

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE D'ISOLATION DE LA  
MEMBRANE EXTERNE BACTERIENNE EN UTILISANT LA  
CYCLOADDITION 1,3-DIPOLAIRE DE HUISGEN

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

ISAAC VITA KIETO SUKA VITA

Août 2023

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers mon directeur de recherche, Salim Timo Islam, pour l'opportunité qu'il m'a donnée en acceptant un étudiant hors de l'Institut National de la Recherche Scientifique ainsi que Steve Bourgault, mon codirecteur. Leur disponibilité et leurs exigences m'ont permis de fournir un travail méticuleux et ayant plusieurs ouvertures dans le monde de la biotechnologie.

Durant ces deux années de maîtrise, les différents cours suivis m'ont permis d'avoir un regard plus critique sur les expériences et avancées concernant la biochimie, ce qui m'a donné l'amour pour la lecture d'articles scientifiques.

Fares, je te remercie de m'avoir guidé et encadré tout au long de cette maîtrise, oui, c'était difficile. Je me suis aperçu que la façon de faire en laboratoire est assez différente de ce que l'on apprend dans le cursus académique. Alors vraiment merci pour la patience et le mental que tu as fourni.

Nicolas, je te remercie également pour ta présence et ton assistance. Même si on était sur des projets différents, ton assistance et tes conseils m'ont appris à voir les choses dans la globalité plutôt que d'avoir une vision étroite de mon projet.

Enfin, j'aimerais remercier mes amis m'ayant soutenu surtout lorsque la fatigue commençait à prendre le dessus dans certaines situations.

Merci à mes parents pour tout votre soutien et d'avoir cru en moi.

## DÉDICACE

À mes parents et amis ainsi que toutes  
les personnes ayant participé de près ou  
de loin à la réalisation de ce projet.  
En signe d'amour et de reconnaissance  
Que Dieu vous bénisse.

Mets en l'Éternel ta confiance, et Il agira (Ps 37 :5)

# TABLES DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	V
LISTE DES TABLEAUX .....	V
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES .....	VI
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS .....	VII
RÉSUMÉ.....	VIII
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 .....	1
1.1 Architecture de l'enveloppe bactérienne .....	1
1.1.1 Les bactéries à Gram négatif et la membrane externe.....	3
1.1.2 Étude et marquage de la membrane externe.....	4
1.1.3 La chimie click.....	6
1.2 Les Techniques de purification protéique.....	7
1.2.1 L'ultracentrifugation différentielle.....	7
1.2.2 Gradient de sucrose.....	10
1.2.3 Dialyse .....	11
1.2.4 Isolation des vésicules de la membrane externe.....	13
1.2.5 Biotinylation des protéines de surface .....	14
1.3 La bactérie <i>Myxococcus xanthus</i> .....	17
1.3.1 Généralité.....	17
1.3.2 Motilité de type gliding.....	19
1.3.3 Motilité de type sociale.....	20
1.3.4 Le dynamisme de la membrane externe de <i>M. xanthus</i> .....	22
1.3.5 Lipopolysaccharide chez <i>M. xanthus</i> .....	23
1.4 Détail de la nouvelle technique.....	25
1.4.1 Problématique .....	26
1.4.2 Objectif de recherche .....	28
CHAPITRE 2 .....	29
2.1 Préparation de la culture cellulaire .....	29
2.2 Incorporation de 8-N <sub>3</sub> -Kdo.....	30
2.3 Isolation de la membrane externe.....	30
2.4 Électrophorèse sur gel .....	31
2.5 Détection de protéines .....	31
2.6 Test d'agrégation.....	32
2.7 Détection d'EPS par marquage avec le Trypan bleu .....	33
2.8 Test de motilité.....	33
CHAPITRE 3 .....	35
3.1 Isolation de la membrane externe de <i>Myxococcus xanthus</i> DZ2 OMss-mCherry suite à l'ajout de 8-N <sub>3</sub> -Kdo .....	35
3.1.1 Conditions initiales .....	35
3.1.2 Comparaison des effets produits lorsque la chimie click a lieu à 4 °C versus 10 °C .....	38

3.1.3 Comparaison des effets produits lors que la chimie click a lieu à 4 °C versus 37 °C .....	40
3.1.4 Comparaison des effets produits lors que la sonification se fait avant ou après la chimie click .....	42
3.1.5 Comparaison des effets produits lors que les tampons de lavages et la température de la chimie click sont modifiés .....	43
3.2 Isolation de la membrane d'une souche de <i>Myxococcus xanthus</i> exprimant AgmU-mCherry suite à l'ajout de 8-N <sub>3</sub> -Kdo. ....	44
3.3 Comparaison phénotypique après l'ajout de 8-N <sub>3</sub> -Kdo chez <i>Myxococcus xanthus</i> $\Omega$ pilA. ....	47
3.4 Test d'agrégation sur un mutant <i>Myxococcus xanthus</i> $\Omega$ pilA suite à l'ajout de 8-N <sub>3</sub> -Kdo. ....	48
3.5 Analyse de la production d'exopolysaccharide chez différentes souches de <i>Myxococcus xanthus</i> . ....	49
3.6 Test phénotypique basé sur la motilité sociale chez des souches mutantes de <i>Myxococcus xanthus</i> .....	51
CHAPITRE 4 .....	52
4.1 Purification axé sur un LPS modifié.....	52
4.2 Rôle et production d'EPS .....	55
4.3 Effet du 8-N <sub>3</sub> -Kdo sur la motilité sociale .....	56
4.4 Limites et optimisation de la nouvelle méthode .....	57
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	60
ANNEXE A.....	62
BIBLIOGRAPHIE .....	63

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1 COMPARAISON DES PAROIS BACTÉRIENNES À GRAM POSITIFS ET NÉGATIFS.....	2
FIGURE 1.2 INCORPORATION DU 8-N <sub>3</sub> -KDO SUR LE LPS D'UNE BACTÉRIE <i>E. COLI</i> .....	5
FIGURE 1.3 PRINCIPE DE LA CHIMIE CLICK VIA LES PRINCIPALES VOIES ET MARQUAGE MÉTABOLIQUE. ....	7
FIGURE 1.4 PRINCIPE DE LA CENTRIFUGATION DIFFÉRENTIELLE.....	9
FIGURE 1.5 ANALYSE D'UNE FRACTION D'ORGANITE APRÈS CENTRIFUGATION PAR GRADIENT DE SUCROSE. ....	11
FIGURE 1.6 DIALYSE D'UNE PROTÉINE. ....	13
FIGURE 1.7 PROTOCOLE D'ISOLATION DES VÉSICULES DE LA MEMBRANE EXTERNE..	14
FIGURE 1.8 RÉACTION MÉDIÉE PAR LA PROTÉINE LIGASE DE BIOTINE. ....	16
FIGURE 1.9. CYCLE DE VIE COMPLET DE <i>MYXOCOCCUS XANTHUS</i> . ....	18
FIGURE 1.10 LES DIFFÉRENTES MOTILITÉS ET PHÉNOTYPES DES <i>MYXOCOCCUS XANTHUS</i> . ....	19
FIGURE 1.11 ILLUSTRATION DE LA MOTILITÉ « <i>GLIDING</i> » CHEZ LES <i>M. XANTHUS</i> .....	20
FIGURE 1.12 ILLUSTRATION DE LA MOTILITÉ SOCIALE. ....	22
FIGURE 1.14 STRUCTURE CHIMIQUE DU 8-N <sub>3</sub> -KDO.....	26
FIGURE 2.1 PROTOCOLE D'ISOLATION DE LA MEMBRANE EXTERNE VIA DES BILLES MAGNÉTIQUES. ....	31
FIGURE 3.1 ANALYSE SDS-PAGE ET COLORATION À L'ARGENT DE L'ISOLATION MEMBRANAIRE DE <i>MYXOCOCCUS XANTHUS</i> DZ2 OMSS-MCHERRY APRÈS L'AJOUT DE 8-N <sub>3</sub> -KDO. ....	37
FIGURE 3.2 ANALYSE SDS-PAGE ET COLORATION À L'ARGENT DE L'ISOLATION MEMBRANAIRE VIA UN PROTOCOLE MODIFIÉ DE <i>MYXOCOCCUS XANTHUS</i> DZ2 OMSS-MCHERRY APRÈS L'AJOUT DE 8-N <sub>3</sub> -KDO. ....	39
FIGURE 3.3 ANALYSE SDS-PAGE ET COLORATION À L'ARGENT DE L'ISOLATION MEMBRANAIRE VIA UN PROTOCOLE MODIFIÉ LORS DE LA CHIMIE CLICK DE <i>MYXOCOCCUS XANTHUS</i> DZ2 OMSS-MCHERRY APRÈS L'AJOUT DE 8-N <sub>3</sub> -KDO.....	41
FIGURE 3.4 ANALYSE SDS-PAGE DE L'ISOLATION MEMBRANAIRE VIA UN PROTOCOLE MODIFIÉ LORS DE LA SONICATION DE <i>MYXOCOCCUS XANTHUS</i> DZ2 OMSS-MCHERRY APRÈS L'AJOUT DE 8-N <sub>3</sub> -KDO.....	43

FIGURE 3.5 ANALYSE SDS-PAGE DE L'ISOLATION MEMBRANAIRE VIA UN PROTOCOLE MODIFIÉ LORS DU LAVAGE DE <i>MYXOCOCCUS XANTHUS</i> DZ2 OMSS-MCHERRY APRÈS L'AJOUT DE 8-N <sub>3</sub> -KDO.....	44
FIGURE 3.6 ANALYSE SDS-PAGE ET COLORATION À L'ARGENT DE L'ISOLATION MEMBRANAIRE DE <i>MYXOCOCCUS XANTHUS</i> AGMU-MCHERRY APRÈS L'AJOUT DE 8-N <sub>3</sub> -KDO. ....	46
FIGURE 3.7 EFFET PHÉNOTYPIQUE DU 8-N <sub>3</sub> -KDO CHEZ <i>M. XANTHUS</i> ΩPILA .....	48
FIGURE 3.8 ANALYSE DE L'AGRÉGATION D'UNE SOUCHE MUTANTE <i>MYXOCOCCUS XANTHUS</i> ΩPILA APRÈS L'AJOUT DE 8-N <sub>3</sub> -KDO.....	49
FIGURE 3.9 PROPORTION D'EXOPOLYSACCHARIDE FIXÉ PAR LE TRYPAN BLEU CHEZ LES SOUCHES WT ET ΩPILA DE <i>M. XANTHUS</i> . ....	50
FIGURE 3.10 IMAGE ILLUSTRANT LA MOTILITÉ SOCIALE (T4P) À 72 H.....	52
FIGURE 3.11 SCHÉMAS RÉSUMÉ REPRÉSENTANT LA SUCCESSION DES ÉTAPES MODIFIÉES/OPTIMISÉES LORS DE LA SÉPARATION DES MEMBRANES EXTERNES ET DES BILLES RÉACTIVES DBCO ATTACHÉES AU 8-N <sub>3</sub> -KDO.....	52
FIGURE S1. IMAGE ILLUSTRANT LA MOTILITÉ DE TYPE <i>GLIDING</i> À 24 H CHEZ <i>MYXOCOCCOCUS XANTHUS</i> . ....	62



## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1 LES DIFFÉRENCES ENTRE LES CATÉGORIES DE CENTRIFUGATION.....	8
TABLEAU 2.1 SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES. ....	29
TABLEAU 2.2 COMPOSITION DES MILIEUX UTILISÉS.....	34

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

BPS : polysaccharide biosurfactant

DBCO : dibenzocyclooctyne

DO : densité optique

*E. coli* : *Escherichia coli*

EPS : exopolysaccharide

Kdo : acide 3-désoxy-D-manno-oct-2-ulosonique

LPS : lipopolysaccharide

ME : membrane externe

*mrpB* : régulateur de la protéine B chez *Myxococcus*

*mrpC* : régulateur de transcription chez *Myxococcus*

*M. xanthus* : *Myxococcus xanthus*

VME : vésicules de membrane externe

OMS : Organisation mondial de la santé

*pilA* : sous-unité principal des pili de type IV

TraA : récepteur impliqué dans l'échange de la membrane externe

T4P : pilus de type IV

WT : wild type (*souche sauvage*)

## LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

kDa : kilo-Dalton

m/s : mètres par seconde

g/cm<sup>3</sup> : masse volumique

mg : milligramme

nm : nanomètre

g : gramme

°C : degrés Celsius

## RÉSUMÉ

Chez les bactéries, la surface cellulaire joue un rôle crucial. En effet, c'est la partie de la cellule qui interagit le plus avec l'environnement externe. Cette surface est tapissée de nombreux composants indispensables tels que des molécules de lipopolysaccharide (LPS) et des protéines. Les molécules de LPS se situent dans le feuillet externe de la membrane externe (ME) et gèrent des interactions importantes avec d'autres organismes dans les communautés et au niveau de la cellule. Ils jouent un rôle crucial dans l'intégrité structurelle de la bactérie, dans la communication entre cellules et dans la pathogénèse. Ce sont notamment l'extraction des molécules de LPS que nous ciblons dans notre étude comme elles l'ont déjà été auparavant (Dumont *et al.*, 2012). Cependant, le recours aux molécules de LPS lors de techniques de purification protéique n'est pas d'une efficacité sans faille. Dans cette recherche, nous avons opté pour une bactérie à Gram négatif, donc possédant une membrane double où le sucre attaché au lipide A du LPS est l'acide 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonique (Kdo). Dans les techniques standard de purification protéique, il y a fréquemment de la contamination de la fraction ME, par exemple du fait de la mauvaise séparation des deux membranes ou alors du fait d'une isolation non représentative de toute la membrane. C'est dans cette optique qu'en utilisant une espèce bactérienne modèle (*Myxococcus xanthus*), une méthode d'extraction de la ME en utilisant la labellisation métabolique du lipopolysaccharide (LPS) a été développée impliquant une réaction de cycloaddition entre dibenzocyclooctyne (DBCO) dit « click » présent sur la surface des billes magnétiques et une molécule de 8-N<sub>3</sub>-Kdo intégré dans la molécule de LPS. Plusieurs paramètres (température d'incubation, nombre de lavages, ordre des étapes d'extraction) ont été évalués afin d'optimiser la méthode d'extraction. Mais c'est entre autres les gels SDS-PAGE montrant la présence de la mCherry fusionnée à une protéine qui ont permis de montrer que l'extraction de la ME sur la souche DZ2 OMss-mCherry fonctionne partiellement, en effet la majorité des gels montrent une absence du signal protéique. Une seconde souche *AgmU-mCherry* où le mCherry est associé avec le côté

périplasmique de la ME vient cependant confirmer que le protocole d'extraction développé est exclusif à la ME. Néanmoins, les résultats des SDS-PAGE montrent une non-spécificité des billes magnétiques associées au DBCO, il y a extraction avec et sans 8-N<sub>3</sub>-Kdo. Il en va sans dire que le caractère agrégatif provoqué par les pili et l'exopolysaccharide d'une souche modifiée DZ2 OMss-mCherry perturbe l'extraction et donc l'efficacité de cette nouvelle méthode. De plus, les résultats des tests d'agrégation et de marquage avec le trypan bleu montrent que l'incorporation du 8-N<sub>3</sub>-Kdo aux souches contribue de façon quantitative au rehaussement de cette agrégation et influence la motilité sociale des bactéries. Par ailleurs, différents paramètres sont testés et modifiés à travers ce document afin d'optimiser le rendement protéique après extraction. L'extraction membranaire nous amènerait à étudier le protéome de cette membrane externe.

Mots clés : Acide 3-désoxy-D-manno-oct-2-ulosonique (Kdo), Lipopolysaccharide, Membrane externe, *Myxococcus xanthus*, Protéines, Purification.

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

La purification de protéines consiste en la séparation d'une protéine d'un ensemble de biomolécules. Malgré la découverte des protéines en 1838 (Vickery, 1950) leurs études, caractérisation et éclaircissements sur leurs fonctionnalités sont mis en lumière au cours du XXe siècle (McNamara, 2005). La purification protéique est la première étape permettant d'étudier les propriétés d'une protéine précise. De nombreuses méthodes ont déjà été élaborées et ont porté des résultats. Parmi elles, on y retrouve la chromatographie, l'ultracentrifugation, la dialyse ou encore la centrifugation par gradient de sucrose, mais toutes présentent des limites dans le coût, la reproductibilité ou tout simplement dans la réalisation de celles-ci.

### 1.1 Architecture de l'enveloppe bactérienne

La paroi est l'un des constituants essentiels de la bactérie. Elle permet à la bactérie de résister au choc osmotique, de résister à la lyse et lui donne une forme. On lui attribue pour rôle la perméabilité de la bactérie en laissant passer des petites molécules et sels minéraux, la motilité, et de servir comme site de fixation de certains bactériophages ainsi que son assistance dans l'action enzymatique (Chapot, 1996). L'architecture de l'enveloppe bactérienne est bien établie. En premier lieu, on y retrouve la membrane cytoplasmique parsemée de protéines ainsi que de glycophospholipides et d'autres composants notamment des protéines membranaires intégrales et associées. En second, la paroi cellulaire est constituée de peptidoglycane puis la troisième et dernière couche est la membrane externe, une bicouche asymétrique. L'ensemble de ces structures contribuent au maintien de la forme, la stabilité et la rigidité de la cellule ainsi qu'à sa protection contre les éléments externes

(Holst *et al.*, 2010). Les cellules bactériennes se divisent en deux types dépendamment de leur architecture membranaire. Ces deux types sont mis en évidence par l'utilisation d'un colorant (figure 1.1). Cette méthode consiste en la coloration par traitement au Crystal violet puis l'iode en tant que mordant afin de faire apparaître les bactéries Gram positifs, une décoloration à l'alcool ainsi qu'une contre-coloration à la safranine pour révéler les bactéries Gram négatifs (Smith et Hussey, 2005).

Au niveau structural, les Gram positifs sont constitués principalement d'une large couche de peptidoglycan (occupant 90% de la paroi) où l'on retrouve des acides téchoïques et des acides lipotéchoïques permettant de maintenir la paroi bien que leurs mécanismes soient toujours inconnus (Saar-Doven, *et al.*, 2012). On retrouve ensuite la membrane. En revanche, les bactéries à Gram négatifs possèdent elles une couche de peptidoglycane beaucoup plus fine (occupant 10% de la paroi) et à défaut de retrouver des acides téchoïques et lipotéchoïques, on retrouve une membrane externe en amont de la paroi. Différentes techniques telles que la chromatographie ou encore l'ultracentrifugation sont des méthodes précurseurs à l'identification des composants de la paroi cellulaire ainsi que leurs attributs fonctionnels. Cependant, malgré les avancées, de nombreux champs restent à éclaircir tels que des mécanismes demandant de nouvelles méthodes encore plus poussées (Beveridge, 1999).

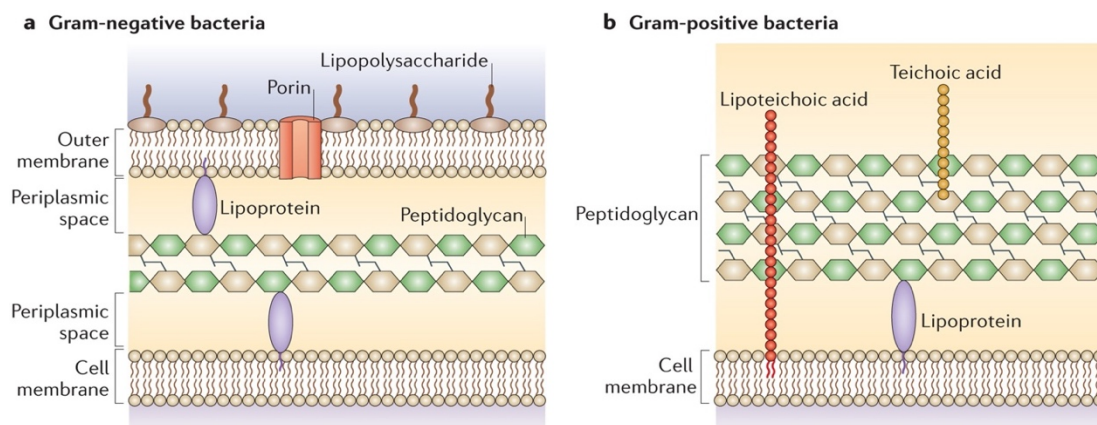


Figure 1.1 Comparaison des parois bactériennes à Gram positifs et négatifs.

Les bactéries Gram positives ont une épaisse couche de peptidoglycane parsemé d'acides lipotéchoïques, d'acides téchoïques, de glycoprotéines ainsi que de

polysaccharides. Leurs membranes cytoplasmiques ont des lipoprotéines. Les bactéries Gram négatives, elles, ont une membrane externe asymétrique à deux feuillets. Une externe contenant des molécules de LPS et des phospholipides et une périplasmique où l'on retrouve des lipoprotéines interagissant avec les chaînes de peptidoglycane situées dans l'espace périplasmique. On retrouve ensuite la membrane cytoplasmique (Brown *et al.*, 2015).

### 1.1.1 Les bactéries à Gram négatif et la membrane externe

Comme énoncé précédemment, la structure des bactéries Gram négatives diffère de celle de Gram positifs par la composition de leur paroi. Mise à part la proportion de peptidoglycane, la différence majeure se pose sur la présence d'une membrane externe (ME), une bicouche lipidique, ayant un feuillet périplasmique et un feuillet externe (Albers et Meyer, 2011). Par sa composition, la ME joue un rôle général de barrière, ainsi qu'un rôle dans la diffusion pour la nutrition de la bactérie et la dissémination des déchets (Beveridge, 1999). Le dynamisme de la membrane externe est assez particulier. En effet, les molécules de lipopolysaccharide (LPS) se trouvant dans le feuillet externe sont responsables du choc endotoxique lorsque le système immunitaire est face à une infection (Whitfield, 2002). Hormis les molécules de LPS, la ME contient également des protéines. Ces protéines sont soit des lipoprotéines, soit des protéines intégrales. Les lipoprotéines sont ancrées à la membrane via la formation d'une liaison covalente entre le résidu cystéine amino-terminal et le groupement polaire d'un phospholipide. Les protéines intégrales ont une conformation de tonneau- $\beta$  permettant la diffusion passive d'ions ou d'acides aminés à travers la membrane externe (Silhavy *et al.*, 2010). Hormis les protéines on y retrouve aussi des porines. Tous ces composants de la ME sont synthétisés dans le cytoplasme ou dans le feuillet interne de la membrane interne. Les composants de la ME sont ensuite transportés à travers le périplasma aqueux visqueux et assemblés dans une bicouche lipidique asymétrique. Les protéines (glycoprotéines) destinées au périplasma ou à la ME sont fabriquées sous une forme précurseur contenant un peptide signal à l'extrémité amino-terminale, les ciblant pour une translocation à travers la membrane interne à partir du



cytoplasme. On voit donc le dynamisme s'opérant autour de la membrane externe et l'implication des protéines membranaires dans divers mécanismes de la bactérie (Driessen et Nouwen, 2008).

### 1.1.2 Étude et marquage de la membrane externe

Du fait de la composition de sa surface, la ME est la cible parfaite des antibiotiques tel que la famille des peptidomimétiques macrocycliques prenant pour cible la protéine LptD, par exemple, chez la *Pseudomonas* spp. Ces composés inhibent le transport des LPS dans la biogenèse de la membrane externe (Urfer *et al.*, 2016), d'où l'importance d'en connaître la composition afin de comprendre le fonctionnement de cette barrière. De ce fait, diverses méthodes sont élaborées permettant de visualiser, d'isoler et/ou d'étudier cette membrane.

Dans ce contexte, les MEs Gram négatives sont marquées par le biais de protéines fluorescentes puis visualisées par microscopie confirmant ou non le marquage comme dans l'étude portée par Nilsson (Nilsson *et al.*, 2020). Précédemment des méthodes de marquage impliquant des colorants de coloration cellulaire fluorescents tel un ester succinimidilique (NHS ester) -Alexa fluor 488 rouges étaient utilisés afin de marquer les protéines de la ME. Les cellules marquées sont ensuite détectées par microscopie en utilisant soit un filtre isothiocyanate de fluorescéine (excitation 470 nm, émission 530 et 550 nm) soit un filtre rhodamine (excitation 595 nm, émission 615 nm). Un autre procédé impliquant des protéines lectine permet aussi le marquage. En effet, elles interfèrent avec les glucides de la surface bactérienne et s'y adhèrent (Hartmann et Lindhorst, 2011). Dans la même optique, des Gram négatifs sont marqués par le biais d'un sucre exogène (8-N<sub>3</sub>-Kdo) suivi d'une réaction click catalysée avec un réactif fluorescent (Dumont *et al.*, 2012). Dans l'étude portée par Dumont *et al* en 2012 sur l'incorporation du Kdo dans la molécule de LPS bactérien (figure 1.2), la fluorescence observée sur des bactéries *E. coli* provient du marquage de 8-N<sub>3</sub>-Kdo sur la surface membranaire, plus précisément sur le LPS (Nilsson *et al.*,

2017). En effet, ils expliquent que le LPS est synthétisé dans le feuillet interne de la membrane interne, mais aussi que c'est dans le feuillet interne de la membrane interne que les molécules de Kdo sont incorporées dans des molécules de LPS (figure 1.2A). Après le transport au feuillet périplasmique de la membrane interne, ces glycolipides sont ensuite transportés à la surface des cellules (figure 1.2B). Par la suite, un fluorochrome vient réagir avec le groupement  $N_3$  du sucre exogène. En effet, les bactéries sont cultivées puis incubées avec un cyclooctyne associé à un fluorochrome, cette méthode permet le marquage des cellules grâce à la chimie click (Fugier *et al.*, 2015).

