(22).
- Kolappan S, Coureuil M, Yu X, Nassif X, Egelman EH & Craig L (2016) Structure of the *Neisseria meningitidis* Type IV pilus. *Nature communications* 7(1):13015.
- Lee B, Holkenbrink C, Treuner-Lange A & Higgs PI (2012) *Myxococcus xanthus* Developmental Cell Fate Production: Heterogeneous Accumulation of Developmental Regulatory Proteins and Reexamination of the Role of MazF in Developmental Lysis. *Journal of bacteriology* 194(12):3058-3068.
- Leonardy S, Miertzschke M, Bulyha I, Sperling E, Wittinghofer A & Søgaard-Andersen L (2010) Regulation of dynamic polarity switching in bacteria by a Ras-like G-protein and its cognate GAP. 29(14):2276-2289.
- Li Y, Sun H, Ma X, Lu A, Lux R, Zusman D & Shi W (2003) Extracellular polysaccharides mediate pilus retraction during social motility of *Myxococcus xanthus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(9):5443-5448.
- Liu D, Cole RA & Reeves PR (1996) An O-antigen processing function for Wzx (RfbX): a promising candidate for O-unit flippase. *Journal of bacteriology* 178(7):2102-2107.
- Livingstone PG, Morphew RM & Whitworth DE (2017) Myxobacteria Are Able to Prey Broadly upon Clinically-Relevant Pathogens, Exhibiting a Prey Range Which Cannot Be Explained by Phylogeny. *Frontiers in microbiology* 8.
- Low KE & Howell PL (2018) Gram-negative synthase-dependent exopolysaccharide biosynthetic machines. *Current Opinion in Structural Biology* 53:32-44.
- Lu A, Cho K, Black WP, Duan XY, Lux R, Yang Z, Kaplan HB, Zusman DR & Shi W (2005) Exopolysaccharide biosynthesis genes required for social motility in *Myxococcus xanthus*. *Molecular microbiology* 55(1):206-220.
- Lu S, Giuliani M, Harvey H, Burrows LL, Wickham RA & Dutcher JR (2015) Nanoscale Pulling of Type IV Pili Reveals Their Flexibility and Adhesion to Surfaces over Extended Lengths of the Pili. *Biophysical journal* 108(12):2865-2875.
- Luciano J, Agrebi R, Le Gall AV, Wartel M, Fiegna F, Ducret A, Brochier-Armanet C & Mignot T (2011) Emergence and Modular Evolution of a Novel Motility Machinery in Bacteria. *PLoS genetics* 7(9):e1002268.
- Machuca MA & Roujeinikova A (2017) Method for Efficient Refolding and Purification of Chemoreceptor Ligand Binding Domain. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 10.3791/57092(130):e57092.
- Marchiafava E & Celli A (1884) Spra i micrococchi della meningite cerebrospinale epidemica. *Gazz degli Ospedali* 5:59.
- Marshall RC & Whitworth DE (2019) Is “Wolf-Pack” Predation by Antimicrobial Bacteria Cooperative? Cell Behaviour and Predatory Mechanisms Indicate Profound Selfishness, Even when Working Alongside Kin. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 41(4):1800247.
- Martínez A, Torello S & Kolter R (1999) Sliding motility in mycobacteria. *Journal of bacteriology* 181(23):7331-7338.

- Mattick JS (2002) Type IV Pili and Twitching Motility. *Annual review of microbiology* 56(1):289-314.
- Mauriello EMF, Mignot T, Yang Z & Zusman DR (2010) Gliding Motility Revisited: How Do the Myxobacteria Move without Flagella? *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 74(2):229-249.
- Mauriello EMF, Nan B & Zusman DR (2009) AglZ regulates adventurous (A-) motility in *Myxococcus xanthus* through its interaction with the cytoplasmic receptor, FrzCD. *Molecular microbiology* 72(4):964-977.
- McBride MJ & Zusman DR (1996) Behavioral analysis of single cells of *Myxococcus xanthus* in response to prey cells of *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters* 137(2-3):227-231.
- Mignot T, Shaevitz JW, Hartzell PL & Zusman DR (2007) Evidence That Focal Adhesion Complexes Power Bacterial Gliding Motility. *Science* 315(5813):853-856.
- Morgan AD, MacLean RC, Hillesland KL & Velicer GJ (2010) Comparative analysis of myxococcus predation on soil bacteria. *Applied and environmental microbiology* 76(20):6920-6927.
- Muller FD, Schink CW, Hoiczky E, Cserti E & Higgs PI (2012) Spore formation in *Myxococcus xanthus* is tied to cytoskeleton functions and polysaccharide spore coat deposition. *Molecular microbiology* 83(3):486-505.
- Nan B, Bandaria JN, Guo KY, Fan X, Moghtaderi A, Yildiz A & Zusman DR (2015) The polarity of myxobacterial gliding is regulated by direct interactions between the gliding motors and the Ras homolog MglA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(2):E186-E193.
- Nan B, Bandaria JN, Moghtaderi A, Sun IH, Yildiz A & Zusman DR (2013) Flagella stator homologs function as motors for myxobacterial gliding motility by moving in helical trajectories. 110(16):E1508-E1513.
- Nan B, Chen J, Neu JC, Berry RM, Oster G & Zusman DR (2011) Myxobacteria gliding motility requires cytoskeleton rotation powered by proton motive force. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(6):2498-2503.
- Nan B, Mauriello EM, Sun IH, Wong A & Zusman DR (2010) A multi-protein complex from *Myxococcus xanthus* required for bacterial gliding motility. *Molecular microbiology* 76(6):1539-1554.
- Nesper J, Hill CMD, Paiment A, Harauz G, Beis K, Naismith JH & Whitfield C (2003) Translocation of Group 1 Capsular Polysaccharide in *Escherichia coli* Serotype K30. *Journal of Biological Chemistry* 278(50):49763-49772.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(22):8203-8208.
- Niu T, Guo L, Luo Q, Zhou K, Yu W, Chen Y, Huang C & Xiao Y (2020) Wza gene knockout decreases *Acinetobacter baumannii* virulence and affects Wzy-dependent capsular polysaccharide synthesis. *Virulence* 11(1):1-13.
- O'Connor KA & Zusman DR (1991) Behavior of peripheral rods and their role in the life cycle of *Myxococcus xanthus*. *Journal of bacteriology* 173(11):3342-3355.

- Obino D & Duménil G (2019) The Many Faces of Bacterium-Endothelium Interactions during Systemic Infections. *Microbiology Spectrum* 7(2).
- Page R, Peti W, Wilson IA, Stevens RC & Wuthrich K (2005) NMR screening and crystal quality of bacterially expressed prokaryotic and eukaryotic proteins in a structural genomics pipeline. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(6):1901-1905.
- Paiment A, Hocking J & Whitfield C (2002) Impact of Phosphorylation of Specific Residues in the Tyrosine Autokinase, Wzc, on Its Activity in Assembly of Group 1 Capsules in *Escherichia coli*. 184(23):6437-6447.
- Pan H, He X, Lux R, Luan J & Shi W (2013) Killing of *Escherichia coli* by *Myxococcus xanthus* in aqueous environments requires exopolysaccharide-dependent physical contact. *Microbial ecology* 66(3):630-638.
- Patryn J, Allen K, Dziewanowska K, Otto R & Hartzell PL (2010) Localization of MglA, an essential gliding motility protein in *Myxococcus xanthus*. 10.1002/cm.20447:NA-NA.
- Perez-Burgos M, Garcia-Romero I, Jung J, Valvano MA & Sogaard-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. *Molecular microbiology* 112(4):1178-1198.
- Pollitt E J G & Diggle S P (2017) Defining motility in the *Staphylococci*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 74(16):2943-2958.
- Pugsley A P (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiological reviews* 57(1):50-108.
- Raetz C R H & Whitfield C (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual review of biochemistry* 71:635-700.
- Reeves P P & Wang L (2002) Genomic organization of LPS-specific loci. *Curr Top Microbiol Immunol* 264(1):109-135.
- Reid A N & 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. 187(15):5470-5481.
- Rodriguez A M & Spormann A M (1999) Genetic and molecular analysis of cglB, a gene essential for single-cell gliding in *Myxococcus xanthus*. *Journal of bacteriology* 181(14):4381-4390.
- Rosenberg E, Keller K H & Dworkin M (1977) Cell density-dependent growth of *Myxococcus xanthus* on casein. *Journal of bacteriology* 129(2):770-777.
- Rosenstein N E, Perkins B A, Stephens D S, Popovic T & Hughes J M (2001) Meningococcal Disease. *New England Journal of Medicine* 344(18):1378-1388.
- Rudel T, Scheuerpflug I & Meyer T F (1995) *Neisseria* PilC protein identified as type-4 pilus tip-located adhesin. *Nature* 373(6512):357.
- Salim T, Islam L M, Nicolas Y, Jolivet, Akeisha M, Belgrave, Betty Fleuchot, Gael Bresseur, Laura M. Faure, Gaurav Sharma, David J. Lemon, Fares Saïdi, Jean-Bernard Fiche, Benjamin P. Bratton, Mitchell Singer, Anthony G. Garza, Marcelo Nollmann, Joshua W. Shaevitz, Tâm Mignot (2020) Integrin-like adhesins secreted at bacterial focal adhesions mediate gliding motility. *Nature communication*.