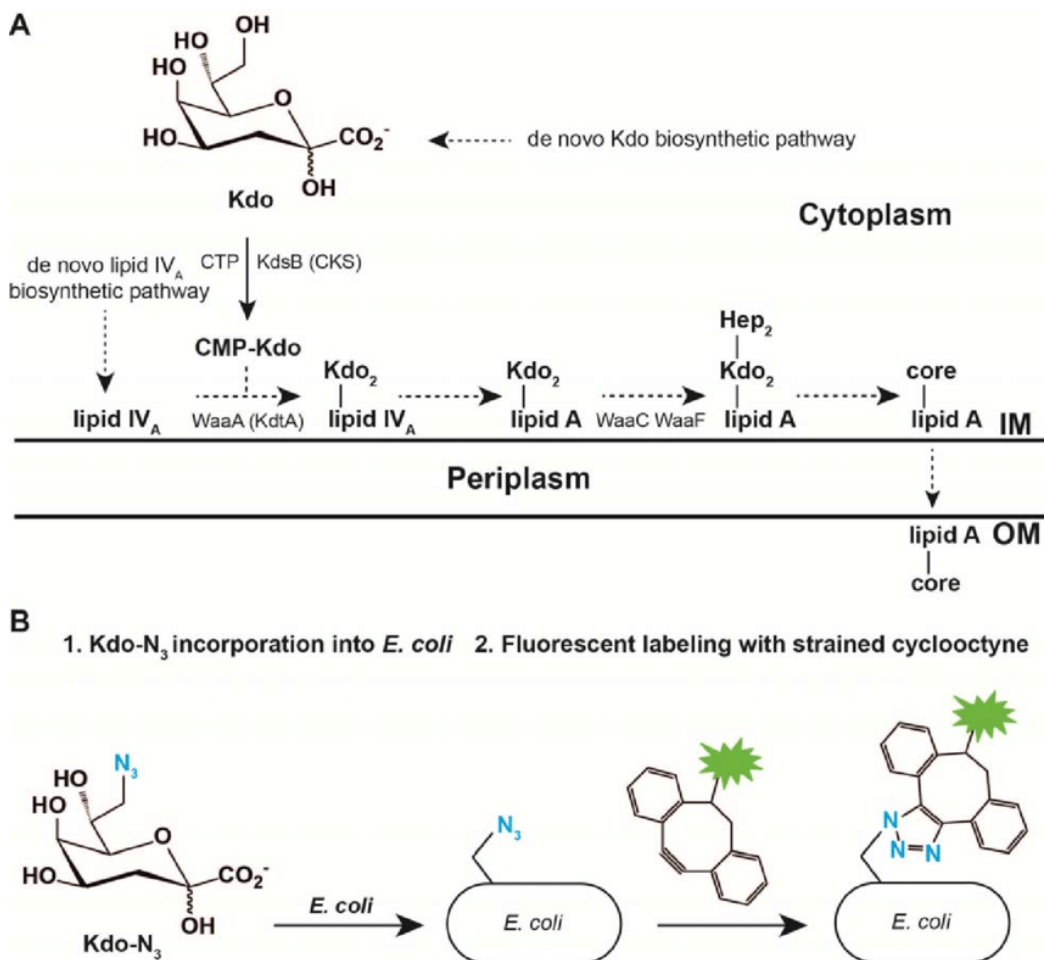


Figure 1.2 Incorporation du 8- $N_3$ -Kdo dans le LPS d'une bactérie *E. coli*.

A) Étape concernant la biosynthèse de lipide A. CMP : cytidine monophosphate, permet d'incorporer le Kdo au lipide A, les WaaF et WaaC ajoutent les différents

heptoses. Le tout constitue la chaîne d'oligosaccharides. B) Marquage métabolique de 8-N<sub>3</sub>-Kdo. La méthode de chimie click utilisée est celle sans cuivre. Le cyclooctyne se lie à la triple liaison N<sub>3</sub>. Dans le cadre de mon étude, le DBCO est associé à des billes magnétiques et non un fluorochrome comme présenté dans le schéma (Nilsson *et al.*, 2017).

### 1.1.3 La chimie click

La chimie click est un procédé utilisé dans les domaines de la chimie, la biochimie et autre afin de synthétiser des molécules plus complexes telles que des réactions d'ouverture de cycle nucléophile d'époxydes et d'aziridines, des réactions carbonyles de type non aldol, la formation d'hétérocycles, des ajouts à des liaisons carbone-carbone, des réactions de formation d'époxydes et des réactions de cycloaddition (Kolb *et al.*, 2021). Il est aussi possible d'y avoir recours dans le but de synthétiser des médicaments (Kolb *et al.*, 2021). Il en existe plusieurs types, mais les trois classes les plus exploitées sont la réaction de cycloaddition azide-alcyne catalysée par Cu (I) (CuAAC), la réaction de cycloaddition azide-alcyne « SPAAC » acronyme de « *Strain Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition* » ainsi que la liaison tétrazine-alcène (figure 1.3). La réaction click la plus populaire est la cycloaddition 1,3-dipolaire entre des groupes azoture et alcynes, qui conduit à la formation d'un cycle. Cette chimie click porte le nom de « réaction de Huisgen ». Elle est notamment le point central de mon étude.

La réaction à laquelle nous avons eu recours est la cycloaddition d'azide-alcynes. À la place d'activer l'alcynes par du cuivre, l'alcynes est introduit dans un cyclooctyne, d'où le dérivé DBCO (dibenzocyclooctyne) (Fugier *et al.*, 2015). Il permet qu'une molécule A fonctionnalisée avec un azoture réagisse avec une fonction alcynes (molécule B) formant ainsi un conjugué stable A-B. Ici, la réaction de Huisgen se fait entre le groupement N<sub>3</sub> et le groupement DBCO associé aux billes (magnetic particles/CLK-A132-5). Dans le modèle Gram négatif utilisé (*M. xanthus*), le marquage métabolique de 8-N<sub>3</sub>-Kdo va s'incorporer au lipide A de l'organisme aux dépens du Kdo natif.

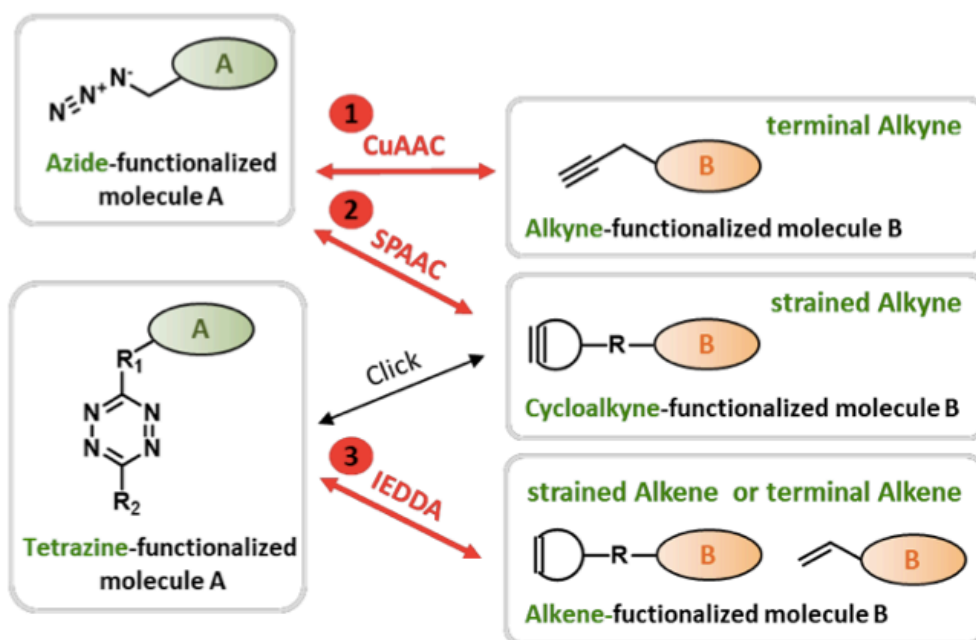


Figure 1.3 Principe de la chimie click via les principales voies et marquage métabolique.

Il y a deux branches dans la chimie click, celle utilisant le cuivre (CuI) et celle sans cuivre en utilisant une réaction alkyle « SPAAC ». La seconde est décrite comme étant la plus efficace. Une troisième voie s'appuie elle sur l'ajout d'alcène (Adapté de JenaBiocience, 2020).

## 1.2 Les Techniques de purification protéique

### 1.2.1 L'ultracentrifugation différentielle

La technique d'ultracentrifugation différentielle est une méthode très sollicitée dans l'optique de la séparation de LPS des autres macromolécules plasmiques (McPherson et Pincus, 2021). En effet, afin de sédimenter ces molécules, il faut créer une forte accélération ainsi que des forces dépassant les  $600\,000 \times g$  (Banerjee, 2008). Chaque composant d'un mélange a sa propre densité, ce qui veut dire qu'il faut une force, ou une accélération différente pour les isoler l'un de l'autre (figure 1.4). Contrairement à la centrifugation classique, l'ultracentrifugation différentielle permet d'isoler une catégorie plus vaste d'organite. L'usage de l'ultracentrifugation

dans le but d'isoler des protéines solubles par le biais de sel comme le sulfate d'ammonium fonctionne plus ou moins bien. Il faut préalablement diluer les solutions protéinées, mais la viscosité des protéines influencerait le temps de sédimentation de celles-ci (Chanell *et al.*, 2018). En effet, une viscosité élevée à de faibles gradients de vitesse empêche toute sédimentation.

Tableau 1.1 Les différences entre les catégories de centrifugation

	Basse vitesse	Haute-vitesse	Ultra/micro-ultra
Vitesse maximum (rpm x 10 <sup>3</sup> )	10	28	100/150
RCF maximum (x 10 <sup>3</sup> )	7	100	800/900
<b>Formation d'un culot</b>			
Bactérie	Oui	Oui	(Oui)
Cellule animale et végétale	Oui	Oui	(Oui)
Noyau	Oui	Oui	(Oui)
Précipités	Certains	La plupart	(Oui)
Fractions membranaires	Certains	Certains	Oui
Ribosomes/polysomes	-	-	Oui
Macromolécules	-	-	Oui
Virus	-	La plupart	Oui

(Adapté de Cole Parmer, 2018)

C'est cette méthode de centrifugation différentielle que Reimer *et al.* ont utilisée dans une étude visant à isoler des fragments membranaires appelés : vésicules de la membrane externe (VME) chez la bactérie *E. coli*. Leur étude avait pour but de comparer l'efficacité entre l'ultracentrifugation et l'ultrafiltration (une technique basée sur la concentration de nano et microparticule en suspension) afin d'isoler les VME. La méthode de séparation par ultracentrifugation différentielle permet d'isoler les VME après la 3<sup>e</sup> centrifugation, à savoir, dans le culot contenant les microsomes (figure 1.4). Il en ressort que bien que l'ultracentrifugation soit l'une des techniques conventionnelles les plus utilisées, son rendement concernant l'isolation des plus

petites VME n'est pas optimal (Reimer *et al.*, 2021). Tout comme son nom l'indique, la centrifugation différentielle permet d'isoler différents fragments d'un homogénat cellulaire dépendamment de la vitesse à laquelle le mélange est soumis (figure 1.4).

#### Analyse des avantages et désavantages des différents types de centrifugation

Contrairement à la centrifugation à basse vitesse et celle à haute vitesse, l'ultracentrifugation s'applique à tout type de composants et permet d'isoler tous les organites. Dû à sa vitesse élevée, une force de plus de  $80\,000 \times g$  pouvant être atteinte, cette technique permet d'aller chercher du plus petit virus jusqu'à la plus grosse bactérie (Tableau 1.1). Celle à haute vitesse est efficace, mais est restreinte du fait de la vitesse maximale de son rotor. En effet, les fractions de membranes sont partiellement isolables du fait de leur taille, tandis que les ribosomes et macromolécules sont hors de portée. La centrifugation à basse vitesse est utilisée pour les applications plus basiques (Cole Parmer, 2018).

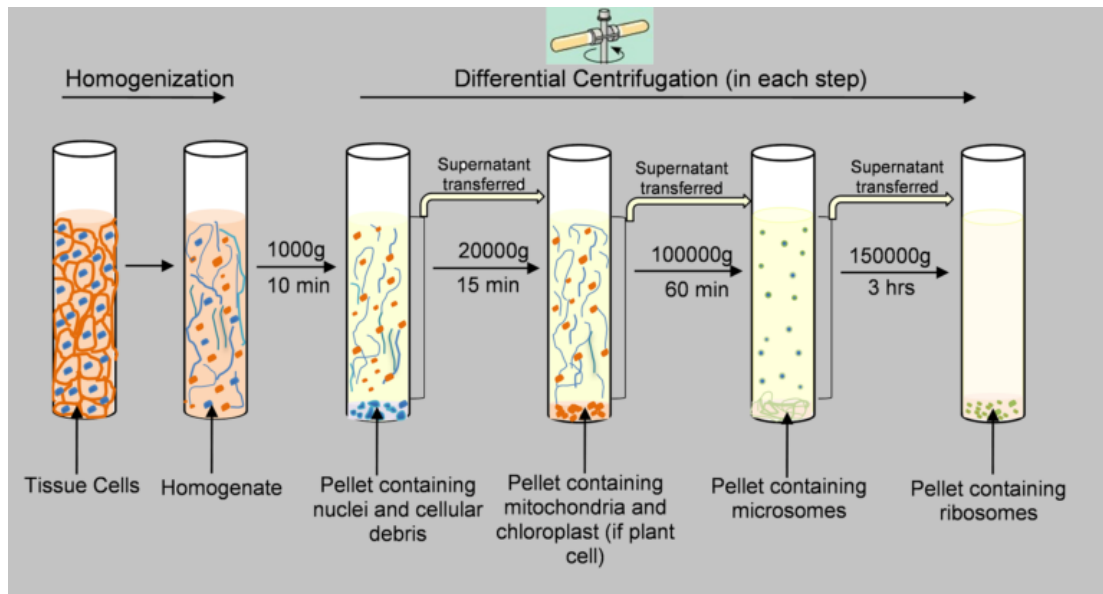


Figure 1.4 Principe de la centrifugation différentielle.

Lorsqu'un mélange est soumis à une centrifugation de  $1\,000 \times g$  durant 10 min, des cellules intactes et des noyaux se déposent au fond du tube et forment un premier

culot. Du fait de la sédimentation, ce culot est séparé du surnageant contenant les autres organites. Par la suite, le surnageant est centrifugé à une plus grande vitesse ( $20\,000 \times g$ ) durant 15 min afin d'obtenir un second culot, mais composé de mitochondries, lysosomes, etc. Ces différentes centrifugations peuvent être répétées jusqu'à l'obtention de l'organite attendu (Microbiologynote, 2022).

### 1.2.2 Gradient de sucrose

Avant de se focaliser sur la centrifugation par gradient de sucrose, il faut comprendre ce qu'est une centrifugation par gradient de densité. Cette méthode consiste à superposer au moins deux milieux différents dans un tube. Le milieu le plus dense se retrouve au fond du tube et le plus léger au-dessus de celui-ci. Le mélange est alors placé dans le tube et est centrifugé. Il y a deux types de centrifugation par gradient, mais celle qui nous intéresse est la centrifugation isopycnique. Les centrifugations isopycniques autrement dit par gradient de densité consistent en une seule et unique centrifugation durant laquelle les différents composants du mélange vont se retrouver soit dans le milieu le plus lourd donc au fond du tube (figure 1.5), soit dans la fraction supérieure du tube ou vers le milieu (Ajamian *et al.*, 2020). Des études ont montré que la méthode de séparation par gradient de sucrose afin d'isoler des protéines membranaires ne peut être considérée comme méthode complémentaire à l'ultracentrifugation étant donné les contaminations entre l'ARN, les protéines et les agrégats membranaires (Chiou et Ansel, 2016). En outre, il est important de limiter le temps entre le moment où le gradient est assemblé et celui où les tubes sont centrifugés. La diffusion normale détruira le gradient au fil du temps, et cela est accéléré s'il y a des vibrations sur la surface où le gradient est entreposé. À cause de nombreux facteurs tels que celui cité, cette méthode peut ne pas être suffisante pour localiser avec précision une protéine d'intérêt (Bermejo *et al.*, 2014). Un exemple de cette application est son utilisation par Kotarski et Salyers dans une étude visant à déterminer si certaines protéines de la membrane externe sont associées à la croissance de *Bacteroides thetaiotaomicron* sur les polysaccharides, ils ont développé une procédure pour séparer

les membranes externes des membranes internes par centrifugation à densité de sucrose (Kortaski et Salyers, 1984).

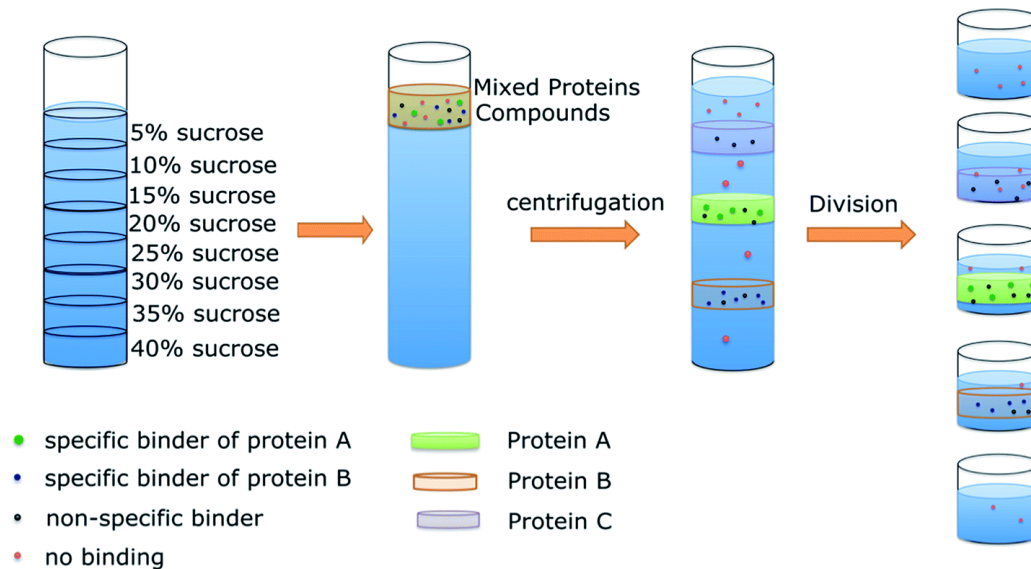


Figure 1.5 Analyse d'une fraction d'organite après centrifugation par gradient de sucrose.

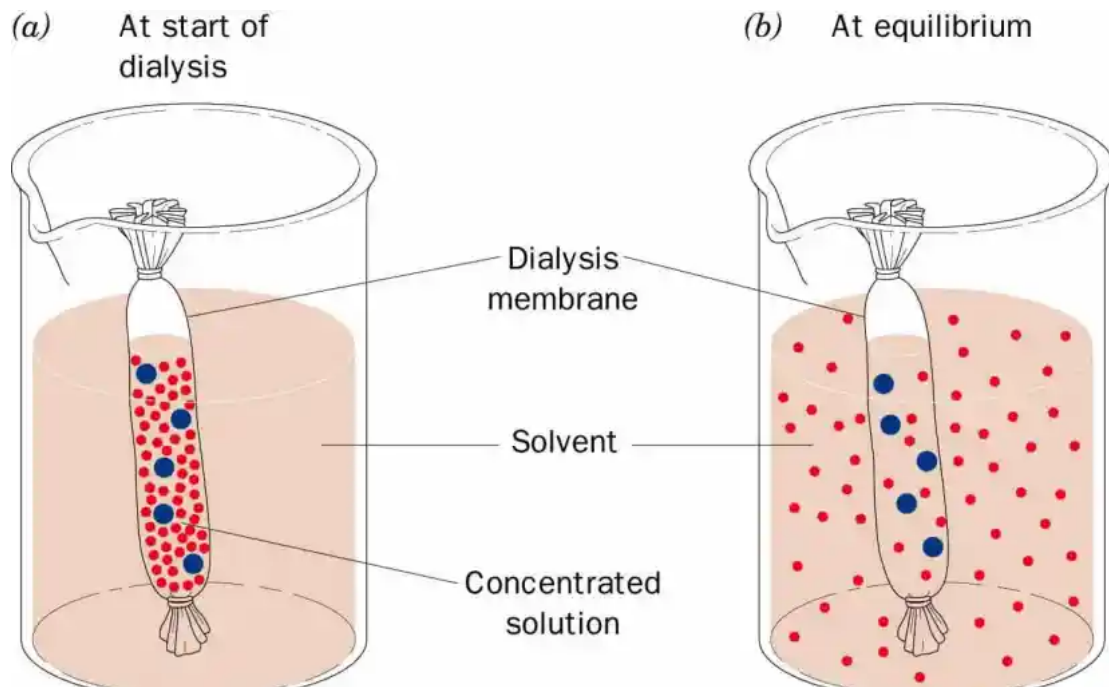
Le tube de gauche illustre la densité de sucrose qui s'accroît dans le fond du tube ainsi qu'un mélange de protéines déposé au-dessus du milieu. Une centrifugation s'ensuit et s'arrête lorsque tous les composés sont à l'équilibre. Les protéines les plus denses se retrouvent dans le fond du tube où le gradient de sucrose est le plus fort. Une fois les composants sédimentés, on peut alors les séparer (Adapté de Jin *et al.*, 2015)

### 1.2.3 Dialyse

En dehors du champ médical, la dialyse est une technique de purification impliquant une membrane poreuse dont la taille des pores varie, ainsi que différentes solutions appelées tampon de dialyse. Dépendamment de la taille des pores, des ions et des protéines pourront traverser de part et d'autre la membrane semi-perméable. La dialyse repose sur deux phénomènes : la diffusion et l'exclusion stérique (figure 1.6). La diffusion décrit la migration des molécules au travers de la membrane d'acétate de cellulose tandis que l'exclusion stérique met en avant la taille des molécules. La membrane ne laisse passer qu'une certaine taille de molécule (Bouderieux *et al.*, 2020).



La purification de protéines membranaires sollicite davantage l'exclusion stérique comme dans la désalination de protéines (Mendham et Toullec, 2005). Le seul défi de ce procédé est le temps. En effet, différentes méthodes sont pensées afin d'accélérer le processus telles que changer le tampon plusieurs fois. De plus, les éléments visqueux contenus dans un homogénat ont tendance à boucher les pores, ce qui ralentit la séparation (Bouderieux *et al.*, 2020). La dialyse a déjà été utilisée dans une étude portant sur l'extraction de protéines recombinantes (Hobb *et al.*, 2009). La dialyse a été effectuée à l'aide d'un sac de dialyse plissée *snakeskin* de 10 000 MWCO (Pierce) incluant de l'eau distillée à 4 °C avec deux ou trois changements de tampon sur une période de 48 h. Si nécessaire, les protéines étaient concentrées à l'aide de colonnes Centricon YM-3 afin d'obtenir un meilleur rendement.



#### Figure 1.6 Dialyse d'une protéine.

L'échantillon composé de protéines est placé dans un sac constitué d'une membrane semi-perméable. Le sac est ensuite placé dans un tampon de solution saline. La solution concentrée diffuse au travers de la membrane (le premier élément à diffuser est l'eau). Après plusieurs heures et plusieurs changements du tampon, il y a équilibre, signe de la fin de la dialyse. Le sac est alors retiré et contient la protéine purifiée pendant que d'autres molécules se retrouvent dans le tampon (Ing *et al.*, 2012).

#### 1.2.4 Isolation des vésicules de la membrane externe

Les vésicules de la membrane externe (VME) sont de petites vésicules sphériques sécrétées à la surface par les bactéries Gram négatives et permettent aux cellules d'interagir entre elles (Remis *et al.*, 2014). Ainsi, elles assurent un contact avec d'autres cellules intactes ou sont soit liées à la ME de cellules intactes par des protéines (Palsdottir *et al.*, 2009). Ces vésicules sont un moyen de transport pour les protéines membranaires, les adhésines, les toxines et les enzymes, ainsi que pour les LPS, qui se trouvent sur la surface de la ME (Jung *et al.*, 2017). Certaines études révèlent que ces VMEs secrètent des facteurs de virulence dans les cellules hôtes (Klimentová et Stulik, 2015). Des théories affirment que leur synthèse se fait à des niveaux de l'enveloppe où les liens protéiques unissant la membrane externe, le peptidoglycane (PG) et la membrane interne sont rompus ou alors que l'accumulation de PG dans le périplasme constituerait un autre mécanisme menant à la formation des VMEs. La littérature n'est cependant pas intransigeante à ce sujet, il faudrait réaliser des études plus approfondies afin de cibler les endroits où l'on retrouve le meilleur rendement de VME (Gaudin, 2012). L'isolement de VME comprend une étape de filtration à travers des pores de 0,22  $\mu\text{m}$  afin d'éviter la contamination de la portion ME obtenue avec la bactérie. L'inconvénient est que cela réduit le rendement de VME, puisque les plus grandes vésicules sont perdues par cette étape de filtration (Jung *et al.*, 2017). L'isolation des vésicules de la membrane n'est donc pas représentative de la quantité de protéines membranaire totale (figure 1.7). De plus, afin d'obtenir un rendement optimal, la culture ne doit pas atteindre la phase stationnaire tardive afin d'éviter la présence de bactéries lysées et de protéines contaminantes (Jung *et al.*, 2017). D'autres études ont

donc démontré que la présence de certaines protéines membranaires était enrichie dans les VMEs tandis que d'autres en sont totalement exclus ou même que certains mutants produisent beaucoup moins de vésicules que leurs types sauvages (Gaudin, 2012). Ce phénomène vient s'ajouter et montre l'aspect de la quantité non représentatif si l'on veut étudier une protéine en particulier, phénomène retrouvé dans une étude citée précédemment (Reimer *et al.*, 2021).