- Shi W, Ngok FK & Zusman DR (1996) Cell density regulates cellular reversal frequency in *Myxococcus xanthus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(9):4142-4146.
- Shi W & Zusman DR (1993) The two motility systems of *Myxococcus xanthus* show different selective advantages on various surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(8):3378-3382.
- Shimkets L & Seale TW (1975) Fruiting-body formation and myxospore differentiation and germination in *Myxococcus xanthus* viewed by scanning electron microscopy. *Journal of bacteriology* 121(2):711-720.
- Shimkets LJ (1990) Social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol Rev* 54(4):473-501.
- Singh BN (1947) Myxobacteria in Soils and Composts; their Distribution, Number and Lytic Action on Bacteria. *Journal of general microbiology* 1(1):1-10.
- Slabinski L, Jaroszewski L, Rychlewski L, Wilson IA, Lesley SA & Godzik A (2007) XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability. *Bioinformatics* 23(24):3403-3405.
- Smith SGJ, Mahon V, Lambert MA & Fagan RP (2007) A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS microbiology letters* 273(1):1-11.
- Stephens DS, Greenwood B & Brandtzaeg P (2007) Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *The Lancet* 369(9580):2196-2210.
- Sun M, Wartel M, Cascales E, Shaevitz JW & Mignot T (2011) Motor-driven intracellular transport powers bacterial gliding motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(18):7559-7564.
- Suresh Kumar A, Mody K & Jha B (2007) Bacterial exopolysaccharides – a perception. *Journal of basic microbiology* 47(2):103-117.
- Szadkowski D, Harms A, Carreira LAM, Wigbers M, Potapova A, Wuichet K, Keilberg D, Gerland U & Sogaard-Andersen L (2019) Spatial control of the GTPase MglA by localized RomR-RomX GEF and MglB GAP activities enables *Myxococcus xanthus* motility. *Nature microbiology* 4(8):1344-1355.
- Treuner-Lange A, Macia E, Guzzo M, Hot E, Faure LM, Jakobczak B, Espinosa L, Alcor D, Ducret A, Keilberg D, Castaing JP, Lacas Gervais S, Franco M, Sogaard-Andersen L & Mignot T (2015) The small G-protein MglA connects to the MreB actin cytoskeleton at bacterial focal adhesions. *210(2):243-256.*
- Trudeau KG, Ward MJ & Zusman DR (1996) Identification and characterization of FrzZ, a novel response regulator necessary for swarming and fruiting-body formation in *Myxococcus xanthus*. *Molecular microbiology* 20(3):645-655.
- Van Den Ent F & Löwe J (2006) RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 67(1):67-74.
- Vera L, Czarny B, Georgiadis D, Dive V & Stura EA (2011) Practical Use of Glycerol in Protein Crystallization. *Crystal Growth & Design* 11(7):2755-2762.
- Vieusseux M (1805) Mémoire sur la maladie qui a régné a Genève au printemps de 1805. *J Med Chir Pharmacol* 11(163):2.
- Virji M, Heckels JE, Potts WJ, Hart CA & Saunders JR (1989) Identification of epitopes recognized by monoclonal antibodies SM1 and SM2 which react with all pili of *Neisseria gonorrhoeae*

- but which differentiate between two structural classes of pili expressed by *Neisseria meningitidis* and the distribution of their encoding sequences in the genomes of *Neisseria spp.* *Journal of general microbiology* 135(12):3239-3251.
- Ward MJ, Mok KC, Astling DP, Lew H & Zusman DR (1998) An ABC transporter plays a developmental aggregation role in *Myxococcus xanthus*. *Journal of bacteriology* 180(21):5697-5703.
- Wartel M, Ducret A, Thutupalli S, Czerwinski F, Le Gall AV, Mauriello EM, Bergam P, Brun YV, Shaevitz J & Mignot T (2013) A versatile class of cell surface directional motors gives rise to gliding motility and sporulation in *Myxococcus xanthus*. *PLoS biology* 11(12):e1001728.
- Weichselbaum A (1887) *Ueber die Aetiologie der akuten Meningitis cerebro-spinalis. na*,
- Weinberg RA & Zusman DR (1989) Evidence that the *Myxococcus xanthus* frz genes are developmentally regulated. *Journal of bacteriology* 171(11):6174-6186.
- Whitney JC & Howell PL (2013) Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends in microbiology* 21(2):63-72.
- Wilkens S (2015) Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep* 7:14-14.
- Wolgemuth C, Hoiczky E, Kaiser D & Oster G (2002) How Myxobacteria Glide. 12(5):369-377.
- Woodward R, Yi W, Li L, Zhao G, Eguchi H, Sridhar PR, Guo H, Song JK, Motari E, Cai L, Kelleher P, Liu X, Han W, Zhang W, Ding Y, Li M & Wang PG (2010) In vitro bacterial polysaccharide biosynthesis: defining the functions of Wzy and Wzz. *Nature Chemical Biology* 6(6):418-423.
- Wu SS & Kaiser D (1995) Genetic and functional evidence that Type IV pili are required for social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Molecular microbiology* 18(3):547-558.
- Youderian P, Burke N, White DJ & Hartzell PL (2003) Identification of genes required for adventurous gliding motility in *Myxococcus xanthus* with the transposable element mariner. *Molecular microbiology* 49(2):555-570.
- Youderian P & Hartzell PL (2006) Transposon insertions of magellan-4 that impair social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Genetics* 172(3):1397-1410.
- Yu R & Kaiser D (2007) Gliding motility and polarized slime secretion. *Molecular microbiology* 63(2):454-467.
- Zhou T & Nan B (2017) Exopolysaccharides promote *Myxococcus xanthus* social motility by inhibiting cellular reversals. *Molecular microbiology* 103(4):729-743.
- Zusman DR, Scott AE, Yang Z & Kirby JR (2007) Chemosensory pathways, motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Nature reviews. Microbiology* 5(11):862-872.