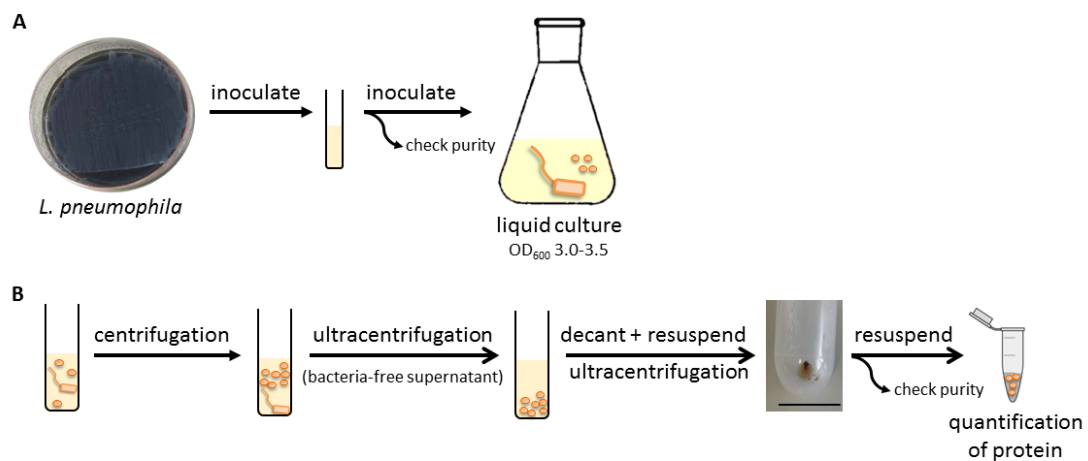


Figure 1.7 Protocole d'isolation des vésicules de la membrane externe.

Une culture de *L. pneumophila* est ensemencée dans une culture liquide puis fixée à une D.O. de 3,0. La culture liquide est centrifugée et stérilisée par filtration puis le surnageant subit une ultracentrifugation. Le culot de VME obtenu est ensuite resuspendu dans du PBS avant une seconde ultracentrifugation. Les VME sont isolés et quantifiés (Adapté de Jung *et al.*, 2017).

### 1.2.5 Biotinylation des protéines de surface

La biotine ou encore la vitamine H se trouve dans un premier plan à l'intérieur de notre organisme, elle se décrit comme étant une vitamine hydrosoluble (également dénommée vitamine B8, B7), coenzyme de 5 carboxylases qui interviennent dans de nombreux métabolismes. Elle est administrée pour traiter les maladies héréditaires du métabolisme (déficit en biotinidase, en holocarboxylase synthétase, maladie des noyaux gris centraux sensible à la biotine) (Piketty et Souberbielle, 2017). Elle possède

une haute affinité pour l'avidine et la streptavidine ( $K_d : 10^{-15}$ ), ce qui facilite le marquage des protéines et de ce fait certaines maladies graves et certaines tumeurs sont traitées et diagnostiquées par des protéines chimiquement biotinylées (utilisation d'avidine ou streptavidine). La biotinylation consiste au marquage à l'aide d'une biotine, marquage qui peut également se faire sur des protéines de surfaces membranaires. La biotinylation la plus connue est celle ayant recourt à la sulfo-NHS-SS-biotine procurant une liaison covalente entre un acide aminé et un résidu de biotine réactif afin de capturer et isoler les protéines marquées par la biotine à la surface de la cellule (Ye *et al.*, 2020). En ce qui concerne la biochimie, la purification protéique peut s'effectuer à l'aide de cette méthode (Kohanski, 2013). En effet, les cellules marquées par biotinylation sont lysées par sonication, puis après plusieurs traitements dont une incubation à 4 °C et une dialyse, les protéines biotinylées migrent sur un gel SDS-PAGE (Choi *et al.*, 2008). *In vivo*, des études ont rapporté la présence de protéines naturellement biotinylées chez certaines bactéries et explique leur synthèse en montrant que la biotine est activée par réaction avec l'adénosine triphosphate, libérant du pyrophosphate et du biotinyl-adénosine monophosphate. Le transfert de la biotine vers un groupe amino d'un résidu lysine spécifique dans la protéine receveuse est catalysé par la protéine ligase de biotine (Kohanski, 2013). On se retrouve alors avec une protéine biotinylée à sa lysine. Cependant, il a été observé que certains réactifs de biotinylation en dehors de sulfo-NHS (Kohanski, 2013), pénètrent dans la membrane plasmique et marquent de manière non spécifique les protéines (Zhang *et al.*, 2003). Une des méthodes importantes de biotinylation est la méthode ayant recourt à BirA (figure 1.8)

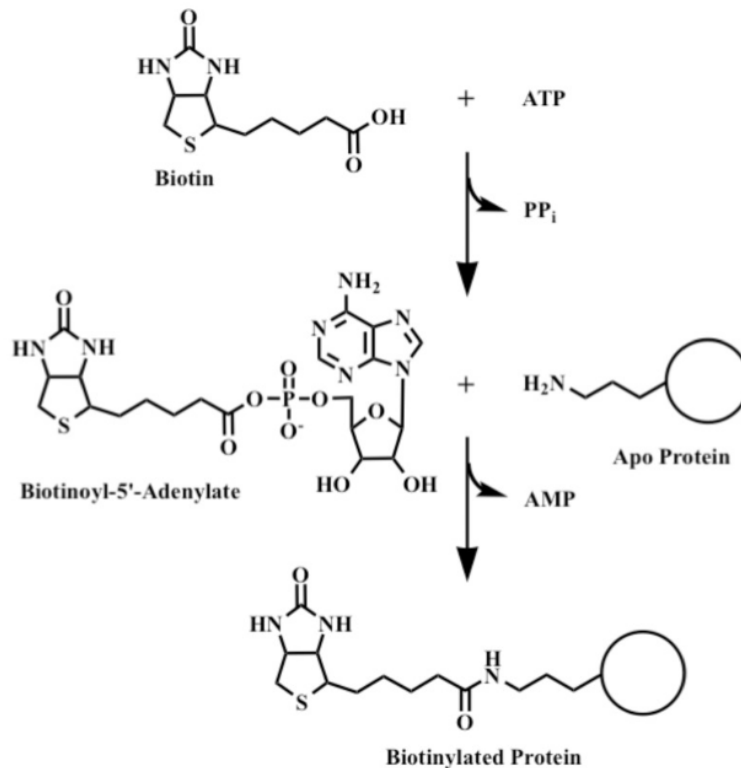


Figure 1.8 Réaction médiée par la protéine ligase de biotine.

La fixation de biotine se fait en deux étapes. D'abord, BirA lie la biotine et l'ATP pour synthétiser le Bio-59-AMP (biotinoyl-5'-adénylate) avec libération de pyrophosphate. Ensuite, le résidu lysine conservé de la protéine receveuse agit comme un nucléophile et attaque la liaison anhydride pour donner la protéine receveuse biotinylée et l'AMP (Henke et Cronan, 2014).

Même avec ces méthodes de purification il y a des contaminations ou des problèmes de séparation entre la MI et la ME. Il faudrait alors développer une méthode permettant d'isoler spécifiquement la ME et pour ce faire nous utilisons *M. xanthus*. C'est, en effet, le problème que nous avons rencontré avec notre modèle. Les techniques standard de purification permettent d'analyser la membrane, mais ne permettent pas une analyse représentative des protéines membranaires.

### 1.3 La bactérie *Myxococcus xanthus*

#### 1.3.1 Généralité

La *Myxococcus xanthus* est une  $\delta$  protéobactérie sociale se retrouvant dans les sols. En effet, des études ont révélé sa présence dans les sols et les caractérisent comme étant des saprophytes. En effet, elles se nourrissent de déchets (en décomposant la matière organique morte) ou par prédation en s'attaquant à d'autres micro-organismes pour consommer leur biomasse (Thiery et Kaimer, 2020). Cette bactérie Gram négative est dotée d'une double membrane dont la ME est adjacente du glycocalyx (revêtement fibreux permettant une protection à la membrane externe de la bactérie). On y retrouve l'EPS (exopolysaccharide) qui est parsemée de protéines et de saccharides principalement identifiés comme le galactose, la glucosamine, le glucose, le rhamnose et le xylose. Non seulement l'EPS contribue à la survie de l'organisme contre les molécules toxiques (Saïdi *et al.*, 2022), mais il est notamment impliqué dans la formation de corps fructifère étant un état de survie lors d'une carence nutritive (figure 1.9), dans la cohésion entre cellules ainsi que dans la motilité sociale (Saïdi *et al.*, 2022). Un aspect intéressant concernant la ME est sa dynamique. En effet, dû au contact entre cellules par l'intermédiaire de vésicules (VMEs) et de tubes (TMEs), les cellules compatibles peuvent interchanger leurs lipides, protéines et même fusionner leur membrane (Wei *et al.*, 2014). Étant donné le fait que les mécanismes qui régissent le dynamisme de sa membrane sont encore méconnus et que cette bactérie est capable d'incorporer le Kdo puis l'exprimer à sa surface, *Myxococcus xanthus* est une motivation dans le développement d'une méthode d'extraction plus complète et précise (Thiery et Kaimer, 2020). Lors de carence nutritive, les cellules de *M. xanthus* s'agrègent puis forment des corps fructifères tandis qu'une autre portion de cellules forme une monocouche de cellules appelées bâtonnets périphériques (Whitfield *et al.*, 2020). Après 72 h de carence nutritive, les corps fructifères se différencient en myxospores où chaque corps fructifère contenant des spores. Lorsque les nutriments

sont présents dans l'environnement, les myxospores germent en reprenant la croissance végétative (Dorado *et al.*, 2016).

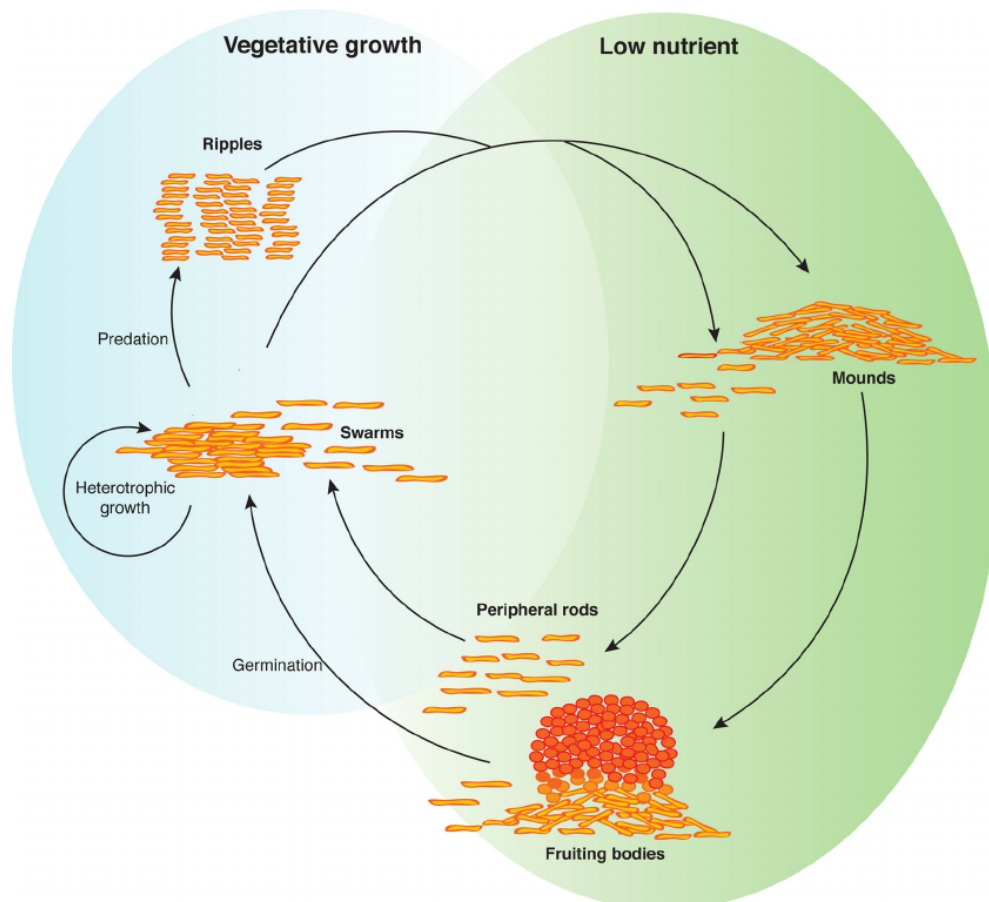


Figure 1.9. Cycle de vie complet de *Myxococcus xanthus*.

Dans des conditions de carence nutritive, les *M. xanthus* s'attourent dans le but de survivre (*mounds*). Durant 24 heures, il y a formation de corps fructifère d'une densité allant jusqu'à  $10^6$  spores dont la première apparition se fait en 4-6 heures et d'autres sont dotés d'une morphologie en bâtonnets périphériques (forme normale) capables de résister au changement de température (*peripheral rods*). Une fois la maturation des spores terminée (72 heures), une portion des corps fructifères germe en présence de nutriment tandis que l'autre subit une nécrose. (Mauriello *et al.*, 2010)

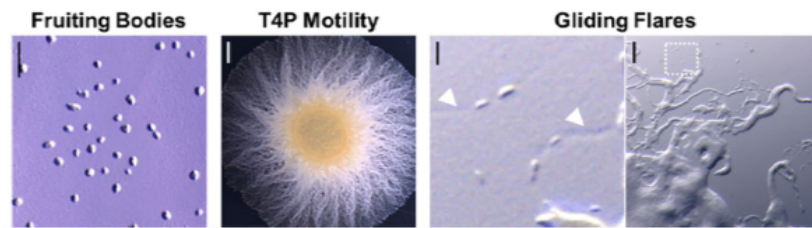


Figure 1.10 Les différentes motilités et phénotypes des *Myxococcus xanthus*. Étant une bactérie dont le comportement se dit social, les *M. xanthus* interagissent ensemble et leur phénotype dépend de la présence ou absence de nutriment. À l'extrémité gauche montre la formation des corps fructifères sur une gélose 1,5% CF après 72 heures (échelle 1 mm). L'essaim bactérien du milieu représente la motilité sociale dépendant du pilus de type IV (T4P) sur une gélose 0,5 % CYE après 72 heures (échelle 2 mm). Le dernier panel montre la motilité de type « *gliding* » sur CYE 1,5 % de gélose après 30 heures (échelle: 50  $\mu$ m). Adapté de Saïdi *et al.*, 2022.

### 1.3.2 Motilité de type *gliding*

La motilité A (aventurière) ou « *gliding* » concerne le mouvement des cellules individuelles (Mauriello *et al.*, 2010). Ce mouvement dépend d'une machinerie Agl-Glt dont Glt est un complexe d'enveloppe cellulaire multiprotéique tandis que Agl est stator flagellaire protonique (figure 1.11). En effet, Agl-Glt interagit avec le cytosquelette MreB de la bactérie lui servant ainsi d'ancrage (Islam et Mignot, 2015). Une partie de la machinerie interagit avec la membrane et permet une fixation solide sur les surfaces dures (Islam et Mignot, 2015). Ce point d'adhésion est nommé point d'adhésion focal. Une fois que la machinerie a fait glisser toute la cellule, elle se détache afin qu'une autre machinerie se forme et que la cellule continue de glisser (Faure *et al.*, 2017) et (Islam *et al.*, 2023).

Plusieurs théories sont posées concernant le mode de fonction de la motilité A, entre autres que la force de déplacement est basée sur des complexes d'adhésion se situant le long du corps cellulaire. C'est l'hypothèse que Mignot a illustré en 2007 par l'intermédiaire d'une protéine AglZ fusionnée à un fluorochrome YFP. Des amas fluorescents fixes sont alors observés le long du corps cellulaire alors que la bactérie se déplace (Konovalova, 2010). Ce modèle de déplacement est alors validé



dans une étude portant sur la motilité. Le complexe d'adhésion focal se faisant entre le substrat sur la surface et le Glt sur la bactérie via l'ancrage permet à la cellule de se propulser (Islam *et al.*, 2023). Des protéines peuvent même être échangées lors de contact cellule-cellule (Mauriello *et al.*, 2010).

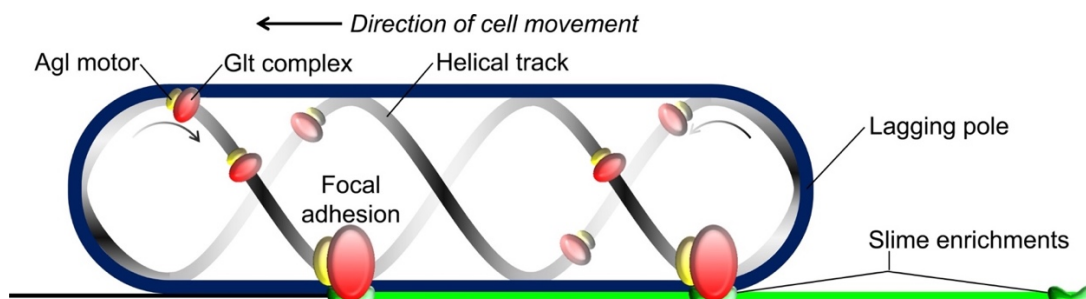


Figure 1.11 Illustration de la motilité « *gliding* » chez *M. xanthus*. Modèle représentant le cytosquelette composé de la protéine MreB ainsi la machinerie d'ancrage. Agl-Glt circule le long de la cellule. En s'ancrant au substrat à la surface (formant l'adhésion focale), le complexe Glt permet à la cellule de se mouvoir. (Islam et Mignot, 2015)

### 1.3.3 Motilité de type sociale

La motilité S dite sociale décrit un déplacement axé sur la machinerie pilus de type IV (T4P) médié par l'extension et la rétraction des pili (figure 1.12). Cette motilité prend effet lorsque les cellules se trouvent à proximité l'une de l'autre, autrement dit : elle décrit un déplacement en groupe (Mauriello *et al.*, 2010). La motilité S est observée dans la formation de corps fructifère (Hodgkin et Kaiser, 1977), mais aussi dans la prédation dans le but de former les ondulations précédant l'agrégation « *mounds* » (Black et Shaevitz, 2021). La motilité sociale est régie par deux polymères qui permettent notamment l'expansion du biofilm de l'essaim à travers le pilus de type IV : le polysaccharide biosurfactant (BPS) et l'EPS (Saïdi *et al.*, 2021). Le BPS est un polysaccharide sécrété par *la M. xanthus* et son activité se résume à stimuler la motilité dépendante de T4P en réduisant la tension de surface, en effet cela a pour effet de déstabiliser fonctionnellement (c'est-à-dire de relâcher) la couche d'EPS à la surface de la cellule, ce qui entraîne un large éventail de changements de comportement pour la

cellule (Islam *et al.*, 2020) et (Saïdi *et al.*, 2021). Le BPS joue aussi son rôle dans la sporulation. L'implication du BPS et de l'EPS sont ainsi requis pour le bon fonctionnement de la motilité S : l'EPS associé à la surface de la ME permet la liaison entre les différentes cellules lorsqu'elles sont à proximité, c'est le point d'ancrage avec le pilus adjacent (Lu *et al.*, 2005). Le BPS et l'EPS, sont produits par les voies de biosynthèse de polysaccharide Wzx/Wzy-dépendantes. Un polymère Wzx/Wzy-dépendantes est synthétisé dans le périplasma, il est ensuite sécrété à l'extérieur de la cellule à travers un translocon couvrant le périplasma intégré dans la ME. Le génome de *M. xanthus* code pour des protéines qui constituent de multiples voies d'assemblage de polysaccharides dépendantes de Wzx/Wzy. La première de ces voies est responsable de la biosynthèse de l'EPS, tandis que la seconde synthétise le polymère MASC « *major spore coat* » qui entoure les myxospores, sujet développé par Islam en 2020 (Islam *et al.*, 2020) et (Saïdi *et al.*, 2022). Ensemble, le BPS et l'EPS sont des polysaccharides synthétisés par les voies Wzx/Wzy-dépendantes mais sont aussi indispensables à l'expansion et à la cohésion des communautés de *M. xanthus* (Islam *et al.*, 2020). Ainsi, la synergie entre la sécrétion d'EPS et de BPS en quelque sorte module le cycle de vie multicellulaire de *M. xanthus* (Saïdi *et al.*, 2021).

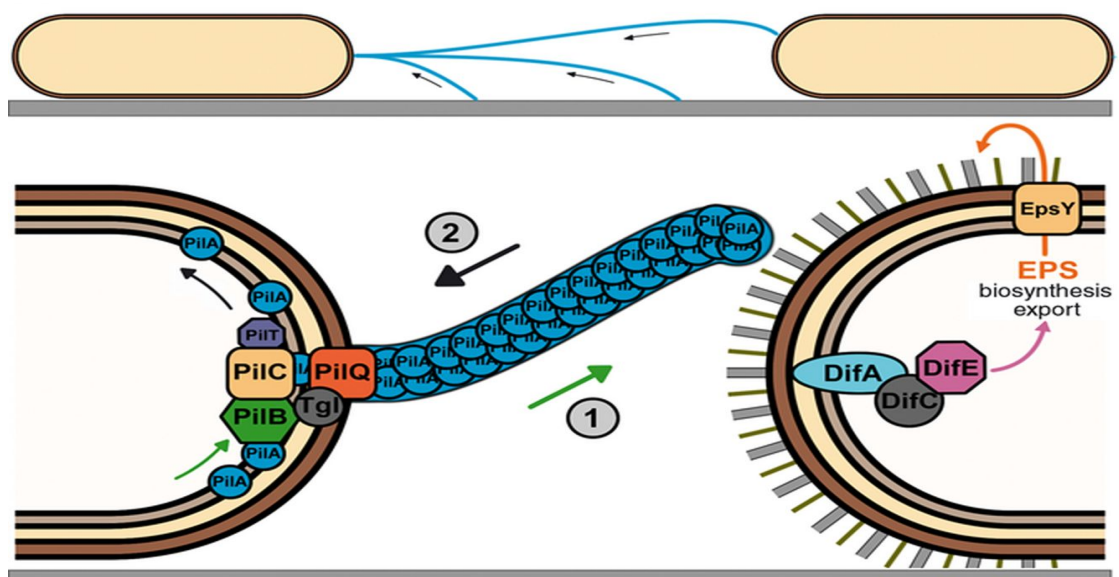


Figure 1.12 Illustration de la motilité sociale.

Modèle représentant la motilité sociale. Elle dépend de pilus de type IV et de leur rétractation après s'être ancrée à EPS situé sur la matrice extracellulaire d'une cellule adjacente. De ce fait, les bactéries se rapprochent l'une de l'autre et entrent en contact (Adapté de Zhang *et al.*, 2012).

#### 1.3.4 Le dynamisme de la membrane externe de *M. xanthus*

*Myxococcus xanthus* peut se développer seule, mais c'est en essaim qu'elle est le plus intéressante. En effet, le premier aspect qu'on lui attribue est sa capacité à faire des échanges membranaires entre des cellules compatibles (Vassallo *et al.*, 2015). Pour ce faire, les cellules ont recours à TraA, un récepteur à la surface de la cellule qui médie le comportement social de la bactérie, ainsi que la protéine TraB qui contient un domaine OmpA semblant jouer un rôle dans la paroi cellulaire (Ducret *et al.*, 2013). Ensemble ils forment TraAB qui permet la jonction et la fusion des ME (Wei *et al.*, 2014). Un autre aspect qui montre le dynamisme de cette membrane est sa capacité à produire des VME provenant du biofilm bactérien, entre d'autres mots, les vésicules sont des structures transportant de l'ADN, ARN, des protéines ainsi que des composés toxiques (Hartzell, 2014). En dehors de leurs rôles de transport, elles semblent interagir dans le cycle de vie des cellules (privation de nutriment). Ces structures sont initialement étudiées afin de déterminer comment les cellules de *M. xanthus* s'échangent du matériel lors des jonctions membranaires, en l'occurrence le transfert de protéines (Wei *et al.*, 2014).

Sous certaines conditions environnementales et expérimentales, la membrane externe produit également des tubes contenant des lipides et des lipoprotéines ainsi que des LPS, ces tubes jouent possiblement un rôle dans les échanges membranaires. Le réseau de tubes et de vésicules contribue à la jonction des cellules (Remis *et al.*, 2014). C'est ce que Wei *et al* (2014) ont tenté de déterminer par différents tests par le biais de marqueurs et colorants fluorescents. Ceux-ci ont révélé qu'une surexpression de TraAB entraînait une meilleure jonction des cellules et que ce phénomène était indépendant

des tubes membranaires. C'est dans une étude menée par Kaplan *et al* que l'on apprend plus sur la biosynthèse et le rôle des tubes membranaires (Kaplan *et al.*, 2021). Ils en déduisent que leur rôle dépend de l'espèce chez laquelle on les retrouve. Ces informations mettent en avant la *Myxococcus xanthus* comme l'une des bactéries possédant une membrane externe la plus dynamique d'où l'intérêt de l'étudier.