7. ANNEXES

7.1 Donnée de SAXS

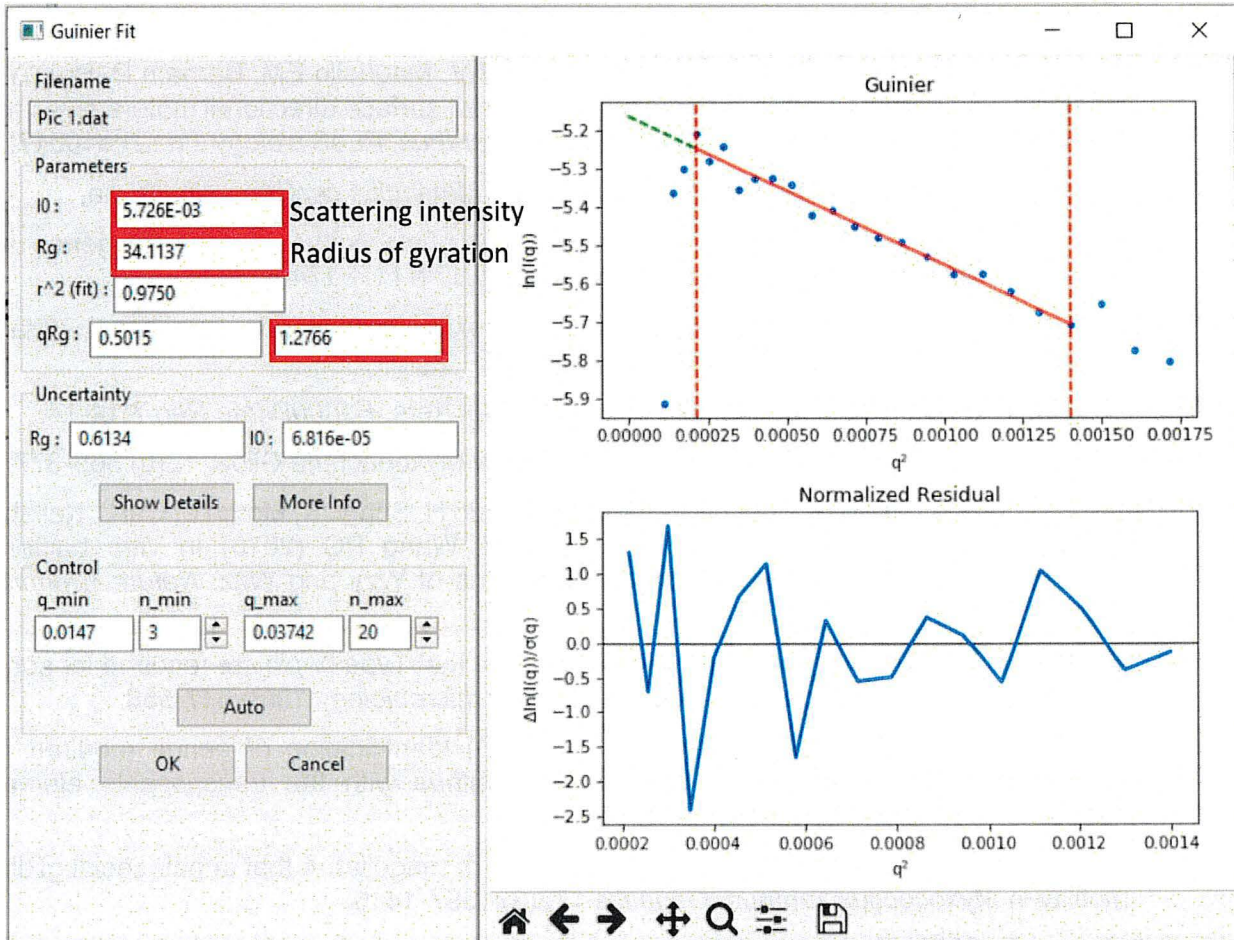


Figure 7.1-1 : Plot de Guinier du