### 1.3.5 Lipopolysaccharide chez *M. xanthus*

Les molécules de LPS sont des composées non protéiques de la surface cellulaire des bactéries à Gram négatives, dans le feuillet externe de la membrane externe (figure 1.10). Comme déjà cité plus haut, ils sont composés d'un lipide A hydrophobe se situant à l'intérieur de la couche lipidique, d'une chaîne oligosaccharide divisé en deux parties distinctes (un noyau interne étant hydrophobe et un noyau externe hydrophile ayant une chaîne latérale composée d'une chaîne de polysaccharides de nature hydrophile) comprenant l'antigène O. (Burgos *et al*, 2019). L'antigène O joue un rôle dans la formation des corps fructifères et dans les deux types de motilité (Burgos *et al*, 2019). De manière plus globale, le LPS semble jouer un rôle dans la perméabilité ainsi que l'intégralité de la membrane, la résistance aux antibiotiques et la morphologie de la cellule. Les LPS sont des facteurs pathogènes provoquant la fièvre, l'hypotension, la coagulation intravasculaire ainsi que différents chocs létaux. C'est le lipide A qui en est responsable à travers la libération d'endotoxine. D'autre part la stimulation de la capacité phagocytaire des leucocytes active la prolifération et la différenciation des anticorps chez les lymphocytes B, ceci montre l'importance des LPS dans le système immunitaire (Vogel et Hogan, 1990).

Chez les bactéries à Gram-négatives, la synthèse du LPS et donc celle du Kdo commencent au niveau de la face cytoplasmique de la membrane interne et suit la voie de Raetz (figure 1.13). Les premières réactions se faisant dans le cytoplasme mettent en jeu un substrat UDP-GlcNAc se faisant acétyler par une enzyme LpxA donnant

UDP-3(O)-acyl-GlcNAc. Ce même composé est ensuite désacétylaté par l'enzyme LpxC formant UDP-3-(O)-acyl-GlcN. Enfin, une enzyme LpxD permet de former UDP-2,3-(O)-diacyl-GlcN. Par la suite, un composé UDP-2,3-(O)-diacyl-GlcN médié par une enzyme LpxI forme UMP et un Lipide X. Ce même Lipide X réagit avec un autre UDP-2,3-(O)-diacyl-GlcN par l'intermédiaire de LpxB pour former un disaccharide 1-P qui deviendra le Lipide IV<sub>A</sub>. Deux résidus de Kdo sont attachés au Lipide IV<sub>A</sub> par KdtA, puis deux acétylations par les enzymes LpxL et LpxM permettent la formation de Kdo<sub>2</sub>-Lipid A (Vuorio et Vaara, 1995). Une fois synthétisé, le LPS est extrait du feuillet périplasmique de l'IM par le système Lpt et le conduit le LPS à travers le pont Lpt via un mécanisme dépendant de l'ATPase LptB. Le LPS est par la suite inséré dans le feuillet externe de l'OM (Okuda *et al.*, 2016). L'acide 3-désoxy-D-manno-oct-2-ulosonique dit Kdo est un acide ulosonique essentiel que l'on retrouve dans les plantes, mais est surtout utilisé par les bactéries à Gram négatives. On le retrouve dans la biosynthèse des LPS (Dumont *et al.*, 2012). En effet, il est lié au lipide A. Des études préliminaires ont déterminé qu'à cause de sa voie de synthèse et son exclusivité chez les Gram négatifs, le Kdo serait la cible parfaite pour intégrer un analogue modifié de celui-ci. En effet, Dumont *et al* ont montré que les Gram négatifs peuvent être marqués par un traitement avec un analogue de Kdo (8-N<sub>3</sub>-Kdo) exogène en ayant recours à un acide catalysé par une réaction de Huisgen ainsi qu'un fluorophore fonctionnalisé (Dumont *et al.*, 2012). Ainsi, la voie de biosynthèse Kdo semble être une voie idéale cible pour le développement de nouveaux antibactériens, pour au moins deux raisons : le Kdo ne se trouve que dans la membrane externe de bactéries Gram-négatifs permettant ainsi une sélectivité médicamenteuse ; (2) Kdo est un bloc de construction essentiel pour l'assemblage des molécules de LPS, et donc l'interruption de sa biosynthèse peut gravement nuire à la viabilité de la bactérie (Cipolla *et al.*, 2010). C'est sur ces faits que notre projet de recherche a été réalisé.

Des études ont démontré que chez *M. xanthus* l'un des rôles du LPS (plus précisément l'antigène O) était relié à la motilité de type *gliding* et à la sporulation. En effet, des cellules de *M. xanthus* dont les LPS étaient défectueux ont été restaurés grâce

aux contacts cellule-cellule avec une souche saine. Cela montre le dynamisme et l'échange symbiotique au niveau de la ME (Vassallo *et al.*, 2015). C'est ce qui rend le marquage de ses molécules de LPS encore plus attrayant afin de comprendre les mécanismes qui régissent ces molécules.

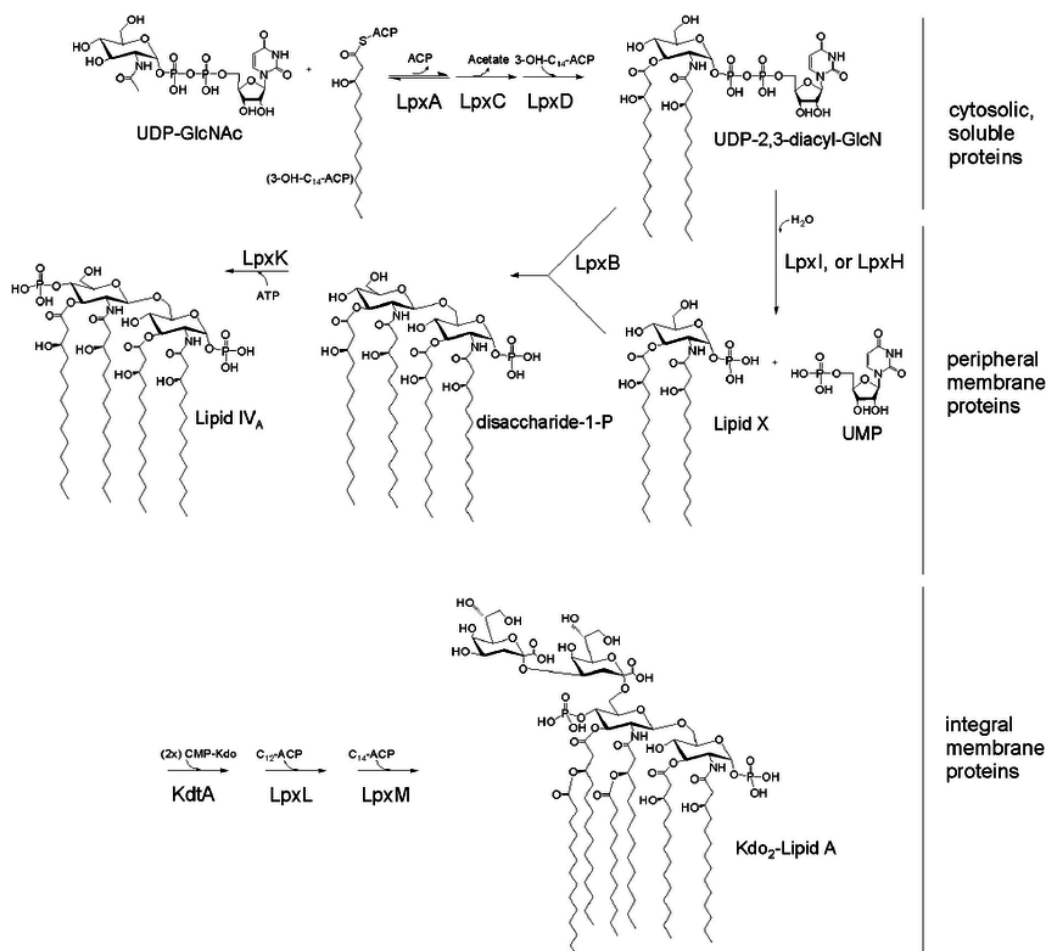


Figure 1.13 Synthèse du LPS par la voie de Raetz  
Les enzymes LpxA, LpxB, LpxC, LpxD, LpxH, LpxI, LpxK, LpxL et LpxM permettent la formation du Kdo<sub>2</sub>-Lipid A à partir UDP-GlcNAc (Joo, 2015)

#### 1.4 Détail de la nouvelle technique

À partir des éléments précédents, il a été pensé de synthétiser un analogue du Kdo, le 8-N<sub>3</sub>-Kdo (figure 1.14). Tout comme son nom l'indique, la modification se fait par l'ajout d'un groupement N<sub>3</sub> sur le carbone 8 de la structure (effectué par notre laboratoire à l'INRS). La valeur commerciale étant de 1500\$/10 mg, il a été préférable de le synthétiser nous-mêmes en collaboration avec un laboratoire en chimie des carbohydrates à l'INRS.

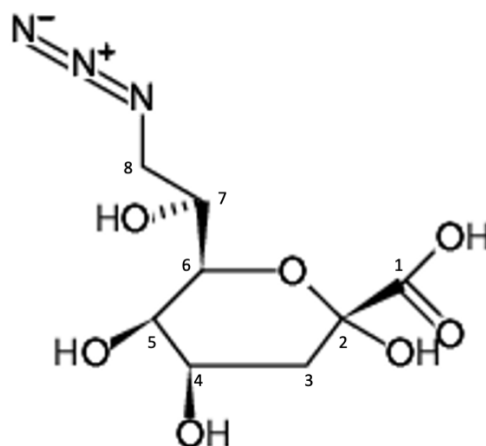


Figure 1.14 Structure chimique du 8-N<sub>3</sub>-Kdo.

Le groupement N<sub>3</sub> s'additionne au carbone 8 de la molécule Kdo. Le groupement N<sub>3</sub> nouvellement intégré permet la réaction click avec le DBCO des billes magnétiques (Dumont *et al.*, 2012).

#### 1.4.1 Problématique

Malgré des techniques existantes de purification de la ME bactérienne, la caractérisation et l'étude de nombreuses protéines bactérienne restent inconnues c'est pourquoi le développement d'une nouvelle méthode de purification protéique via l'isolation de la ME bactérienne a été pensé. La ME est parsemée de protéines membranaires dont certaines ont un rôle de protection. En effet, certaines protéines apportent une résistance (meilleure intégrité) aux bactéries au

niveau de leur membrane contre les antibiotiques, ceci faisant des protéines membranaires des cibles de choix en ce qui concerne une étude. Il faudrait donc une méthode permettant d'analyser les éléments de la membrane, ici les protéines membranaires, afin d'élaborer des antibiotiques et des vaccins provoquant l'inhibition de la synthèse de la membrane cytoplasmique ou encore de la synthèse protéique (Lesseur, 2014). C'est pourquoi le développement d'une nouvelle méthode de marquage de la ME bactérienne en utilisant une réaction « click » entre une molécule de DBCO et un 8-N<sub>3</sub>-Kdo synthétisé est primordial. Ce procédé de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen dit réaction « click » permet de créer un groupement fonctionnel à partir de deux molécules distinctes. En bref, le Kdo exogène (8-N<sub>3</sub>-Kdo) s'incorpore au LPS pendant sa biosynthèse, puis le LPS avec 8-N<sub>3</sub>-Kdo est transporté de la cellule vers sa surface membranaire. Cela permet au groupement fonctionnalisé avec -N<sub>3</sub> de réagir avec des billes magnétiques de DBCO facilitant l'isolation membranaire et donc l'extraction de protéine membranaire. Cela serait une méthode rapide d'extraction et permettrait entre autres de caractériser et d'analyser l'implication de protéines dans divers mécanismes inconnus de la ME (Paolozzi *et al.*, 2019).

Problématique: Il est difficile d'étudier la ME des bactéries, d'en isoler les composants, les protéines. Ceci est important, tant d'un point de vue fondamental que pour le design de composé d'antibiotiques et d'antimicrobiens ayant pour cible la ME bactérienne. Cependant, il y a un manque d'approche expérimentale.

Hypothèse : Le développement d'une nouvelle méthode d'étiquetage de la ME bactérienne en utilisant une réaction « click » entre une molécule de DBCO et un 8-N<sub>3</sub>-Kdo (figure 1.14) permettra l'extraction de protéines présentes sur la surface cellulaire. Tel que dans l'étude portée par Nilsson en 2017 décrite précédemment sur l'incorporation du Kdo dans le LPS bactérien, la fluorescence observée sur des bactéries *E. coli* provient de l'étiquetage de 8-N<sub>3</sub>-Kdo sur la surface membranaire, plus précisément sur le LPS (Nilsson *et al.*, 2017). Dans le but d'isoler ME, nous avons



substitué cette méthode de marquage par des billes magnétiques couplées à un groupement DBCO. Par sa structure cyclooctyne, le DBCO se « click » au groupement N<sub>3</sub> du 8-N<sub>3</sub>-Kdo sans l'intermédiaire d'un dérivé de cuivre « SPAAC ». De plus, la modification de la position C8 du Kdo avec un groupe azido empêche le métabolisme inverse par la phosphatase Kdo-8-P (lors de sa synthèse) et l'incorporation de la fraction azido dans d'autres métabolites cellulaires, ce qui pourrait entraîner une perte de spécificité de marquage sur la membrane externe (Dumont *et al.*, 2016).

#### 1.4.2 Objectif de recherche

L'objectif global de cette recherche est de développer une nouvelle méthode de purification protéique de la membrane externe. Pour y parvenir, des objectifs spécifiques devront être exécutés.

Objectifs spécifiques : - Incorporer le 8-N<sub>3</sub>-Kdo au LPS  
- Purifier la ME  
- Étudier le comportement de *M. xanthus* en présence de 8-N<sub>3</sub>-Kdo

## CHAPITRE 2

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1 Préparation de la culture cellulaire

Pour débiter, à partir d'un échantillon de myxospores incubé à -80 °C, nous les faisons germer sur une gélose 1,5% CYE-agar une culture de *Myxococcus xanthus* DZ2 modifié où OMss-mCherry est intégré au génome, présentant ainsi une protéine mCherry au niveau de la ME. Pour la plupart de nos expériences, nous avons utilisé une souche de *M. xanthus* DZ2 exprimant OMss-mCherry du site d'attachement de phage Mx8 dans le génome. OMss-mCherry est une version de la protéine fluorescente mCherry avec un peptide signal d'une lipoprotéine qui cible le mCherry au feuillet periplasmique de la ME (Ducret *et al.*, 2013). La gélose est ensuite incubée à 32 °C durant 72 heures. Le tout est scellé d'un parafilm pour éviter les contaminations. Après l'incubation, la souche est inoculée dans une culture liquide de 12 mL CYE avant d'être incubée 24 heures à 32 °C sous une agitation à 220 rpm.

Les souches de *M. xanthus* utilisées sont listées au sein du Tableau 2.1

Tableau 2.1 Souches bactériennes utilisées.

Code	Genotype	Description	Référence
TM682	WT DZ2 (OMss-mCherry)	Souche exprimant mCherry couplée à un peptide signal (ss) qui le cible au ME (OM) pour son insertion dans le feuillet périplasmique	Ducret <i>et al.</i> , 2013
TM290	DZ2 $\Omega pilA$	Insertion d'un transposon dans le gène <i>pilA</i> . Souche est T4P -	Saïdi <i>et al.</i> , 2021

DZ4772	AgmU-mCherry	Souche WT exprimant AgmU-mCherry à partir du locus AgmU natif. AgmU est un complexe protéique connu sous le nom de GltD. Il possède un mCherry en C-terminal	Nan <i>et al.</i> ,2010
--------	--------------	--	-------------------------

## 2.2 Incorporation de 8-N<sub>3</sub>-Kdo

La culture cellulaire est ajustée à une densité optique (DO) à 600 nm de 0,02, puis dans quatre tubes, 1 mL de CYE liquide est ajouté ainsi que la quantité adéquate de cellules. Deux échantillons serviront de contrôle tandis que les deux autres recevront 25 µL de 8-N<sub>3</sub>-Kdo 5 mM dilué dans de l'eau milli q stérile. Les tubes sont scellés à l'aide de parafilm et incubés durant 48 heures à 32 °C sous une agitation à 220 rpm.

## 2.3 Isolation de la membrane externe

Pour chaque tube, la culture cellulaire est ajustée à DO<sub>600</sub> de 0,4. La quantité adéquate est alors transférée dans un microtube de 2mL stérile puis centrifugée à 6 000 × g durant 5 minutes. Le culot est ensuite resuspendu avec 2 mL de TPM (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, and 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) et s'ensuit une sonication de 4 cycles (10 secondes chacun) à intensité 7 à l'aide d'un appareil Branson sonifer 450. Une seconde centrifugation de 30 minutes à 12 000 × g est effectuée. Par la suite, 10 µL de bille magnétique (Click chemistry tools. DBCO magnetic beads. cat. # 1037-1. mid diamètre 8µm. lot 2198) est ajoutée à 1 mL du surnageant et est incubé 10 minutes à 4 °C dans l'obscurité où se fait la réaction « click ».

À l'aide d'un aimant, une séparation est faite. Les billes sont lavées 3 fois durant 90 s grâce à du PBS stérile. Après le dernier lavage, 63 µL de tampon Laemmli DTT 1× est ajouté afin de perturber la liaison N<sub>3</sub>-DBCO et ainsi libérer les matériaux attachés des billes, ce qui permet l'électrophorèse sur les gels SDS-PAGE. Cette incubation au tampon Læmmler DTT 1× dure 10 minutes à 65 °C. Une dernière

séparation grâce à l'aimant permet d'obtenir les échantillons prêts pour la migration sur gel.

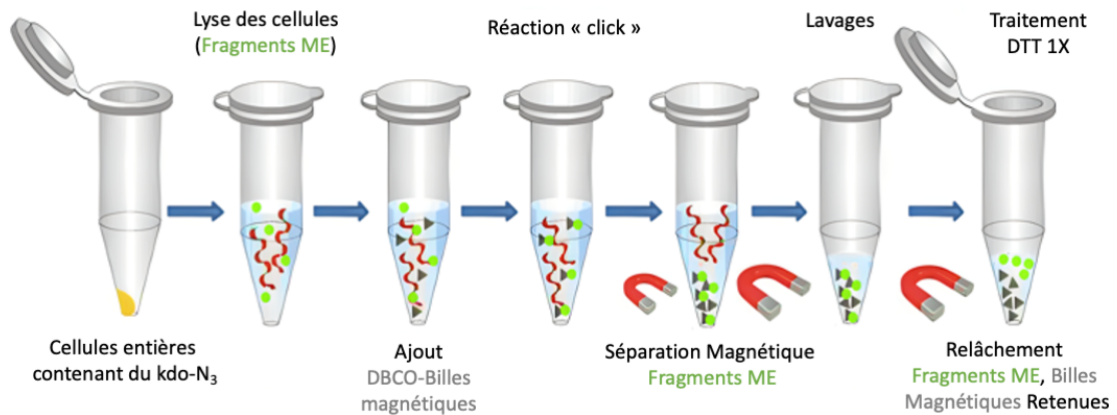


Figure 2.1 Protocole d'isolation de la ME via des billes magnétiques.

Illustration des cellules ayant incorporé le 8-N<sub>3</sub>-Kdo, les membranes sont lysées puis les billes magnétiques click avec N<sub>3</sub> par l'intermédiaire du DBCO. S'ensuit une séparation grâce à un aimant afin d'obtenir la membrane externe (Adapté de Fairbiotech).

#### 2.4 Électrophorèse sur gel

Sur un gel 12% de polyacrylamide, les échantillons ainsi qu'une échelle de poids moléculaire (Fisher BioReagents EZ-RUN Pre-stained Rec Protein) effectuent leur migration à 80 V durant 30 minutes. Après avoir traversé le gel d'empilement, les échantillons continuent leur migration à 120 V durant 1 heure. Il faut s'assurer que les échantillons sont chargés avec un espace entre chaque. Pour une meilleure qualité de migration, ces espaces peuvent être chargés avec du Tampon Laemmli DTT 1×. Après la migration, le gel est scanné un Typhoon FLA 9500 du fabricant GE healthcare par un laser excitant à 532 nm afin de détecter la présence d'un signal protéique OMss-mCherry aux à l'entour de 25 kDa.

#### 2.5 Détection de protéines

Le gel subit par la suite une coloration grâce au kit Silver stain Pierce fabriqué par Thermo Scientific se décrivant ainsi :

Il est lavé 2 fois pendant 5 minutes à l'aide d'eau désionisée stérile, fixé 30 minutes dans une solution 60% d'eau désionisée, 30% d'éthanol et 10% d'acide acétique. Le gel est ensuite incubé 10 minutes dans une solution 10% d'éthanol puis est rincé 2 fois 5 minutes à l'aide d'eau désionisée. Une seconde incubation est faite, mais cette fois dans une solution de sensibilisation (contenant du thiosulfate) durant 1 minute. Puis, le gel est rincé à l'aide d'eau désionisée 2 fois 1 minute avant d'être incubé dans une solution de marquage (contenant du nitrate d'argent à 0,1% et du formol à 0,08%) durant 30 minutes. Après cela, le gel est lavé 2 fois 20 secondes à l'aide d'eau désionisée. Immédiatement le gel est incubé dans une solution de développeur (contenant du carbonate de potassium à 3 %, 250 µL de formol et 125 µL de thiosulfate de sodium à 10 % par litre), durant un maximum de 3 minutes puis la réaction est arrêtée à l'aide d'une solution 5% d'acide acétique. C'est que l'on observe dans les figures 3.1 à 3.6.

## 2.6 Test d'agrégation

Pour faire le test d'agrégation, il a fallu faire croître sur une gélose 1,5% CYE-agar une culture de *Myxococcus xanthus* *Opila* à partir des myxospores incubées à -80 °C. Cette souche a pour particularité d'être dépourvue de pilus et donc supposément de ne pas faire d'agrégation, elle permet d'être un contrôle. La gélose est ensuite incubée à 32 °C durant 72 heures. Le tout est scellé d'un parafilm pour éviter les contaminations.

Après l'incubation, la souche est inoculée dans une culture liquide de 12 mL CYE avant d'être incubée pendant 24 heures à 32 °C sous une agitation à 220 rpm. Une portion de

8-N<sub>3</sub>-Kdo est incorporée, comme mentionné précédemment. Par la suite, 1 mL de culture est prélevé, puis centrifugé à  $4\,000 \times g$  durant 10 minutes avant que le culot ne soit resuspendu dans 1 mL de TPM. La culture cellulaire est ajustée à une DO<sub>600</sub> de 1 avant d'être centrifugée 5 minutes à  $4\,000 \times g$ . Ce culot est ensuite resuspendu dans 1 mL de milieu CYE liquide. La densité optique est alors prise durant 150 minutes à des intervalles de 10 minutes. Il en est de même pour une *Myxococcus xanthus* DZ2 que l'on prendra comme contrôle WT (DZ2). Les courbes ont été obtenues via le logiciel Prism graphpad

## 2.7 Détection d'EPS par marquage avec le Trypan bleu

Concernant la détection d'EPS par marquage au Trypan bleu, une autre préparation cellulaire incorpore du 8-N<sub>3</sub>-Kdo et subit exactement les mêmes étapes jusqu'à obtenir une culture normalisée à DO<sub>600</sub> de 1. Le culot est suspendu dans 1 mL de TPM. Ensuite, 100 µL est retiré puis remplacé par 100 µL de Trypan bleu. L'échantillon est incubé à température pièce (à l'obscurité) durant 1 heure. Enfin, une centrifugation de  $16\,000 \times g$  durant 5 minutes précède la prise d'absorbance à 585 nm de 900 µL de surnageant uniquement.

## 2.8 Test de motilité

Une culture cellulaire de *Myxococcus xanthus* *ΩpilA* est mise en solution dans 15 mL de CYE liquide puis incubée à 32 °C sous une agitation de 200 rpm durant 24 heures. Le jour suivant, la culture est centrifugée 5 minutes à  $6\,000 \times g$ , 10 mL de TPM permettant de resuspendre le culot. Par la suite, 1 mL de la solution est prélevé avant d'être centrifugé 5 minutes à  $6\,000 \times g$  et celle-ci est ensuite fixée à une DO<sub>600</sub> de 0,5 dans du TPM. Ensuite, 5µL est ajouté sur une gélose 0,5% agar. La gélose est ensuite incubée et des photos sont prises à 24 heures, 48 heures et 72 heures à l'aide d'un

microscope stéréoscopique Olympus SZX16 équipé d'un système de caméra UC90 4K. Le même procédé est effectué sur des souches *Myxococcus xanthus* DZ2 servant de contrôle.

Tableau 2.2 Composition des milieux utilisés.