pic 1 de la protéine WzaS

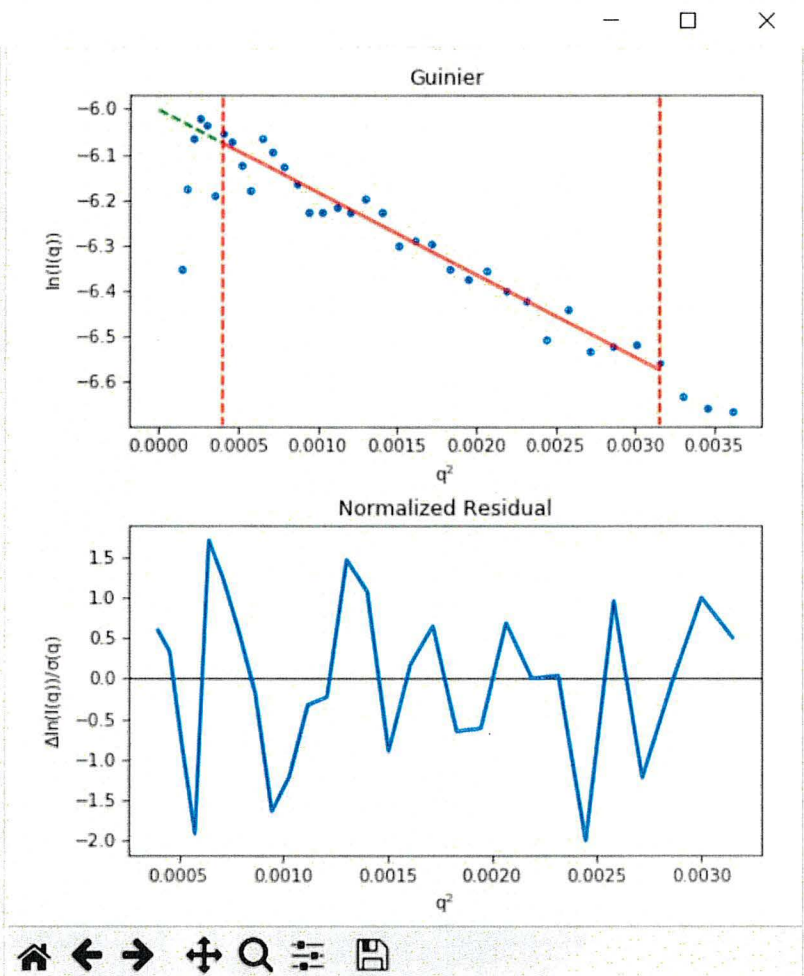
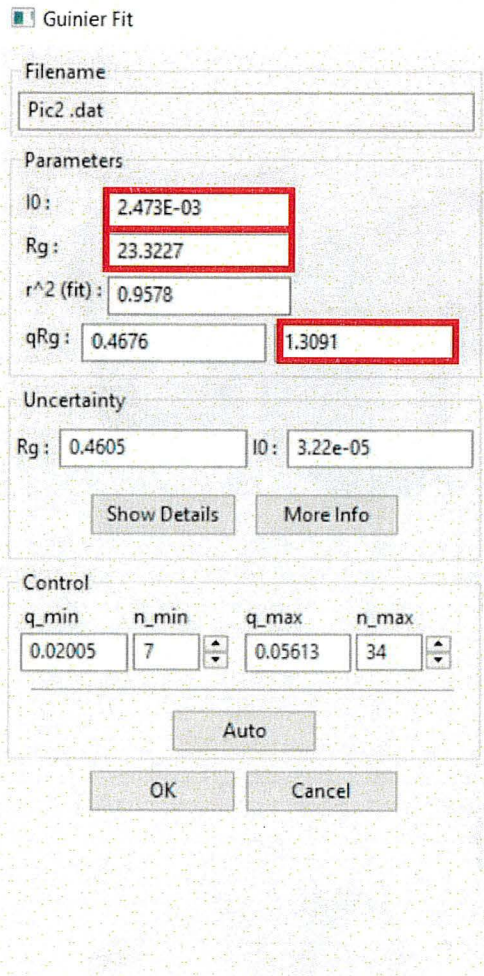


Figure 7.1-2 : Plot de Guinier du pic 2 de la protéine WzaS

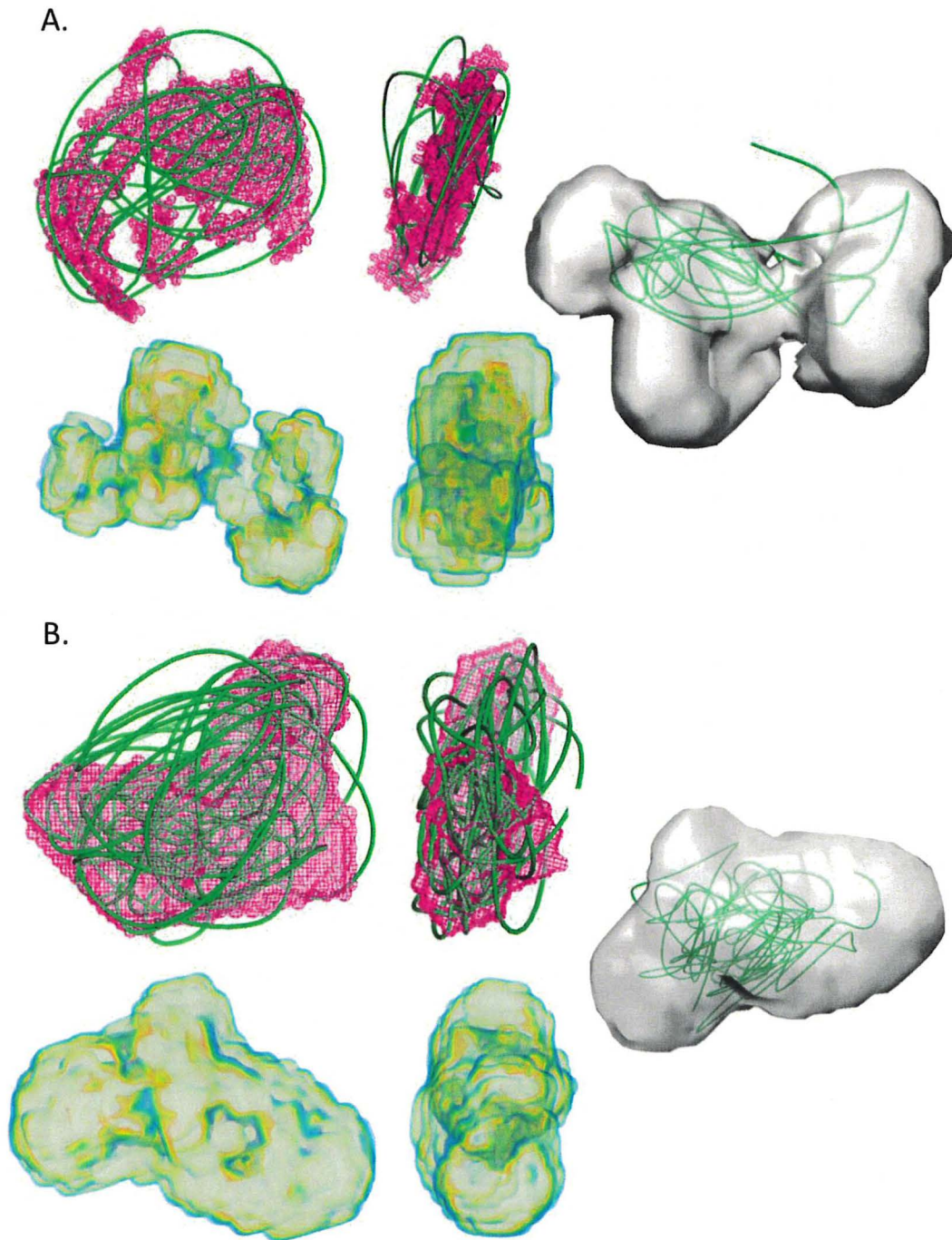


Figure 7.1-3 : Reconstruction en 3 dimensions selon la densité électronique ou selon le *bead model* de la protéine WzaS

Les reconstructions A et B correspondent respectivement les pics 1 et 2 présent sur le chromatogramme de SEC-MALS. En représentation cartoon (vert) : *Bead model* ; en mesh (magenta) : modèle en atome ; en volume (multi-couleur ou gris) : densité électronique (plus la couleur est intense, rouge, plus la densité est élevé). Tout à gauche est l'alignement entre la densité électronique avec le *bead* modèle