Milieu de culture et tampon	Composition
CYE	1% (w/v) de casitone
	0,5% (w/v) d'extraits de levures
	10 mM MOPS à pH 7,5
	4 mM MgSO <sub>4</sub>
1,5% CYE agar	1% (w/v) de casitone
	0,5% (w/v) d'extraits de levures
	10 mM MOPS à pH 7,5
	4 mM MgSO <sub>4</sub>
	1,5% (w/v) agar
TPM	10 mM Tris-HCl (pH 7,6)
	1 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	8 mM MgSO <sub>4</sub>
Laemmli DTT 2X	10% (v/v) SDS
	1M Tris-Cl (pH 6,8)
	1% (v/v) bromophenol blue
	1M DTT
	ddH <sub>2</sub> O
SDS - PAGE (12% Stacking gel)	0,17 mL 30% (v/v) acrylamide mix
	0,13 mL 1,5M Tris (pH 8,8)
	0,01 mL 10% (v/v) SDS
	0,01 mL 10% (v/v) ammonium persulfate
	0,001 TEMED
	ddH <sub>2</sub> O
SDS - PAGE (5% Resolving gel)	1,7 mL 30% (v/v) acrylamide mix
	1,3 mL 1,5M Tris (pH 8,8)
	0,05 mL 10% (v/v) SDS
	0,05 mL 10% (v/v) ammonium persulfate

	0,002 TEMED
	ddH <sub>2</sub> O
PBS 10X	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Tris/Glycine 10X	25 mM Tris
	192 mM glycine
	0,1% (v/v) SDS



## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS

#### 3.1 Isolation de la membrane externe de *Myxococcus xanthus* DZ2 OMss-mCherry suite à l'ajout de 8-N<sub>3</sub>-Kdo

##### 3.1.1 Conditions initiales

Pour répondre à notre objectif étant d'extraire des protéines membranaires via du 8-N<sub>3</sub>-Kdo, nous avons utilisé une souche *Myxococcus xanthus* DZ2 OMss-mCherry. Cette souche contient une séquence signal (ss) insérée en N-terminal de la protéine chimérique mCherry (lipoprotéine transportée à travers la membrane externe grâce à des systèmes de transport de lipoprotéines). Les systèmes de transport reconnaissent la séquence signal (ss) indiquant à celle-ci de se présenter dans le feuillet périplasmique de la ME (OM en anglais) (Caro *et al.*, 2019). L'incorporation du 8-N<sub>3</sub>-Kdo (dans les molécules de LPS) nouvellement synthétisé par notre laboratoire (en partenariat avec un laboratoire en chimie des carbohydrates à l'INRS) dans des bactéries *M. xanthus* a été réalisé à l'aide d'un milieu CYE liquide, les résultats de cette étude ont été publiés en 2021 par Esquivel montrant que la micrographie en fond clair et en fluorescence de cellules *M. xanthus* WT cultivées en présence de 8-Kdo-N<sub>3</sub> et traitées pour le marquage de façon à former une liaison covalente entre le groupe -N<sub>3</sub> du LPS modifié exposé sur la surface des bactéries et le motif DBCO lié au fluorochrome sulforhodamine permettent d'affirmer que la stratégie d'incorporation du 8-Kdo-N<sub>3</sub> est viable et capable de s'incorporer chez *M. xanthus* (Esquivel, 2021). C'est sur cette base que notre protocole d'extraction est développé. La solution bactérienne est alors fixée à une concentration représentant la phase de croissance adéquate pour la souche (DO<sub>600</sub>). C'est après une extraction à l'aide des billes magnétiques et d'aimant qu'une analyse SDS-PAGE de l'expression membranaire de *Myxococcus xanthus* a lieu en examinant

les profils engendrés par la migration des souches (figure 3.1). Le gel présente les profils de cellules traités avec du 8-N<sub>3</sub>-Kdo (Kdo +), et des cellules de contrôle (Kdo -) ainsi que de cellules intactes (pas de sonication effectuée) ayant été supplémentée par du 8-N<sub>3</sub>-Kdo.

Par souci de clarté nous nous focalisons d'abord sur le gel ayant subi une coloration à l'argent (Thermo Fisher Scientific). Le profil migratoire des différents échantillons révèle la présence d'organites par des taches sombres que l'on pense être du matériel membranaire (tache de coloration) synonyme d'une extraction de matériel membranaire. On remarque cependant ces taches chez les lysats avec et sans 8-N<sub>3</sub>-Kdo, ce qui montre des liaisons non spécifiques des billes. Un des profils migratoires sur le gel (cellules entières) est plus exprimé que les autres tout comme son signal fluorescent (mCherry) à 25 kDa sur le gel du haut de la figure 3.1. Ce fort signal est dû à une erreur lors de la préparation du tampon Laemmli qui ne contenait pas de glycérol, lors du chargement de l'échantillon, la densité et la viscosité de celui-ci ont causé une remontée qui a contaminé les différents puits, d'où la trainée que l'on voit sur l'ensemble du gel à 25 kDa.

Lorsqu'on se concentre sur le gel Typhoon, on constate premièrement l'autofluorescence à ~17 kDa provenant d'un composant du tampon Laemmli mais on remarque notamment l'absence du signal fluorescent de la mCherry à 25 kDa chez les échantillons ayant reçu du 8-N<sub>3</sub>-Kdo. Ceci peut provenir du photoblanchiment de la protéine, mais aussi d'un potentiel manque de spécificité de la méthode d'extraction. La présence du lysat de cellules entières est en soit un contrôle démontrant que la protéine mCherry est viable chez *M. xanthus*. L'expérience a été reprise, mais présentait des défauts identiques.

À la suite de cela, le protocole initial a dû subir diverses modifications dans le but de comprendre les raisons de ces liaisons non spécifiques et si l'extraction avait bel et bien fonctionné. Par exemple, l'augmentation du nombre de lavages appliqué aux billes magnétiques, la modification des températures d'incubation (réaction click à 37

°C ou à température pièce) ou autres changements qui seront présentés tout au long de ce document.

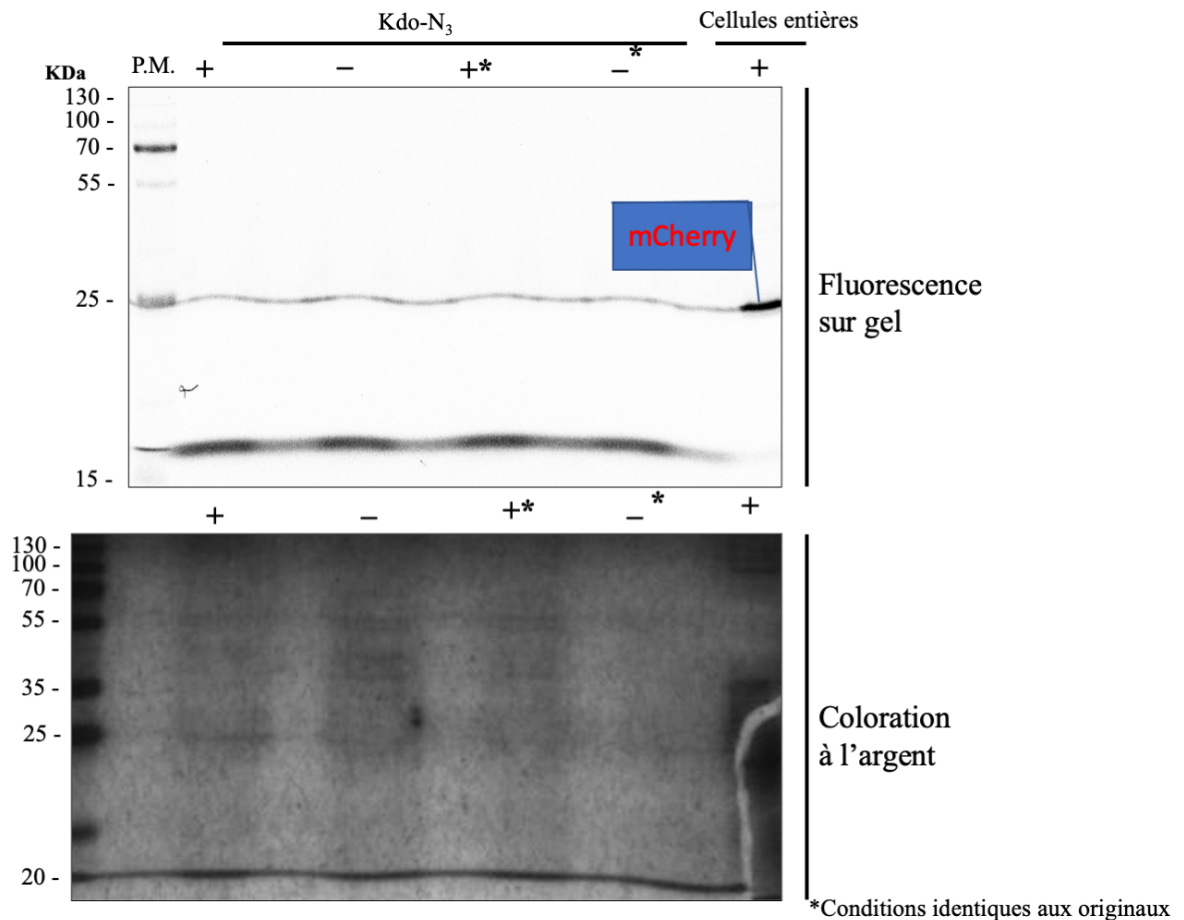


Figure 3.1 Analyse SDS-PAGE et coloration à l'argent de l'isolation membranaire de *Myxococcus xanthus* DZ2 OMss-mCherry après la croissance en présence de 8-N<sub>3</sub>-Kdo.

Les 5 différents échantillons (dont celui des cellules entières ne permettait que de vérifier l'efficacité des billes. On voulait vérifier si la sonication impactait l'intensité du signal de la mCherry et si les billes pouvaient quand même s'associer au matériel membranaire pour l'extraction) contiennent des bactéries ayant reçu ou non de 8-N<sub>3</sub>-Kdo. Après l'extraction de billes magnétiques (DBCO) étant censées se fixer à ce groupement -N<sub>3</sub>, les échantillons sont supplémentés de Laemmli DTT 1× permettant de briser les liens disulfures des protéines. Un chauffage de 10 minutes à 65 °C nous permet d'obtenir les échantillons prêts. Les protéines sur gel 12% de polyacrylamide (fluorescence sur gel), ainsi qu'une échelle de poids moléculaire Fisher BioReagents

EZ-RUN Pre-stained Rec Protein effectuent leur migration à 80 V durant 30 minutes puis après avoir traversé le stacking gel, les échantillons continuent leur migration à 120 V durant 1 heure. L'image du gel se fait à l'aide d'un Typhoon FLA 9000 puis après la coloration du gel, une image est prise par un Geldoc (Biorad). Les puits + contiennent du DZ2 + 8-N<sub>3</sub>-Kdo et les puits - contiennent DZ2 seulement. ( $n=4$ )

### 3.1.2 Comparaison des effets produits lorsque la chimie click a lieu à 4 °C versus 10 °C

Toujours par souci d'optimiser notre protocole d'isolation de la ME, nous avons utilisé une souche *Myxococcus xanthus* DZ2 OMss-mCherry. L'incorporation du 8-N<sub>3</sub>-Kdo est effectuée de la même manière via un milieu CYE liquide. Cependant, ayant constaté une forte présence taches de coloration sur les profils migratoires des gels marqués à l'argent sur la figure 3.1 et de les réduire, nous avons testé différentes températures d'incubation lors de la chimie click afin de vérifier si la température jouait un rôle sur la précision des résultats. C'est ce que l'on examine sur la figure 3.2, le gel présente les profils de cellules transformées (Kdo +) et effectuant la chimie click à 4 °C (température de référence) et à 10 °C ainsi que des cellules de contrôle (Kdo -) aux mêmes températures.

Le profil migratoire des différents échantillons révélé par la coloration du gel par un kit d'argent montre que malgré les différentes températures, les taches de coloration restent identiques aux précédents gels (figure 3.1). Cependant, l'échantillon de contrôle (Kdo -) ayant fait la chimie click à 10 °C semble être sensible à cette augmentation de température, on le voit par son profil d'un aspect plus sombre que les autres suites à la coloration d'argent. En observant les taches de coloration, on remarque que les échantillons sans 8-N<sub>3</sub>-Kdo présentent un profil migratoire identique à ceux où le 8-N<sub>3</sub>-Kdo a été ajouté, ce qui montre le premier défi de notre protocole, à savoir, la non-spécificité. De son côté, l'absence de la protéine OMss-mCherry dans les lysats (Kdo +) viennent soutenir les précédant résultats, en effet le contraste des images des gels ont été ajustés afin de vérifier si l'on était en présence de photoblanchiment de la mCherry où en l'hypothèse se dessinant peu à peu à savoir

l'échec de l'extraction de la ME. Ici l'ajout d'un lysat « cellule entière » aurait permis d'observer le profil de migration attendu de la protéine OMss-mCherry, il s'agit d'un contrôle manquant à l'expérience. La bande de signal à 17 kDa est tout simplement l'autofluorescence provenant du tampon Laemmli.

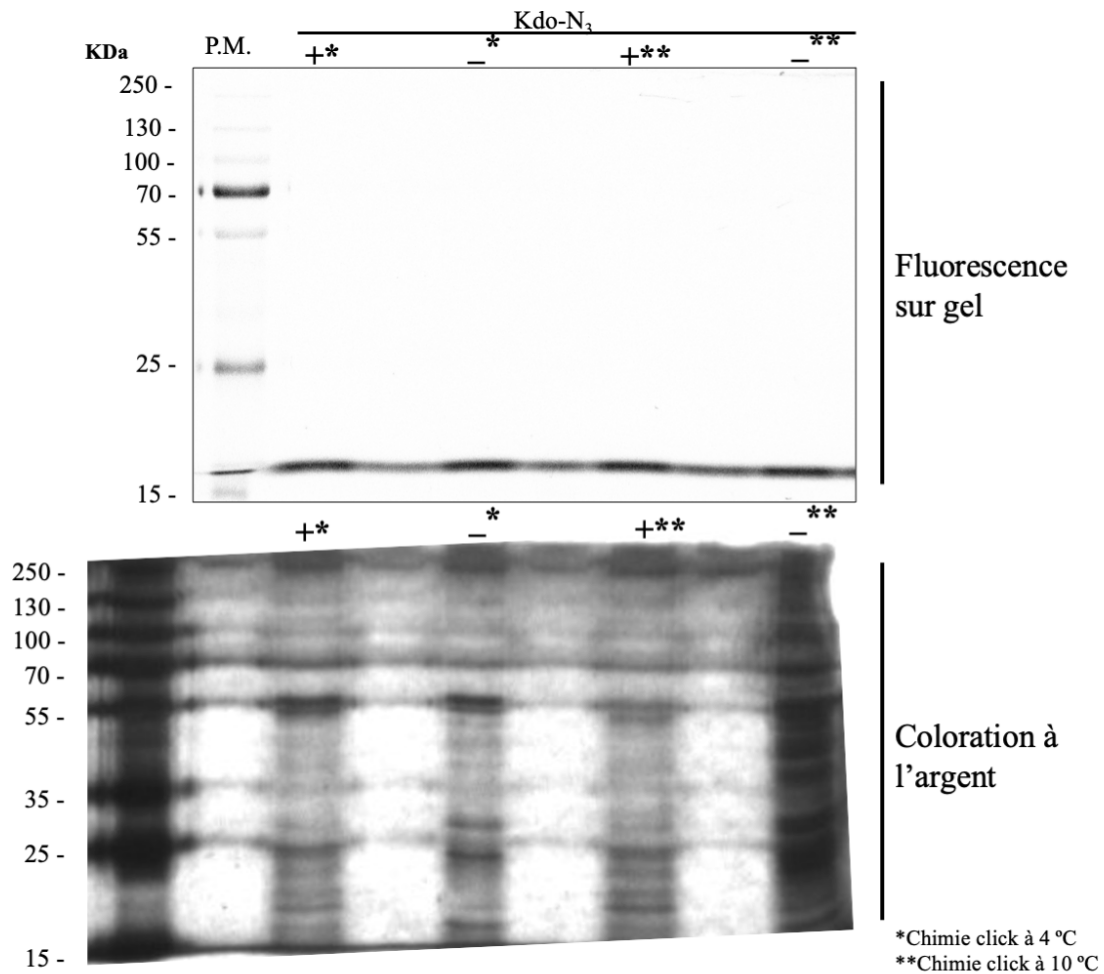


Figure 3.2 Analyse SDS-PAGE et coloration à l'argent de l'isolation membranaire via un protocole modifié de *Myxococcus xanthus* DZ2 OMss-mCherry après la croissance en présence de 8-N<sub>3</sub>-Kdo.

Les différents échantillons contiennent des bactéries ayant reçu (Kdo +) ou non (Kdo -) de 8-N<sub>3</sub>-Kdo. Les deux premiers échantillons ont subi une chimie click à 4 °C tandis que les deux derniers à 10 °C. Après l'extraction de billes magnétiques (DBCO) étant censées se fixer à ce groupement -N<sub>3</sub>, les échantillons sont supplémentés de Laemmli DTT 1× permettant de briser les liens disulfures des protéines. Un chauffage de 10

minutes à 65 °C nous permet d'obtenir les échantillons prêts. Les protéines sur gel 12% de polyacrylamide (fluorescence sur gel), ainsi qu'une échelle de poids moléculaire Fisher BioReagents EZ-RUN Pre-stained Rec Protein effectuent leur migration à 80 V durant 30 minutes. Après avoir traversé le stacking gel, les échantillons continuent leur migration à 120 V durant 1 heure. L'image du gel se fait à l'aide d'un Typhoon FLA 9000 puis après la coloration du gel, une image est prise par un Geldoc (Biorad). Les puits + contiennent du DZ2 + 8-N<sub>3</sub>-Kdo et les puits - contiennent DZ2 seulement. ( $n=3$ )

### 3.1.3 Comparaison des effets produits lors que la chimie click a lieu à 4 °C versus 37 °C

Après avoir constaté que la température d'incubation lors de la chimie click semble être un point culminant de l'expérience, il a été suggéré que la cellule soit incubée à température proche de la température biologique c'est-à-dire à 37 °C.

L'analyse du gel ayant subi une coloration par un kit d'argent (Thermo Fisher Scientific) prouve qu'il y a des protéines extraites dans les lysats traités (Kdo +), mais aussi dans les échantillons de contrôle (Kdo -). Cependant, il y a moins de taches de coloration dans les échantillons de 37 °C, ce qui pourrait partiellement être expliqué par la dénaturation de certaines protéines ou alors un effet indésirable lié à l'augmentation de température. Concernant les échantillons non traités (Kdo -) dans leurs globalités (*silver stain*), il semble que plus de matériels cellulaires s'est associé aux des billes dans les échantillons négatifs que dans les échantillons traités (ce qui va l'encontre des résultats attendus).

Par ailleurs, la figure 3.3 montre les profils de cellules transformées (Kdo +) et effectuant la chimie click à 4 °C (température de référence) et à 37 °C ainsi que des cellules de contrôle (Kdo -) aux mêmes températures. Au niveau de la fluorescence, on y observe les mêmes caractéristiques que dans le gel à figure 3.1 mis à part le lysat des cellules entières qui pour une raison inconnue n'exprime plus aucune fluorescence. Par la suite, malgré cela, l'absence de la protéine fluorescente mCherry (marqueur protéique) aux alentours de 25 kDa, nous montre que l'isolation de la ME n'a pas lieu. En sommes, la présence constante des protéines et de matériel membranaire même en

absence de 8-N<sub>3</sub>-Kdo semble être la conséquence d'une interaction non spécifique des billes avec la ME.

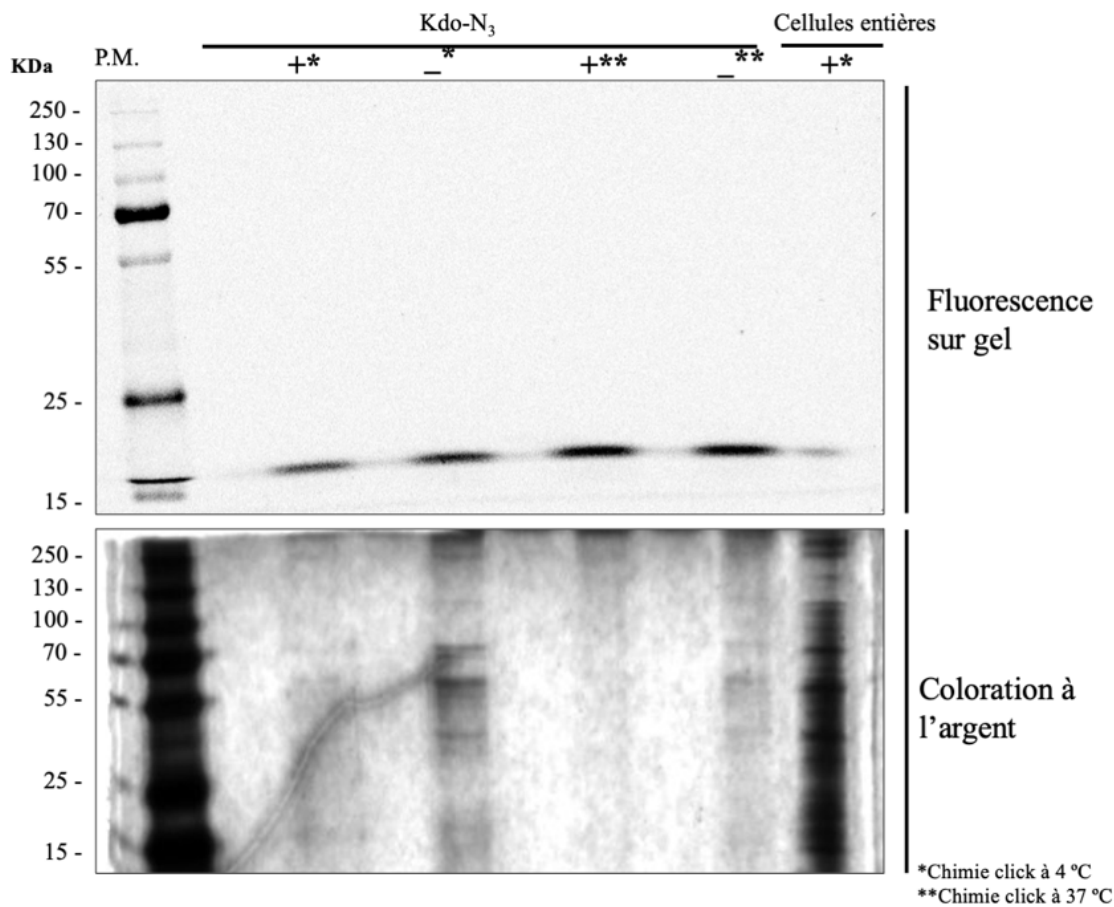


Figure 3.3 Analyse SDS-PAGE et coloration à l'argent de l'isolation membranaire via un protocole modifié lors de la chimie click de *Myxococcus xanthus* DZ2 OMss-mCherry après la croissance en présence de 8-N<sub>3</sub>-Kdo.

Les différents échantillons contiennent des bactéries ayant reçu (Kdo +) ou non (Kdo -) de 8-N<sub>3</sub>-Kdo. Les deux premiers échantillons ont subi une chimie click à 4 °C tandis que les deux derniers à 37 °C. Après l'extraction de billes magnétiques (DBCO) étant censées se fixer à ce groupement -N<sub>3</sub>, les échantillons sont supplémentés de Laemmli DTT 1× permettant de briser les liens disulfures des protéines. Un chauffage de 10 minutes à 65 °C nous permet d'obtenir les échantillons prêts. Les protéines sur gel 12% de polyacrylamide (fluorescence sur gel), ainsi qu'une échelle de poids moléculaire Fisher BioReagents EZ-RUN Pre-stained Rec Protein effectuent leur migration à 80 V durant 30 minutes puis après avoir traversé le stacking gel, les échantillons continuent leur migration à 120 V durant 1 heure. L'image du gel se fait à l'aide d'un Typhoon FLA 9000 puis après la coloration du gel, une image est prise par un Geldoc (Biorad).

Les puits + contiennent du DZ2 + 8-N<sub>3</sub>-Kdo et les puits – contiennent DZ2 seulement.  
(*n*=3)

### 3.1.4 Comparaison des effets produits lors que la sonication se fait avant ou après la chimie click

Dans le but de comprendre l'absence du signal mCherry, nous nous sommes focalisés sur le gel de fluorescence et nous avons tenté une alternative dans les étapes du protocole présenté dans la section ci-dessus en insistant sur un paramètre qu'est l'obscurité. Dans le protocole initial, il était question de briser la cellule à travers une sonication puis d'ajouter les billes magnétiques, dans cette alternative (figure 3.4) nous avons d'abord ajouté les billes magnétiques pensant qu'il y aurait le moins d'interactions non spécifique possible avec le matériel cellulaire et les billes. Puis la lyse des cellules a été faite suivie de la migration des échantillons dans le gel. Dans ce gel, le signal protéique est comme attendu à 25kDa, et l'on constate par l'intensité des bandes, que la sonication des échantillons avant la chimie click donne un meilleur rendement. Aussi dans la méthode où la sonication se fait après la chimie click, le signal fluorescent de la mCherry est plus prononcé dans le lysat Kdo + que chez le lysat Kdo -, ce résultat est un point montrant la viabilité de la protéine (elle est capable de rester en formation tonneau-β). Cependant le fait d'avoir une bande dans les échantillons avec et sans 8-N<sub>3</sub>-Kdo reflète encore une fois que le problème de non-spécificité n'est pas résolu. On remarque encore une fois l'autofluorescence à 17 kDa,

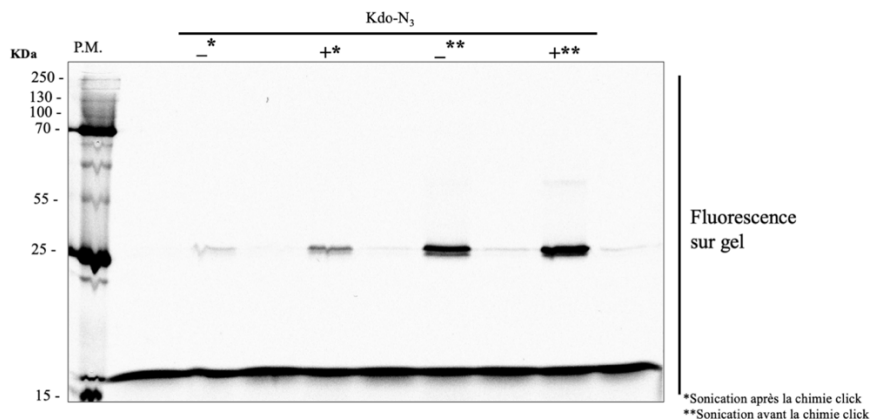




Figure 3.4 Analyse SDS-PAGE de l'isolation membranaire via un protocole modifié lors de la sonication de *Myxococcus xanthus* DZ2 OMss-mCherry après la croissance en présence de 8-N<sub>3</sub>-Kdo.

Les différents échantillons contiennent des bactéries ayant reçu (Kdo +) ou non (Kdo -) de 8-N<sub>3</sub>-Kdo. Une fois le Kdo incorporé, les deux premiers échantillons reçoivent 10µl de billes magnétiques. Ils sont centrifugés à 6 000 × g puis lysés avant que les billes soient extraites. Les deux derniers échantillons suivent le protocole initial. Après l'extraction de billes magnétiques (DBCO) étant censées se fixer à ce groupement -N<sub>3</sub>, les échantillons sont supplémentés de Laemmli DTT 1× permettant de briser les liens disulfures des protéines. Un chauffage de 10 minutes à 65 °C nous permet d'obtenir les échantillons prêts. Les protéines sur gel 12% de polyacrylamide (fluorescence sur gel), ainsi qu'une échelle de poids moléculaire Fisher BioReagents EZ-RUN Pre-stained Rec Protein effectuent leur migration à 80 V durant 30 minutes puis après avoir traversé le stacking gel, les échantillons continuent leur migration à 120 V durant 1 heure. L'image du gel se fait à l'aide d'un Typhoon FLA 9000. Les puits + contiennent du DZ2 + 8-N<sub>3</sub>-Kdo et les puits - contiennent DZ2 seulement. (*n*=3)

### 3.1.5 Comparaison des effets produits lors que les tampons de lavages et la température de la chimie click sont modifiés

Après avoir établi que les résultats optimaux sont lorsque la chimie click se fait à 4 °C, à 10 °C (températures basses) et que la sonication doit se faire avant la chimie click, nous avons tenté de vérifier si un autre tampon de lavage pourrait fournir des résultats plus précis lors de la visualisation des gels. De ce fait, nous avons fait des lavages par du PBS comme le stipule le protocole, mais aussi par du TPM avant d'effectuer l'électrophorèse. Le marqueur mCherry qui était à 25 kDa dans les gels précédents n'est plus visible (erreurs de manipulation) indiquant soit des résultats contradictoires à ceux obtenus auparavant ou alors tout simplement que la méthode d'extraction n'a pas fonctionné en ce qui concerne le protocole initial et avec le TPM comme solution de lavage.

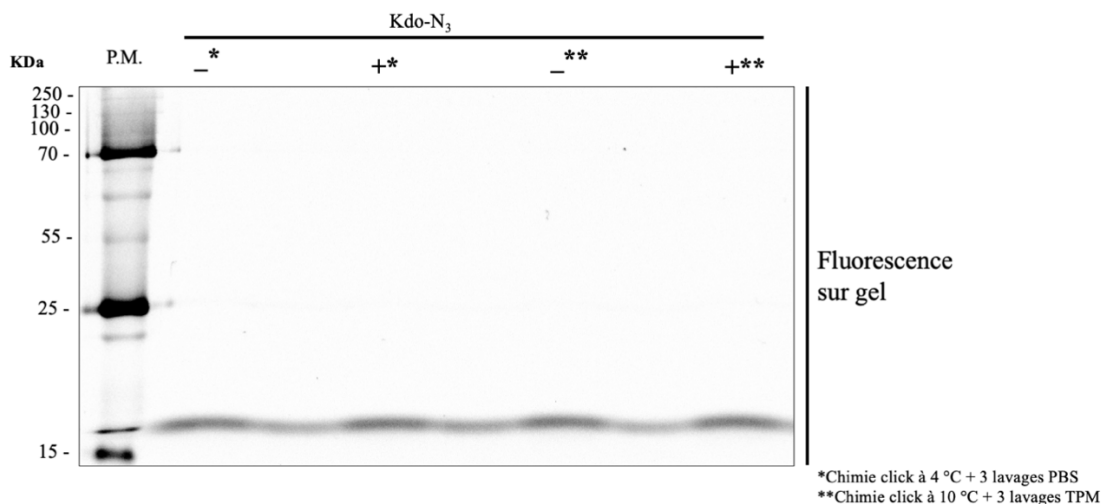


Figure 3.5 Analyse SDS-PAGE de l'isolation membranaire via un protocole modifié lors du lavage de *Myxococcus xanthus* DZ2 OMss-mCherry après la croissance en présence de 8-N<sub>3</sub>-Kdo.

Les différents échantillons contiennent des bactéries ayant reçu (Kdo +) ou non (Kdo -) de 8-N<sub>3</sub>-Kdo. Les deux premiers échantillons ont subi une chimie click à 4 °C tandis que les deux derniers à 10 °C. Après l'extraction de billes magnétiques (DBCO) étant censées se fixer à ce groupement -N<sub>3</sub>, les deux premiers échantillons sont lavés 3 fois par du PBS tandis que les deux derniers échantillons sont lavés par du TPM. Les échantillons sont ensuite supplémentés de Laemmli DTT 1× permettant de briser les liens disulfures des protéines. Un chauffage de 10 minutes à 65 °C nous permet d'obtenir les échantillons prêts. Les protéines sur gel 12% de polyacrylamide (fluorescence sur gel), ainsi qu'une échelle de poids moléculaire Fisher BioReagents EZ-RUN Pre-stained Rec Protein effectuent leur migration à 80 V durant 30 minutes puis après avoir traversé le stacking gel, les échantillons continuent leur migration à 120 V durant 1 heure. L'image du gel se fait à l'aide d'un Typhoon FLA 9000 puis après la coloration du gel, une image est prise par un Geldoc (Biorad). Les puits + contiennent du DZ2 + 8-N<sub>3</sub>-Kdo et les puits - contiennent DZ2 seulement. ( $n=3$ )

### 3.2 Isolation de la membrane d'une souche de *Myxococcus xanthus* exprimant *AgmU-mCherry* suite à l'ajout de 8-N<sub>3</sub>-Kdo.

En constatant l'absence de OMss-mCherry sur la plupart des gels (fluorescence) précédents, il semble que l'extraction ne fonctionne que dans certaines conditions bien précises où le photoblanchiment de la mCherry doit à être tout prix évité. Toutefois, les gels colorés à l'argent nous révèlent une extraction de matériel membranaire, mais

surtout une certaine non-spécificité de la méthode. Afin de vérifier cette spécificité, il a été suggéré de retenter l'expérience avec une souche de *M. xanthus* exprimant AgmU (un composant de la machinerie de gliding) ayant en C-terminal la protéine mCherry (AgmU-mCherry). La protéine AgmU (137 kDa) est hypothétiquement associée avec le feuillet périsplasmique de la ME car cette protéine a été détectée dans les VME (Nan *et al.*, 2010). Un même sucre exogène 8-N<sub>3</sub>-Kdo a été incorporé chez la bactérie dans un milieu CYE liquide. La solution bactérienne est alors fixée à une concentration représentant la phase de croissance adéquate pour la souche (DO<sub>600</sub> de 0,02). Nous avons tout de même tenté de vérifier si d'autres protéines ont pu être extraites en effectuant une coloration du gel par un kit d'argent. Encore une fois, nous assistons aux conséquences de l'extraction non spécifique de la méthode où la quantité de matériel extrait semble identique dans les lysats Kdo + et Kdo -.

Lorsque nous observons les profils de migration sur le gel SDS-PAGE (figure 3.6), le gel présente les profils de cellules traitées (Kdo +) et de cellules de contrôle (Kdo -). De plus, le gel présente l'autofluorescence à 17 kDa révélé par la présence de tampon Laemmli DTT 1×. L'absence de signal de fluorescence aux alentours de 155 kDa laisse croire que l'isolation a échoué. Cependant l'absence de contrôles pour le marqueur de membrane interne à 155 kDa, ainsi que l'absence d'un lysat de cellule entière nous indiquant que la construction chimérique *AgmU-mCherry* est viable dans la cellule nous empêchent d'affirmer avec certitude que l'isolation a échoué.

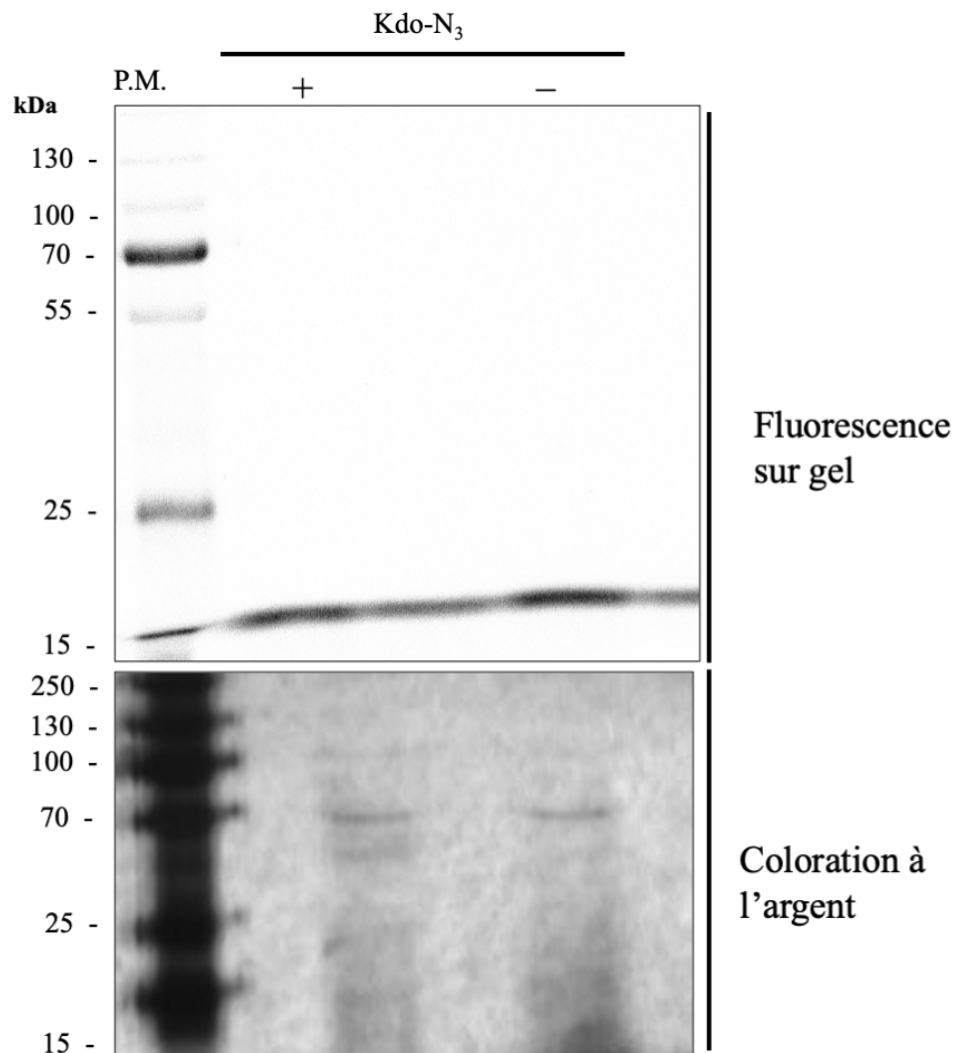


Figure 3.6 Analyse SDS-PAGE et coloration à l'argent de l'isolation membranaire de *Myxococcus xanthus AgmU-mCherry* après la croissance en présence de 8-N<sub>3</sub>-Kdo. Les 2 échantillons contiennent des bactéries ayant reçu ou non de 8-N<sub>3</sub>-Kdo. Après extraction de billes magnétiques (DBCO) étant censées se fixer à ce groupement -N<sub>3</sub>, les échantillons sont supplémentés de Laemmli DTT 1× permettant de briser les liens disulfures des protéines. Un chauffage de 10 minutes à 65 °C nous permet d'obtenir les échantillons prêts. Les protéines sur gel 12% de polyacrylamide (WB), ainsi qu'une échelle de poids moléculaire Fisher BioReagents EZ-RUN Pre-stained Rec Protein effectuent leur migration à 80 V durant 30 minutes puis après avoir traversé le stacking gel, les échantillons continuent leur migration à 120 V durant 1 heure. L'image du gel se fait à l'aide d'un Typhoon FLA 9000 puis après la coloration du gel, une image est prise par un Geldoc. Le puit + contiennent du AgmU mCherry + 8-N<sub>3</sub>-Kdo et les puits – contiennent AgmU mCherry seulement. (Biorad). Dû aux contrastes de l'image dans

les paramètres d'acquisition, le poids moléculaire de 155 kDa n'est pas visible au scanner Typhoon.

### 3.3 Comparaison phénotypique après l'ajout de 8-N<sub>3</sub>-Kdo chez *Myxococcus xanthus* $\Omega pilA$ .

De manière plus macroscopique on retrouve une différence lorsque l'on compare l'échantillon contrôle *M. xanthus*  $\Omega pilA$  ainsi que celui contenant du 8-N<sub>3</sub>-Kdo (figure 3.7). Les différentes souches ont été cultivées dans leurs phases de croissance exponentielle et observée après 24 h d'incubation. L'échantillon contrôle est plus trouble que celui ayant reçu du 8-N<sub>3</sub>-Kdo, mais ce qui est intéressant est la présence de biofilm sur les parois du tube contenant la souche ainsi que le saccharide. C'est la réapparition partielle de ce caractère (biofilm) qui est normalement absent chez  $\Omega pilA$ . Nous avons opté pour une souche  $\Omega pilA$  en dépit de la WT étant donné que la souche WT possède des pili et produit du biofilm participant à l'agrégation de la cellule, agrégation qui semble être contreproductif au succès de notre projet. Il aurait tout de même été intéressant d'inclure un contrôle *M. xanthus* WT.

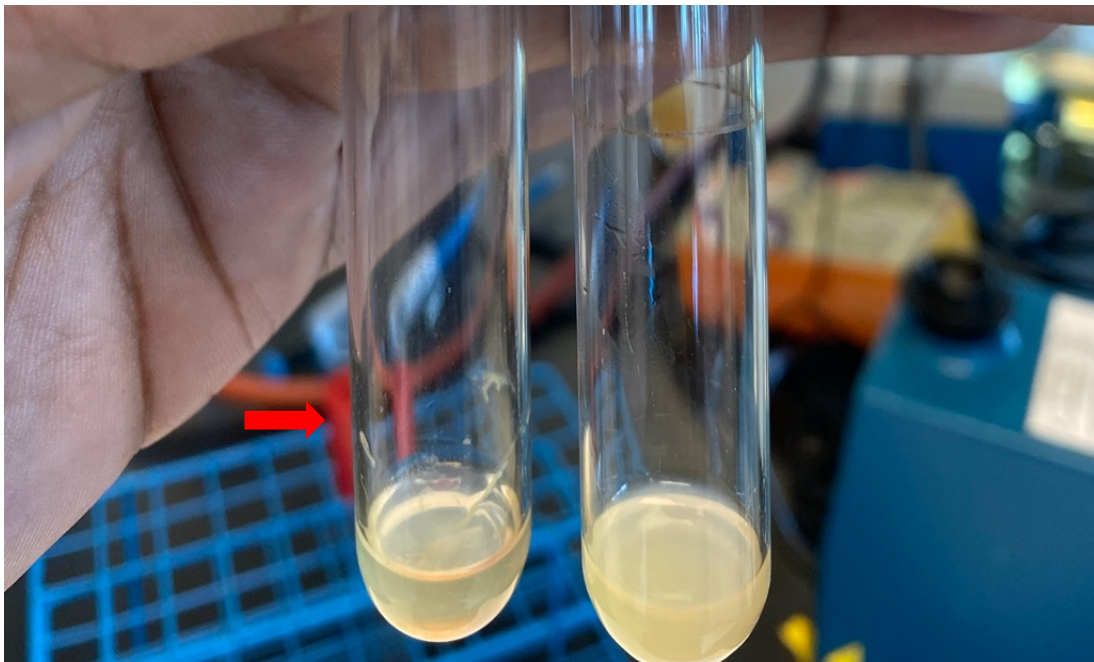


Figure 3.7 Effet phénotypique du 8-N<sub>3</sub>-Kdo chez *M. xanthus*  $\Omega pilA$ . Un échantillon de la souche *M. xanthus*  $\Omega pilA$  avec 8-N<sub>3</sub>-Kdo (à gauche), et un d' $\Omega pilA$  seul (à droite). Un volume de 1 mL de CYE liquide est ajouté ainsi que la quantité adéquate de cellule fixé à une DO<sub>600</sub> de 0,02. L'un reçoit du 8-N<sub>3</sub>-Kdo 5 mM dilué dans ddH<sub>2</sub>O milli q stérile et l'autre non. Les tubes sont scellés à l'aide de parafilm et incubés durant 48 heures à 32 °C sous une agitation à 220 rpm.

#### 3.4 Test d'agrégation sur un mutant *Myxococcus xanthus* $\Omega pilA$ suite à l'ajout de 8-N<sub>3</sub>-Kdo.

. La formation d'anneaux (biofilm) à l'intérieur des tubes de culture est liée à la présence d'EPS et la fonctionnalité des T4Ps (Saïdi *et al.* 2021). La théorie de l'autoagrégation survient étant donné qu'à chaque tentative d'extraction nous obtenions du matériel cellulaire non spécifique qui étaient extraites avec nos billes, l'idée a donc été testée dans le but de déterminer s'il s'agissait de la présence globale d'EPS (absent dans les souches  $\Omega pilA$ ) et/ou l'ajout de 8-N<sub>3</sub>-Kdo qui rendait les cellules collantes. C'est dans cet esprit qu'il a été suggéré d'incorporer du 8-N<sub>3</sub>-Kdo dans une souche mutante *Myxococcus xanthus*  $\Omega pilA$  donc, dépourvu de pilus (et où l'EPS est nulle) afin d'avoir une idée plus claire sur les conséquences de la supplémentation de 8-N<sub>3</sub>-Kdo chez la bactérie. Nous avons tenté d'utiliser *Myxococcus xanthus*  $\Omega pilA$  comme un contrôle et voir si la présence de 8-N<sub>3</sub>-Kdo exercerait une influence sur la souche. Lorsqu'on analyse le graphique, on constate que même avec une légère séparation entre les deux traces, il n'y avait pas de différence statistique significative entre les points d' $\Omega pilA$  ayant poussé avec/sans 8-N<sub>3</sub>-Kdo. En effet, ce graphique démontre que même légère, à travers le temps, l'échantillon contenant du 8-N<sub>3</sub>-Kdo a tendance à s'agglutiner, et cela même avec une souche où le gène codant pour le pilus (il permet l'adhésion et facilite l'agglutination avec d'autres cellules) a été inactivé. Il aurait été intéressant d'avoir un contrôle WT DZ2 avec 8-N<sub>3</sub>-Kdo.

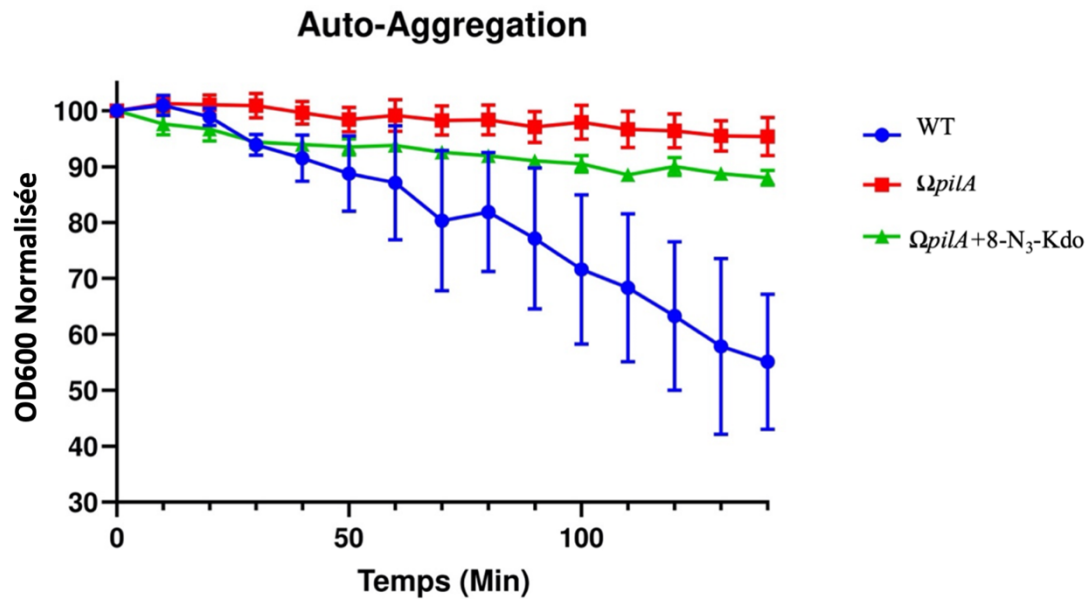


Figure 3.8 Analyse de l'agrégation d'une souche mutante *Myxococcus xanthus*  $\Delta pilA$  après l'ajout de 8-N<sub>3</sub>-Kdo.

Les 2 échantillons contiennent des cellules venant de cultures de *M. xanthus* ayant reçu ou non de 8-N<sub>3</sub>-Kdo. Un échantillon de *M. xanthus* DZ2 a aussi été utilisé comme contrôle. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard par rapport à la moyenne. Il n'y a pas de différence significative entre l'agrégation de la souche *Myxococcus xanthus*  $\Delta pilA$  avant et après l'ajout de 8-N<sub>3</sub>-Kdo déterminée via two way ANOVA ni de comparaison de test multiple ( $p > 0,05$ ). ( $n=4$ )

### 3.5 Analyse de la production d'exopolysaccharide chez différentes souches de *Myxococcus xanthus*

Dans la continuité de mon hypothèse, à savoir que la souche s'agrège et que la liaison des billes est non-spécifique ainsi que sur la base des résultats présentés dans la figure 3.7, il a été proposé de faire un test en utilisant la méthode de coloration par Trypan bleu. En effet, ce composé a pour but de quantifier la proportion d'EPS sur la surface d'une cellule de *M. xanthus*. Les résultats opposants des souches WT et  $\Delta pilA$  ont révélé la souche  $\Delta pilA$  retient beaucoup moins de Trypan bleu versus la souche WT. En d'autres mots, la production d'EPS est moindre chez  $\Delta pilA$  comparativement au contrôle (par exemple 3% versus 100%). Néanmoins, il semble que la machinerie de production d'EPS/biofilms soit partiellement activée lors

de la croissance de cellule en présence de 8-N<sub>3</sub>-Kdo (figure 3.9). Effectivement, une augmentation se remarque, et cela lors de trois répliquas validant ainsi l'effet observé. Cela pourrait exercer une influence directe sur l'agrégation pilus dépendante. Nous avons pré valorisé l'utilisation du WT afin de prouver que la souche s'autoagrée naturellement, mais d'autre part il aurait été intéressant de montrer que ce phénomène s'accroît en présence de 8-N<sub>3</sub>-Kdo.

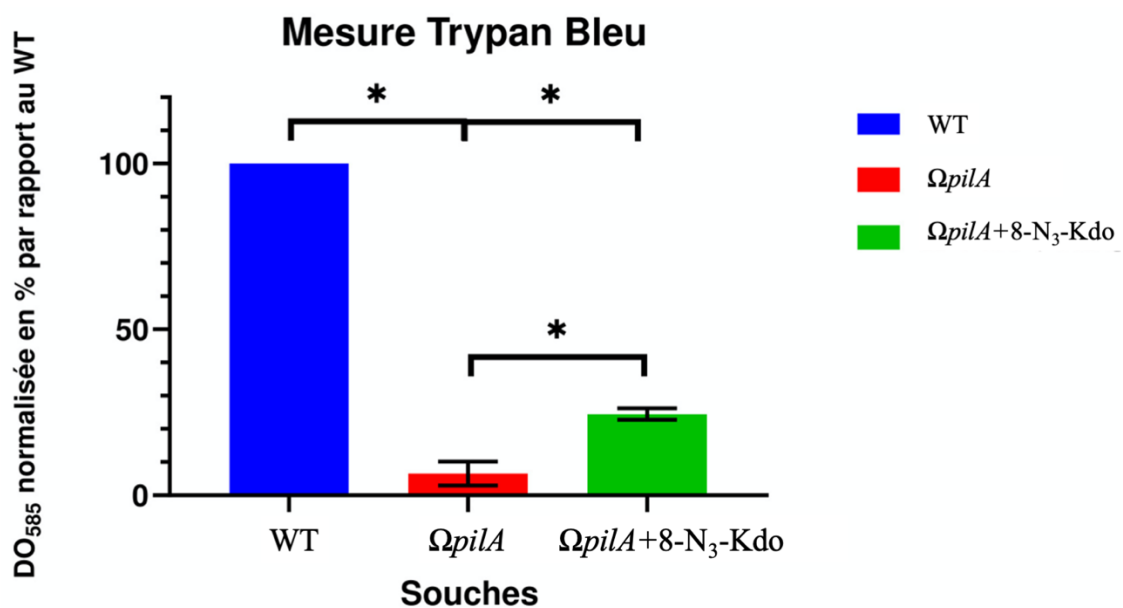


Figure 3.9 Proportion d'exopolysaccharide fixé par le trypan bleu chez les souches WT et  $\Delta pilA$  de *M. xanthus*.

La moyenne des absorbances à 595 nm de triplicatas de WT,  $\Delta pilA$  et  $\Delta pilA + 8-N_3-Kdo$ , ont été normalisée par rapport au WT afin de pouvoir analyser et comparer la mesure du trypan bleu indiquant la proportion relative en EPS sur la surface. Les barres d'erreur représentent l'erreur type par rapport à la moyenne. La différence significative représente la comparaison entre un échantillon avec et sans la supplémentation de 8-N<sub>3</sub>-Kdo ( $p < 0.05$ ). ( $n=3$ )



### 3.6 Test phénotypique basé sur la motilité sociale chez des souches mutantes de *Myxococcus xanthus*

Afin d'avoir une idée plus claire sur ce phénomène de production d'EPS, des cellules  $\Omega pilA$ , poussées dans la présence/absence de 8-N<sub>3</sub>-Kdo, ont été déposées sur des géloses d'agar à 0,5 %. Ces géloses sont utilisées pour analyser la motilité sociale, qui repose sur le fonctionnement des T4Ps ainsi que la présence d'EPS sur la surface des cellules. Après 24 h, le WT montre la présence de « bras » dans les essais observée, preuve qu'il y a de la motilité, mais l'aspect qui nous intéresse est celui présent après 72 h : la motilité sociale (figure 3.10). Chez le  $\Omega pilA$ , il semble que ce phénomène est inhibé. Il n'y a pas de pilus, la colonie présente une apparence lisse. Cependant, ce phénotype semble réapparaître lorsque le Kdo est ajouté, on peut apercevoir de courts essais sur les extrémités. Il est à noter que ce test est qualitatif et non quantitatif, il n'est donc pas possible d'affirmer que la présence de Kdo chez  $\Omega pilA$  donne une meilleure proportion de trypan bleu fixé ou même égal à la souche contrôle (figure 3.9). Pour cela, il faudrait effectuer une étude plus poussée concernant le pilus uniquement.

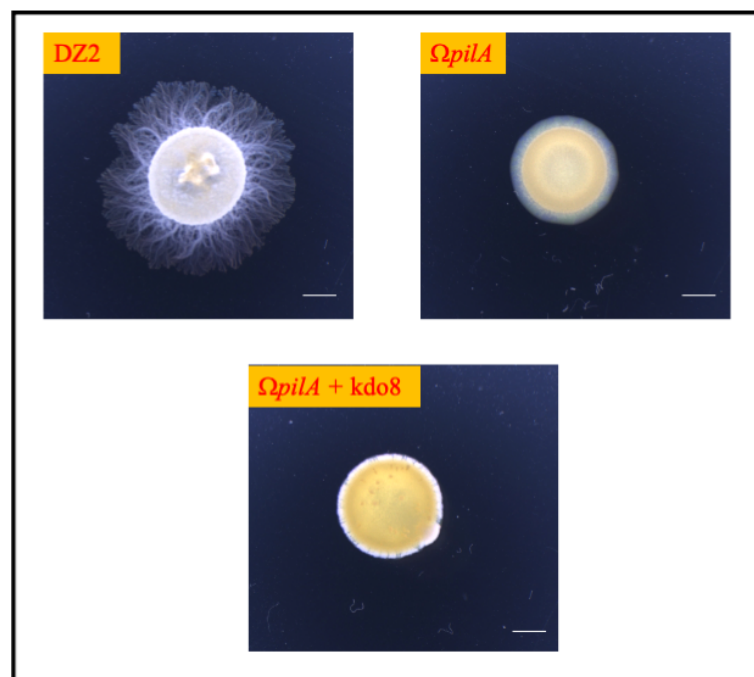


Figure 3.10 Image illustrant la motilité sociale (T4P) à 72 h.

Un échantillon de *M. xanthus* DZ2 (haut à gauche), de *ΩpilA* (haut à droite) et de *ΩpilA* supplémenté avec du 8-N<sub>3</sub>-Kdo (en bas) sont ajoutés dans 15mL de CYE liquide chacun et incubés à 32 °C sous une agitation de 200 rpm durant 72 heures. Après diverses étapes de centrifugation, la culture est fixée à une DO<sub>600</sub> de 0,5 dans du TPM. Ensuite, 5 μL est ajouté sur une gélose 0,5% agar. La gélose est ensuite incubée à 32 °C et des photos sont prises à 48 heures et à 72 heures à l'aide d'un microscope stéréoscopique Olympus SZX16 équipé d'un système de caméra UC90 4K. Échelle 2 mm

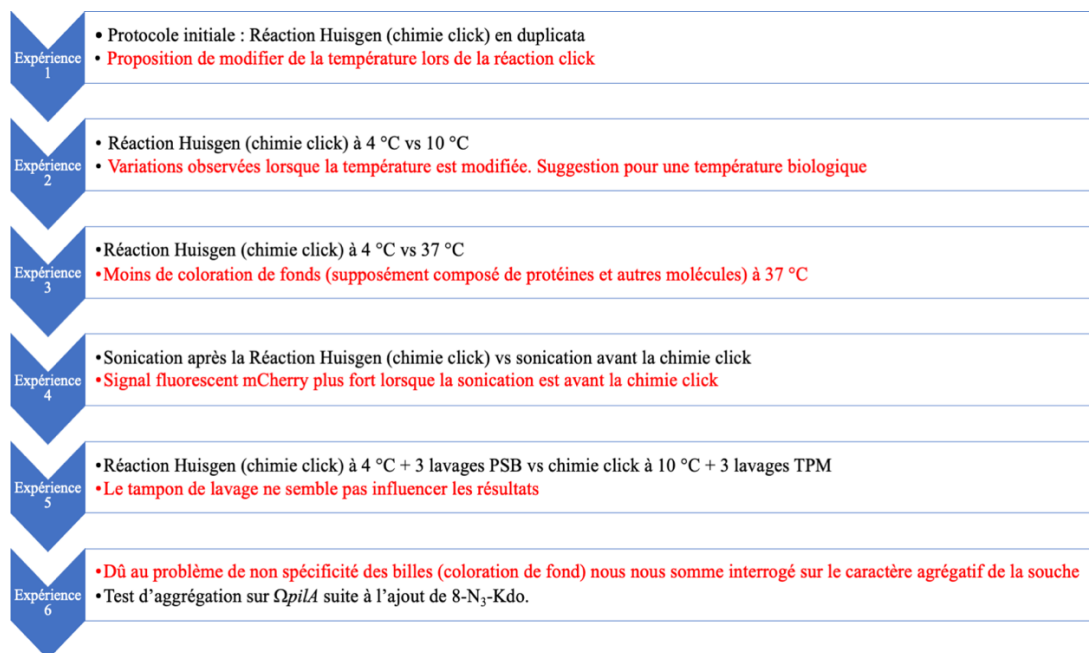


Figure 3.11 Schémas résumé représentant la succession des étapes modifiées/optimisées lors de la séparation des membranes externes et des billes réactives DBCO attachées au 8-N<sub>3</sub>-Kdo.

Dans notre protocole initial, il s'agissait de faire une cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre une molécule de LPS (ayant intégré un 8-N<sub>3</sub>-Kdo) situé sur la membrane externe bactérienne et des billes réactives de DBCO. Après leurs migrations sur gel 12% de polyacrylamide, les premiers résultats montrent des taches de coloration dans les échantillons sans et avec 8-N<sub>3</sub>-Kdo. Dès lors nous avons tenté d'optimiser notre protocole d'extraction en faisant varier plusieurs paramètres dans le but de n'obtenir des taches de coloration (matériels cellulaires contenant des protéines et glycoprotéines) essentiellement dans les essais de couplage contenant du 8-N<sub>3</sub>-Kdo

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION

La ME bactérienne est le premier contact entre la cellule et l'environnement qui l'entoure. L'étude de son rôle et de sa dynamique est un sujet controversé, mais de récentes études ont permis de caractériser celle-ci à travers diverses méthodes d'extraction de la membrane externe (présentées en introduction). Son rôle de barrière de défense reflète déjà son importance chez la cellule. D'autres molécules telles que des protéines membranaires n'ont cependant toujours pas été identifiées, compte tenu de leurs divers rôles de protection, transports et même induction de signaux immunitaires, ils restent des éléments importants et essentiels à la survie de la cellule. Ainsi, il est primordial de comprendre leurs fonctionnements.

En effet, selon un rapport émis par l'OMS en 2018, les taux de résistance à la pénicilline ont augmenté de 51% cette dernière décennie (OMS, 2018). Ce taux concerne pour la plupart des bactéries à Gram négatives. Dû à son dynamisme au niveau de sa membrane où l'on retrouve échanges (une souche, qui par simple contact avec une autre cellule, obtient une protéine membranaire qu'elle n'avait pas) et communication, la *M. xanthus*, a donc été un modèle désigné dont les caractéristiques et propriétés étaient supposées nous permettre de développer une nouvelle méthode nous permettant d'isoler, d'identifier et surtout de caractériser ces protéines membranaires.

#### 4.1 Purification axée sur un LPS modifié

La première démarche pour mener à bien le développement d'une nouvelle méthode d'étiquetage de la ME bactérienne consistait à l'incorporation du 8-N<sub>3</sub>-Kdo

au LPS. Nous avons pour cela eu recours à trois modèles bactériens étant une souche modifiée d'une souche sauvage *M. xanthus* DZ2 OMss-mCherry, une souche *M. xanthus* AgmU-mCherry et une souche *M. xanthus*  $\Omega pilA$  ayant en commun une protéine mCherry chimérique qui est fusionnée à un motif (OMss ou AgmU) lui permet de s'intégrer dans ou s'associer avec le feuillet périplasmique de la ME. Sur la base de l'étude menée par Saïdi *et al* en 2022 et des résultats prometteurs, nous avons substitué le réactif fluorescent. En effet l'outil qui nous permettrait cette extraction membranaire, la molécule de sucre synthétique 8-N<sub>3</sub>-Kdo, peut être absorbé par les cellules Gram négatives et incorporées dans des chaînes oligosaccharides des LPS contenant normalement du Kdo natif, lors de la biosynthèse de ceux-ci. Les figures 3.7 et 3.10 montrent d'un aspect phénotypique la présence de ce sucre exogène chez une souche.

Une fois le 8-N<sub>3</sub>-Kdo ajouté aux souches, nous avons tenté de valider la purification protéique par l'intermédiaire de la chimie click effectué entre le groupement DBCO associé aux billes magnétiques et le -N<sub>3</sub> du nouveau Kdo. Un contrôle tel que la chimie click avec un réactif fluorescent effectué par Nilson (2017) aurait été idéal afin de confirmer avec certitude que le 8-N<sub>3</sub>-Kdo se serait incorporé au LPS. Ce contrôle aurait dû être effectué et non pris pour acquis lors fondement de notre protocole d'extraction. Par ailleurs certains résultats comme ceux de la figure 3.3 sont difficilement interprétable étant donné que la bande correspondant à la mCherry dans le puit « cellule entière » est manquant. Par la suite, il aurait été critique de procéder à des analyses d'imagerie de microscopie à fluorescence pour démontrer l'expression de mCherry à la membrane externe (OMss) ou à la membrane interne (AgmU). Ce qui est primordial afin de valider l'expression et la localisation des protéines en question. Cela aurait été une aide concernant les résultats de la figure 3.1 à 3.6. Cette méthode de fluorescence semble aussi avoir fait ses preuves dans une étude rapportée par Mas *et al*. En effet, leurs résultats démontrent qu'ils sont parvenus à incorporer un dérivé de Kdo dans le LPS d'une bactérie à gram négatif en l'occurrence la *Legionella pneumophila* et l'ont vérifié par imagerie fluorescente (Mas *et al.*, 2014). Dans notre cas, la visualisation de gels d'acrylamide présentant la migration des échantillons se

trouve être le moyen le plus apte pour répondre à cet objectif. Les résultats des figures 3.1 à 3.6 en attestent. En effet, nous nous attendions à voir la présence d'une bande aux alentours de 25 kDa, tel que dans la figure 3.4, soulignant le signal de OMss-mCherry (Kuduğ, H. *et al.*, 2019) tandis que mis à part les bandes observées sur la figure 3.4, aucun autre gel ne présentait de signe de la mCherry. Au départ, nous avons cru que la protéine avait subi un photoblanchiment, cependant en visualisant le gel à différents contrastes nous avons rapidement écarté cette hypothèse, néanmoins au vu des résultats rapportés par la figure 3.4 il semble que la migration dans un milieu en absence complète de lumière puisse porter des fruits. Les causes exactes de ce phénomène que l'on a retrouvé sur la majorité de nos gels n'ont pas encore été élucidées. Par souci d'efficacité, il a été suggéré de vérifier la limite de la méthode développée avec un motif présentant le AgmU-mCherry. Se retrouvant probablement associée avec la ME sur le côté périplasmique, l'absence de ce signal fluorescent dans la figure 3.6 présente l'incertitude que le protocole d'isolation de la ME a bien fonctionné. Il manque un important contrôle ici, soit un lysat d'un extrait cellulaire complet qui permet de confirmer la viabilité et l'expression de AgmU-mCherry. De l'imagerie à fluorescence serait également pertinente. Il semble, cependant, y avoir un souci de spécificité au niveau des billes et le matériel membranaire isolé. Ceci peut être expliqué par un manque d'efficacité et une inconsistance du protocole ou alors une agrégation de la souche (figure 3.8) se faisant à travers le temps rendant l'extraction beaucoup plus délicate. Ce point est exploité dans les figures (figures 3.8 et 3.9). Ensuite, ces mêmes gels sont récupérés et traités par une coloration à l'argent, cette méthode plus sensible que la coloration au bleu de Coomassie, nous aurait permis de détecter les protéines extraites en plus de la mCherry. En effet, l'imprégnation du gel avec le nitrate d'argent constitue l'étape basique et permet de révéler les protéines et glycoprotéines (Tsai et Frasch, 1982) nommées : taches de coloration tandis que le thiosulfate de sodium présent dans la solution de prétraitement et de développement empêche la coloration de la surface et donne un fond clair aux échantillons (Nesterenko, M. *et al.*, 1994). Les colorations de fond que l'on voit sur les gels sont des protéines, étant donné que les

mêmes protéines sont extraites en présence et en absence de 8-N<sub>3</sub>-Kdo cela pointe vers une liaison non spécifique des protéines aux billes indiquant principalement que la méthode développée est non-spécifique.

Aux vues de la fluorescence sur gel et la coloration à l'argent non concluante, ces liaisons non spécifiques observées sur les gels viennent souligner un point important qu'est l'agrégation dans notre expérience. En effet, des études ont rapporté que *M. xanthus* avait un caractère agrégatif régulé par les gènes *mrpB* et *mrpC* (Sun et Shi, 2001) et c'est notamment cette agrégation que l'on observe dans la figure 3.8. Il semble que le 8-N<sub>3</sub>-Kdo tend d'une manière ou d'une autre à rehausser la production d'EPS responsable de biofilm et donc de l'agrégation rendant l'extraction de la membrane externe plus ardue.

#### 4.2 Rôle et production d'EPS

L'exopolysaccharide (EPS) est une longue chaîne constituée de sucres successifs étant principalement du glucose, du galactose et du rhamnose (Mozzi *et al.*, 2001). Cette chaîne a pour capacité de se détacher des cellules bactériennes afin de créer l'adhésion aux différentes surfaces. D'autres fonctions lui sont attribuées telle la formation de biofilm tout comme l'indique la figure 3.6. Nous avons préconisé le test au Trypan bleu permettant de quantifier la production d'EPS (Saïdi *et al.*, 2022). En effet, il est constaté que le trypan bleu a fixé une quantité conséquente d'EPS chez la souche WT (DZ2) comparativement à une souche  $\Omega pilA$  dépourvue de pilus. Le pilus T4P est, lui, impliqué dans la motilité S ainsi que dans la production d'EPS (Saïdi *et al.*, 2021). La littérature nous révèle que l'EPS est un polymère sécrété spécifique à la *M. xanthus* et qu'il est important pour la propagation des essaims dépendant de T4P, ce qui est expliqué dans les figures 3.8 et 3.10. La présence de pilus chez les souches WT a directement eu une incidence sur l'agglutination. On peut voir que lorsque les pili sont excisés chez la souche  $\Omega pilA$ , la quantité d'EPS diminue considérablement. En effet, une mutation sur les gènes codant

pour l'activation de la voie Wzx/Wzy-dépendante permet d'inhiber la production d'EPS. Cependant, il semble y avoir un rehaussement de la production d'EPS indépendant de la réactivation de cette machinerie lors de la supplémentation par du 8-N<sub>3</sub>-Kdo (Lu *et al.*, 2005). La présence de biofilm sur le tube présent dans la figure 3.7 est un autre indicateur de cet effet. Malgré le fait qu'on sait que la production d'EPS chez *M. xanthus* est régulée en partie par la voie chimiosensorielle Dif, la voie Dif dans la régulation d'EPS reste à découvrir (Black *et al.*, 2006). Il n'y a donc pas moyen de certifier que le 8-N<sub>3</sub>-Kdo interagit avec cette voie.

#### 4.3 Effet du 8-N<sub>3</sub>-Kdo sur la motilité sociale

La motilité sociale décrit un comportement propre aux *M. xanthus*. Elle définit le mouvement d'un groupe de cellules liées les unes aux autres. La rétraction des pili de type IV (T4P) est requise afin d'exercer la motilité S, l'EPS se trouvant sur la matrice extracellulaire des cellules voisines est suggérée pour fournir une ancre et un déclencheur pour la rétraction de T4P (Black *et al.*, 2006). D'un point de vue phénotypique, lors de l'ajout de 8-N<sub>3</sub>-Kdo chez une souche  $\Omega pilA$  (bordure de l'essaim est lisse), il semble y avoir un phénotype différent que lorsque la cellule est sans 8-N<sub>3</sub>-Kdo (figure 3.10). En effet, après 72 heures (figure 3.8), il semble que l'agrégation tend vers la hausse, n'affirmant en rien que la motilité sociale est rétablie en présence du sucre. En effet, il ne faut pas oublier qu'une insertion d'un fragment est faite dans le gène *pilA*, ce qui l'inactive et empêche la production de la sous-unité principale du pili : la piline. D'où l'impossibilité de déduire que le 8-N<sub>3</sub>-Kdo rétablit cette motilité sociale en stimulant la production de la piline. Malgré ce point négatif, il semble néanmoins que, la production d'EPS est partiellement rétablie chez  $\Omega pilA$  en présence du sucre exogène (figure 3.9). Malgré une certaine tendance visible, les tests d'agrégation ne semblent pas avoir de différence statistique permettant d'affirmer avec certitude que le 8-N<sub>3</sub>-Kdo augmente l'agrégation, il faudrait d'avantage d'essai ainsi

qu'un meilleur contrôle tel que l'agglutination de WT DZ2 en présence de 8-N<sub>3</sub>-Kdo qui nous permettrait d'avoir des résultats solides et concis.

Même si nos résultats ne le montrent pas clairement, selon une étude menée par Black *et al* en 2006, il y a confirmation que l'EPS et le pilus TP4 influencent l'agrégation. Dans notre cas, la souche  $\Omega pilA$  est dépourvu de pilus ce qui dans une préparation cellulaire montre l'absence d'un anneau sur les parois d'un tube (biofilm). Toutefois, cet anneau refait surface lors de l'ajout de 8-N<sub>3</sub>-Kdo dans l'échantillon (figure 3.7). De plus, la texture du mélange lors du chargement dans le gel d'électrophorèse est plus collante et visqueuse que le WT. C'est un point qui pourrait expliquer pourquoi le protocole d'isolation n'a pas fonctionné. Néanmoins, les résultats obtenus ne sont pas suffisants pour affirmer que le 8-N<sub>3</sub>-Kdo a pour capacité de réactiver la machinerie Wzx/Wzy responsable de la production d'EPS. Il faudrait faire des tests plus poussés tout en ayant recours à de doubles mutants tels *difApilA* (le mutant contient un gène *nafA*, ce qui inhibe la production d'EPS) (Black *et al.*, 2006). Il semble que la motilité « *gliding* » des cellules subit aussi des perturbations (Annexe A).

#### 4.4 Limites et optimisation de la nouvelle méthode

Dès les premiers résultats (figure 3.1), les gels ainsi que leurs colorations d'argent révèlent l'absence du signal OMss-mCherry à 25 kDa ainsi que de l'autofluorescence du tampon Laemmli à 17kDa permettent d'affirmer que la membrane externe n'est pas extraite. Étant donné la localisation de la protéine mCherry dans le feuillet externe sur la membrane externe de la *Myxococcus*, il a été jugé de vérifier si l'extraction n'a pas pu se faire même sur des protéines se trouvant dans le feuillet interne de la membrane, d'où le test de la figure 3.6. L'image du gel obtenu à l'aide d'un numériseur révèle notamment l'absence de tout signal fluorescent et la coloration à l'argent affirme ce constat par l'absence complète de protéines dans



l'échantillon. Nous avons aussi remarqué qu'il y avait d'importantes différences au niveau des quantités de protéines extraites entre chaque gel. Il serait important de déterminer si ces différences proviennent de la variation dans les rendements des protéines isolées, dans les concentrations de protéines, dans l'efficacité de coloration à l'argent, ou des changements dans les paramètres d'acquisition (par exemple, un changement dans le voltage du TPM du Typhoon 9000 ou dans le temps d'acquisition pour les acquisitions au Geldoc.

Compte tenu de la découverte mettant en relation la production d'EPS et la présence de 8-N<sub>3</sub>-Kdo dans les échantillons, tout porte à croire que la molécule de DBCO associée aux billes magnétiques n'a pu agir correctement. Le caractère agrégatif des *M. xanthus* a sans doute empêché de rendre disponible le groupement -N<sub>3</sub> du 8-N<sub>3</sub>-Kdo entraînant sûrement une liaison avec d'autres composants. Encore une fois, ces hypothèses sont suggestives, mais des tests sont en cours, notamment la détection par imagerie à fluorescence dans le but de démontrer l'expression de la mCherry à la membrane externe ainsi que la protéine AgmU à la membrane interne, ce qui nous permettrait de corrélérer avec les résultats obtenus dans l'étude de Saïdi *et al* (Saïdi *et al.*, 2022), de vérifier si la construction chimérique AgmU-mCherry est viable chez la *M. xanthus* et d'avoir une base solide concernant nos constats. Ainsi que l'ajout des divers contrôles absent lors de nos résultats. Le contrôle fait de cellule entière a fait sujet de débat lors de nos expériences, en effet, les résultats de la figure 3.1 nous ont dissuadés de l'ajouter a nos autres gels, pas parce qu'il n'était pas pertinent, mais parce que le lysat ne se précipitait pas dans le puits attribué et cela faussait la migration et l'expression de la mCherry et ce, pareillement en présence de glycérol.

Les différentes optimisations illustrées dans les figures 3.2 à 3.6 à savoir : la température d'incubation de la chimie click à 4 °C, le lavage des échantillons par du tampon PBS, la migration dans l'obscurité ainsi que les étapes de la sonication nous aurait permis d'établir un protocole de base afin de contrer non seulement l'extraction non spécifique ayant été récurant, mais aussi l'absence majeure du signal de la mCherry

dont le signal était attendu à 25 kDa. Cependant au vu des résultats des gels de coloration à l'argent et tests d'agrégation, il aurait été intéressant d'utiliser des méthodes afin de tenter d'isoler des colonies par l'intermédiaire de détergents (réduisant les interactions hydrophiles) après avoir eu recours à la réaction « click », des substances à concentration élevée en sels ou alors ajouter des tampons de pH différent du pI de la protéine d'intérêt. Cette approche rapide a pour capacité de contrer l'agrégation (Arakawa *et al.*, 2004). Aussi telle cité précédemment, nous aurions pu avec une souche *M. xanthus* WT, vérifier premièrement que la méthode de Nilson (Chimie click) fonctionne avec une molécule de Kdo couplée à une protéine fluorescente, le tout serait vérifié et visualisé par imagerie microscopique à fluorescence préalablement. Ce contrôle serait un moyen d'affirmer que le nouveau 8-N<sub>3</sub>-Kdo est viable et peut s'incorporer dans la molécule de LPS. Ceci est un contrôle manquant qui aurait dû être effectué et aurait contribué à la bonification de mon projet.

Au vu de l'étude, la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen ainsi que l'utilisation de 8-N<sub>3</sub>-Kdo restent optionnel afin d'isoler des protéines membranaires bien que la méthode requière des optimisations. En effet, le gel de la figure 3.4 démontre que la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen fonctionne. C'est ce qu'on observe par la présence du signal fluorescent mCherry à 25 kDa. Cependant, au vu du caractère agrégatif de la bactérie *M. xanthus* et des résultats obtenus lors de la coloration des gels restants, la molécule de Kdo ne semble pas être le meilleur choix concernant une méthode axée sur l'extraction de protéines membranaire bactérienne.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Pour conclure, ce projet de recherche présenté dans ce mémoire avait pour but de développer une nouvelle technique permettant d'isoler les protéines de la ME d'une bactérie afin de les identifier et de les caractériser. De ce fait, nous avons utilisé un Acide 3-désoxy-D-manno-oct-2-ulosonique (Kdo) modifié chimiquement de façon à avoir un groupement  $-N_3$  que nous avons incorporé dans la molécule de LPS exprimé sur le feuillet externe de la membrane externe des cellules *Myxococcus xanthus* DZ2. Après les premières tentatives d'extraction, la présence de protéines et de matériel membranaire dans les lysats tant traité et non traité au 8- $N_3$ -Kdo est sujet de questionnement. D'autant plus que l'absence de signal de fluorescence provenant de la protéine mCherry.

Afin de vérifier la spécificité de la méthode à savoir l'extraction exclusive de la ME, la prochaine tentative s'est fait sur une souche *Myxococcus xanthus* où le fluorochrome est exprimé sur la membrane interne de la cellule. Il s'avère qu'aucun signal n'est détecté. Cependant, la coloration à l'argent révèle que quelque chose s'est accroché aux billes. Cette hypothèse n'a pas abouti par manque de résultat, mais montre la non-spécificité des billes utilisées. Les gels colorés à l'argent viennent confirmer qu'une extraction non spécifique a lieu (une tache de coloration sur les profils migratoires avec et sans 8- $N_3$ -Kdo. De plus le manque crucial de contrôle vient pallier les défaillances de notre protocole.

Ensuite, en observant l'aspect collant et visqueux (lors du chargement sur le gel permettant l'électrophorèse) qu'avait les lysats recevant le 8- $N_3$ -Kdo, il a été suggéré d'utiliser la méthode sur une souche de *M. xanthus* n'ayant pas de pili. C'est à ce moment que la théorie sur l'agrégation procurée par les pili et l'EPS entre en vigueur (figure 3.8). De plus, la détection de marquage avec le Trypan bleu d'*Ωpila* ayant poussée en présence de 8- $N_3$ -Kdo comparé à ceux sans 8- $N_3$ -Kdo suggère qu'il y a un peu plus d'EPS dans ces premières cellules. Cela pourrait expliquer la présence de biofilm sur le tube de la figure 3.7.

Bien que l'aspect agrégatif de la souche soit un obstacle, la *Myxococcus* semble le meilleur modèle dans le cadre de cette étude, il serait seulement plus adapté de recourir à des billes ayant une meilleure sélectivité protéique.

Une étude similaire effectuée sur des *E. coli* K12 impliquant le marquage d'un fluorochrome Alexa fluor 488 et ayant subi une réaction « click » par le cuivre CuAAC afin d'incorporer un 8-N<sub>3</sub>-Kdo a mis en avant les forces de cette méthode. En effet, un signal fluorescent a non seulement été détecté en périphérie des cellules, mais a aussi permis de certifier que le marquage de la cellule se fait via le LPS (Dumont *et al.*, 2012). Il serait judicieux d'avoir recours à des billes spécifiques au LPS au complet ou alors, il faudrait vérifier de manière pointilleuse la proportion de fragments de membrane exprimant à leur surface le 8-N<sub>3</sub>-Kdo par l'intermédiaire d'images tout comme le présente Ramson dans son étude sur l'utilisation de mCherry pour la localisation de protéine et de certains gènes (Ramson, 2015).

Les nombreuses inconsistances de notre méthode et le manque de contrôles nous révèlent que plusieurs optimisations ne seraient de trop. En effet, afin d'assurer un meilleur rendement et d'éviter le facteur « agrégation », les souches *Myxococcus xanthus* *OpilA* pourrait être isolé par divers détergents afin de piéger les fragments, avant de poursuivre l'extraction. Étant donné que certaines molécules membranaires sont propres à la *M. xanthus*, on pourrait avoir recours à des anticorps mononucléaux afin de marquer des molécules de surface (LPS) puis les identifier par des Western blot (Fink et Zissler, 1989). Ces analyses Western Blot auraient permis de valider la spécificité de la méthode d'expression, en ciblant des protéines localisées exclusivement au niveau de la membrane externe, au cytosol et à la membrane interne. Enfin, bien que de trop, une analyse par chromatographie aurait permis de définir si la proportion de cellules exprimant le 8-N<sub>3</sub>-Kdo nouvellement synthétisée est moindre ou non comparativement aux fragments non essentiels afin d'éviter les colorations de fond. Il serait aussi intéressant de vérifier la protéine mCherry est suffisamment stable pour maintenir sa structure et sa fonction après les diverses incubations.

## ANNEXE A

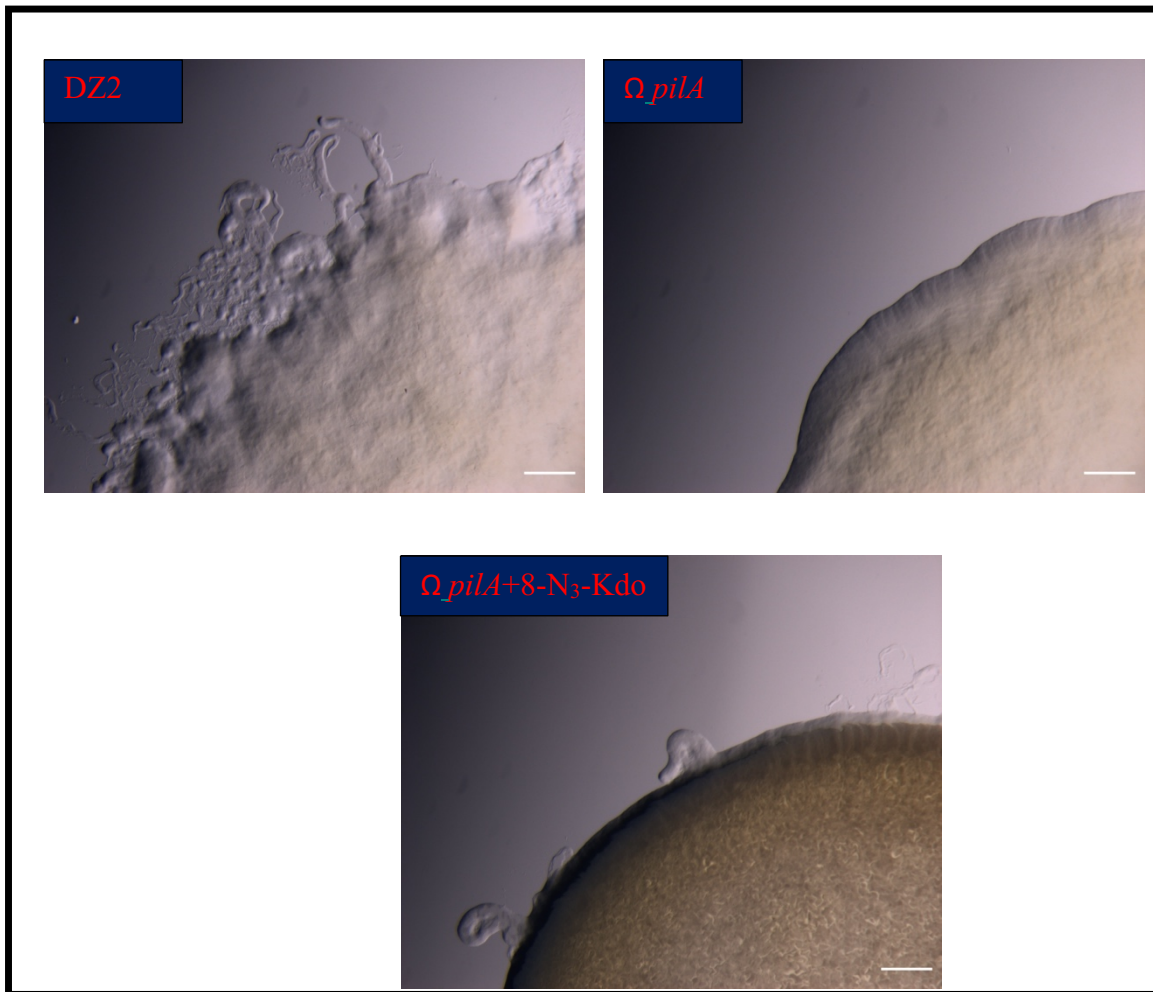


Figure S1. Image illustrant la motilité de type *gliding* à 24 h chez *Myxococcus xanthus*. Un échantillon de *M. xanthus* DZ2 (haut à gauche), de  $\Delta pilA$  (haut à droite) et de  $\Delta pilA$  supplémenté avec du 8-N<sub>3</sub>-Kdo (en bas) sont ajoutés dans 15mL de CYE liquide chacun et incubé à 32 °C sous une agitation de 200 rpm durant 24 heures. Après diverses étapes de centrifugation, la culture est fixée à une DO<sub>600</sub> de 0,5 dans du TPM. Ensuite, 5  $\mu$ L sont ajoutés sur une gélose 0,5% agar. La gélose est ensuite incubée à 32 °C et des photos sont prises après 24 heures à l'aide d'un microscope stéréoscopique Olympus SZX16 équipé d'un système de caméra UC90 4K. Échelle 15 $\mu$ m

## BIBLIOGRAPHIE

- Ajamian, F., Ilarraza, R., Wu, Y., Morris, K., Odemuyiwa, S. O., Moqbel, R., & Adamko, D. J. (2020). CCL5 persists in RSV stocks following sucrose-gradient purification. *Journal of Leukocyte Biology*, *108*(1), 169-176.
- Albers, S.-V., & Meyer, B. H. (2011). The archaeal cell envelope. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(6), 414-426.
- Banerjee, P. K. (2008). *Introduction to Biophysics*. S. (1 ed.). Chand Limited.
- Bermejo, M. K., Milenkovic, M., Salahpour, A., & Ramsey, A. J. (2014). Preparation of synaptic plasma membrane and postsynaptic density proteins using a discontinuous sucrose gradient. *Journal of Visualized Experiments*, (91), e51896.
- Beveridge, T. J. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, *181*(16), 4725-4733.
- Black, M., & Shaevitz, J. (2021). Viscoelasticity of *Myxococcus xanthus* Fruiting Bodies. *Bulletin of the American Physical Society*.
- Black, W. P. (2005). *Regulation of Exopolysaccharide Production in Myxococcus xanthus* [Dissertation, Virginia Tech]. <http://hdl.handle.net/10919/30250>
- Black, W. P., Xu, Q., & Yang, Z. (2006). Type IV pili function upstream of the Dif chemotaxis pathway in *Myxococcus xanthus* EPS regulation. *Molecular Microbiology*, *61*(2), 447-456.
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., & Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(10), 620-630.
- Caro, F., Place, N. M., & Mekalanos, J. J. (2019). Analysis of lipoprotein transport depletion in *Vibrio cholerae* using CRISPRi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(34), 17013-17022.
- Chapot-Chartier, M.-P. (1996). Les autolysines des bactéries lactiques. *Le Lait*, *76*(1-2), 91- 109. <https://doi.org/10.1051/lait:19961-29>.

- Chiou, N.-T., & Ansel, K. M. (2016). Improved exosome isolation by sucrose gradient fractionation of ultracentrifuged crude exosome pellets. *Research Square*, 1. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/protex.2016.057>
- Choi-Rhee, E., Schulman, H., & Cronan, J. E. (2004). Promiscuous protein biotinylation by *Escherichia coli* biotin protein ligase. *Protein Science*, 13(11), 3043-3050.
- Cipolla, L., Gabrielli, L., Bini, D., Russo, L., & Shaikh, N. (2010). Kdo: a critical monosaccharide for bacteria viability. *Natural Product Reports*, 27(11), 1618-1629.
- Cole-Parmer. (2018). *Les Bases de la Centrifugation*. <https://www.coleparmer.com/tech-article/centrifugation-basics?tlg=fr-FR>
- 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*. *Elife*, 2, 1-5. <https://doi.org/10.7554/eLife.00868>
- Dumont, M., Lehner, A., Vauzeilles, B., Malassis, J., Marchant, A., Smyth, K., Linclau, B., Baron, A., Mas Pons, J., & Anderson, C. T. (2016). Plant cell wall imaging by metabolic click-mediated labelling of rhamnogalacturonan II using azido 3-deoxy-d-manno-oct-2-ulosonic acid. *The Plant Journal*, 85(3), 437-447.
- Dumont, A., Malleron, A., Awwad, M., Dukan, S., & Vauzeilles, B. (2012). Click-mediated labeling of bacterial membranes through metabolic modification of the lipopolysaccharide inner core. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(13), 3143-3146.
- Driessen, A. J., & Nouwen, N. (2008). Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annual Review Biochemistry*, 77, 643-667. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061606.160747>.
- Esquivel, E. R. (2021). *Metabolic labelling of the Myxococcus xanthus outer membrane* Institut National de la Recherche Scientifique [Mémoire].
- Faure, L. M., Fiche, J.-B., Espinosa, L., Ducret, A., Anantharaman, V., Luciano, J., Lhospice, S., Islam, S. T., Tréguier, J., & Sotes, M. (2016). The mechanism of force transmission at bacterial focal adhesion complexes. *Nature*, 539(7630), 530-535. <https://doi.org/10.1038/nature20121>
- Fink, J. M., & Zissler, J. F. (1989). Characterization of lipopolysaccharide from *Myxococcus xanthus* by use of monoclonal antibodies. *Journal of Bacteriology*, 171(4), 2028-2032.
- Fugier, E., Dumont, A., Malleron, A., Poquet, E., Mas Pons, J., Baron, A., Vauzeilles, B., & Dukan, S. (2015). Rapid and specific enrichment of culturable gram negative

- bacteria using non-lethal copper-free click chemistry coupled with magnetic beads separation. *PLoS One*, 10(6), e0127700.
- Gaudin, M. (2012). *Etude des vésicules membranaires produites par les Archées hyperthermophiles marines de l'ordre des Thermococcales* [Dissertation, Paris 11]. Paris.
- Hartmann, M., & Lindhorst, T. K. (2011). The bacterial lectin FimH, a target for drug discovery—carbohydrate inhibitors of type 1 fimbriae-mediated bacterial adhesion. *European Journal of Organic Chemistry*, (20-21), 3583-3609.
- Hartzell, T. (2014). All in the family: kin contact leads to outer membrane exchange. *Journal of bacteriology*, 196(10), 1789-1792.
- Henke, S. K., & Cronan, J. E. (2014). Successful conversion of the *Bacillus Subtilis* BirA Group II biotin protein ligase into a Group I ligase. *PLoS One*, 9(5), e96757.
- Hobb, R. I., Fields, J. A., Burns, C. M., & Thompson, S. A. (2009). Evaluation of procedures for outer membrane isolation from *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* 155(3), 979. <https://doi.org/10.1099/mic.0.024539-0>.
- Hodgkin, J., & Kaiser, D. (1977). Cell-to-cell stimulation of movement in nonmotile mutants of *Myxococcus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(7), 2938-2942.
- Holst, O., Moran, A. P., & Brennan, P. J. (2010). Overview of the glycosylated components of the bacterial cell envelope. *Microbial Glycobiology* (pp. 1-13). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374546-0.00001-8>.
- Ing, T. S., Rahman, M. A., & Kjellstrand, C. M. (2012). Dialysis: History, Development and Promise. *World Scientific*. 6(2), 252. <https://doi.org/10.1093/ckj/sft025>.
- Islam, S. T., Jolivet, N. Y., Cuzin, C., Belgrave, A. M., My, L., Fleuchot, B., Faure, L. M., Mahanta, U., Kezzo, A. A., & Saïdi, F. (2023). Unmasking of the von Willebrand A-domain surface adhesin CglB at bacterial focal adhesions mediates myxobacterial gliding motility. *Science Advances*, 9(8), eabq0619.
- Islam, S. T., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.033>.
- Islam, S. T., Vergara Alvarez, I., Saïdi, F., Guiseppi, A., Vinogradov, E., Sharma, G., Espinosa, L., Morrone, C., Bresseur, G., & Guillemot, J.-F. (2022). Modulation of bacterial multicellularity via spatio-specific polysaccharide secretion. *PLoS Biology*, 18(6), e3000728. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000728>.



- Jin, Y., Cheng, X., Yang, F., & Fu, L. (2015). Ultracentrifugation-based multi-target affinity selection mass spectrometry. *RSC advances*, 5(130), 107616-107622.
- Joo, S. H. (2015). Lipid A as a drug target and therapeutic molecule. *Biomolecules & Therapeutics*, 23(6), 510. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2015.117>.
- Jung, A. L., Hoffmann, K., Herkt, C. E., Schulz, C., Bertrams, W., & Schmeck, B. (2017). Legionella pneumophila outer membrane vesicles: isolation and analysis of their pro-inflammatory potential on macrophages. *Journal of Visualized Experiments*, (120), e55146. <https://doi.org/10.3791/55146>.
- Kaplan, M., Chreifi, G., Metskas, L. A., Liedtke, J., Wood, C. R., Oikonomou, C. M., Nicolas, W. J., Subramanian, P., Zacharoff, L. A., & Wang, Y. (2021). In situ imaging of bacterial outer membrane projections and associated protein complexes using electron cryo-tomography. *Elife*, 10, e73099. <https://doi.org/10.7554/eLife.73099>
- Klimentová, J., & Stulík, J. (2015). Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Microbiological Research*, 170, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.09.006>.
- Kolb, H. C., Finn, M., & Sharpless, K. B. (2001). Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(11), 2004-2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5)
- Kohanski, R. A. (2013). Biotinylation of Proteins. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 226- 228. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00168-7>.
- Konovalova, A., Petters, T., & Søgaard-Andersen, L. (2010). Extracellular biology of Myxococcus xanthus. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2), 89-106. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00194.x>.
- Kotarski, S. F., & Salyers, A. A. (1984). Isolation and characterization of outer membranes of Bacteroides thetaiotaomicron grown on different carbohydrates. *Journal of Bacteriology*, 158(1), 102-109. <https://doi.org/10.1128/jb.158.1.102-109.1984>
- Kuduğ, H., Ataman, B., İmamoğlu, R., Düzgün, D., & Gökçe, İ. (2019). Production of red fluorescent protein (mCherry) in an inducible E. coli expression system in a bioreactor, purification and characterization. *International Advanced Researches and Engineering Journal*, 3(1), 20-25.
- Lesseur, P. (2014). *Antibiotiques : modes d'action, mécanismes de la résistance*. <https://devsante.org/articles/antibiotiques-modes-d-action-mecanismes-de-la-resistance>.

- Lu, A., Cho, K., Black, W. P., Duan, X. y., Lux, R., Yang, Z., Kaplan, H. B., Zusman, D. R., & Shi, W. (2005). Exopolysaccharide biosynthesis genes required for social motility in *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, *55*(1), 206-220. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04369.x>.
- Lubben, T. H., Donaldson, G. K., Viitanen, P. V., & Gatenby, A. A. (1989). Several proteins imported into chloroplasts form stable complexes with the GroEL-related chloroplast molecular chaperone. *The Plant Cell*, *1*(12), 1223-1230. <https://doi.org/10.1105/tpc.1.12.1223>.
- Mas Pons, J., Dumont, A., Sautejeau, G., Fugier, E., Baron, A., Dukan, S., & Vauzeilles, B. (2014). Identification of Living Legionella pneumophila Using Species-Specific Metabolic Lipopolysaccharide Labeling. *Angewandte Chemie*, *126*(5), 1299-1302. <https://doi.org/10.1002/anie.201309072>.
- Mauriello, E. M., Mignot, T., Yang, Z., & Zusman, D. R. (2010). Gliding motility revisited: how do the myxobacteria move without flagella? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(2), 229-249. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00043-09>.
- McNamara, D., & Thesmar, H. (2005). Eggs. *Encyclopedia of Human Nutrition*, (2), 86-92. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00086-6>.
- McPherson, R. A., & Pincus, M. R. (2021). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods E-Book* (24 ed., Vol. 18). Elsevier Health Sciences. <https://books.google.ca/books?id=RW4yEAAAQBAJ>.
- Mendham, J., Toullec, J., & Mottet, M. (2005). *Analyse chimique quantitative de Vogel* (6 ed.). De Boeck Supérieur. <https://books.google.ca/books?id=0DpzHgeY3NsC>.
- Microbiologynote. (2022). *Differential centrifugation*. <https://microbiologynote.com/differential-centrifugation/>
- Mozzi, F., Rollan, G., De Giori, G. S., & De Valdez, G. F. (2001). Effect of galactose and glucose on the exopolysaccharide production and the activities of biosynthetic enzymes in *Lactobacillus casei* CRL 87. *Journal of Applied Microbiology*, *91*(1), 160-167. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01367.x>.
- Muñoz-Dorado, J., Marcos-Torres, F. J., García-Bravo, E., Moraleda-Muñoz, A., & Pérez, J. (2016). Myxobacteria: Moving, Killing, Feeding, and Surviving Together [Review]. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00781>.
- Nan, B., Mauriello, E. M., Sun, I. H., Wong, A., & Zusman, D. R. (2010). A multi-protein complex from *Myxococcus xanthus* required for bacterial gliding motility. *Molecular Microbiology*, *76*(6), 1539-1554. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07184.x>.

- Nesterenko, M. V., Tilley, M., & Upton, S. J. (1994). A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 28(3), 239-242. [https://doi.org/10.1016/0165-022X\(94\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0165-022X(94)90020-5).
- Nilsson, I., Grove, K., Dovala, D., Uehara, T., Lapointe, G., & Six, D. A. (2017). Molecular characterization and verification of azido-3, 8-dideoxy-d-manno-oct-2-ulonic acid incorporation into bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*, 292(48), 19840-19848. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.814962>.
- Nilsson, I., Lee, S. Y., Sawyer, W. S., Rath, C. M. B., Lapointe, G., & Six, D. A. (2020). Metabolic phospholipid labeling of intact bacteria enables a fluorescence assay that detects compromised outer membranes. *Journal of Lipid Research*, 61(6), 870-883. <https://doi.org/10.1194/jlr.RA120000654>.
- Okuda, S., Sherman, D. J., Silhavy, T. J., Ruiz, N., & Kahne, D. (2016). Lipopolysaccharide transport and assembly at the outer membrane: the PEZ model. *Nature Reviews Microbiology*, 14(6), 337-345. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.25>.
- Organisation Mondiale de la Santé. (2018). *Niveaux élevés de résistance aux antibiotiques dans le monde*. <https://www.who.int/fr/news/item/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows>.
- Paolozzi, L., Liébart, J. C., Arlat, M., Dion, M., & Rakotoarivonina, H. (2019). *Introduction à la microbiologie: Microbiologie fondamentale et appliquée*. Dunod. <https://books.google.ca/books?id=LfCcDwAAQBAJ>.
- Palsdottir H, Remis JP, Schaudinn C, O'Toole E, Lux R, Shi W, McDonald KL, Costerton JW, Auer M (2009) Three-dimensional macromolecular organization of cryofixed *Myxococcus xanthus* biofilms as revealed by electron microscopic tomography. *Journal of Bacteriology*. 191(7), 2077-2082. <https://doi.org/10.1128/JB.01333-08>.
- Pérez-Burgos, M., García-Romero, I., Jung, J., Schander, E., Valvano, M. A., & Søgaard-Andersen, L. (2020). Characterization of the exopolysaccharide biosynthesis pathway in *Myxococcus xanthus*. *Journal of bacteriology*, 202(19), e00335-00320. <https://doi.org/10.1128/JB.00335-20>.
- Pérez-Burgos, M., García-Romero, I., Jung, J., Valvano, M. A., & Søgaard-Andersen, L. (2019). Identification of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis priming enzyme and the O-antigen ligase in *Myxococcus xanthus*: critical role of LPS O-antigen in motility and development. *Molecular Microbiology*, 112(4), 1178-1198. <https://doi.org/10.1111/mmi.14354>

- Ransom, E. M., Ellermeier, C. D., Weiss, D. S., & Kivisaar, M. (2015). Use of mCherry Red Fluorescent Protein for Studies of Protein Localization and Gene Expression in *Clostridium difficile*. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(5), 1652-1660. <https://doi.org/10.1128/AEM.03446-14>.
- Reimer, S. L., Beniac, D. R., Hiebert, S. L., Booth, T. F., Chong, P. M., Westmacott, G. R., Zhanel, G. G., & Bay, D. C. (2021). Comparative analysis of outer membrane vesicle isolation methods with an *Escherichia coli tola* mutant reveals a hypervesiculating phenotype with outer-inner membrane vesicle content. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 628801. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628801>.
- Remis JP, Wei D, Gorur A, Zemla M, Haraga J, Allen S, Witkowska HE, Costerton JW, Berleman JE, Auer M (2014) Bacterial social networks: structure and composition of *Myxococcus xanthus* outer membrane vesicle chains. *Environ Microbiol*, *16*(2), 598- 610. <https://doi.org/10.1128/JB.00850-13>.
- Saar-Dover, R., Bitler, A., Nezer, R., Shmuel-Galia, L., Firon, A., Shimoni, E., Trieu-Cuot, P., & Shai, Y. (2012). D-alanylation of lipoteichoic acids confers resistance to cationic peptides in group B streptococcus by increasing the cell wall density. *PLoS Pathogens*, *8*(9), e1002891. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002891>.
- Saïdi, F., Mahanta, U., Panda, A., Kezzo, A. A., Jolivet, N. Y., Bitazar, R., John, G., Martinez, M., Mellouk, A., & Calmettes, C. (2022). Bacterial Outer Membrane Polysaccharide Export (OPX) Proteins Occupy Three Structural Classes with Selective  $\beta$ -Barrel Porin Requirements for Polymer Secretion. *Microbiology Spectrum*, *10*(5), e01290-01222. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01290-22>.
- Saïdi, F., Jolivet, N. Y., Lemon, D. J., Nakamura, A., Belgrave, A. M., Garza, A. G., Veyrier, F. J., & Islam, S. T. (2021). Bacterial glycocalyx integrity drives multicellular swarm biofilm dynamism. *Molecular Microbiology*, *116*(4), 1151-1172. <https://doi.org/10.1111/mmi.14803>.
- Saïdi, F., Bitazar, R., Bradette, N. Y., & Islam, S. T. (2022). Bacterial Glycocalyx Integrity Impacts Tolerance of *Myxococcus xanthus* to Antibiotics and Oxidative-Stress Agents. *Biomolecules*, *12*(4), 571. <https://doi.org/10.3390/biom12040571>
- Silhavy TJ, Kahne D, Walker S (2010) The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *2*(5), a000414-a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>.
- Smith, A. C., & Hussey, M. A. (2005). Gram stain protocols. *American Society for Microbiology*, *1*, 14.
- Piketty, M.-L., & Souberbielle, J.-C. (2017). La biotine, une interférence analytique émergente. *Annales de Biologie Clinique*, *75*(4), 366-368. <https://doi.org/10.1684/abc.2017.1252>.

- Thiery, S., & Kaimer, C. (2020). The Predation Strategy of *Myxococcus xanthus*. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00002>.
- Tsai, C.-M., & Frasch, C. E. (1982). A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*, *119*(1), 115-119.
- Vassallo, C., Pathak, D. T., Cao, P., Zuckerman, D. M., Hoiczky, E., & Wall, D. (2015). Cell rejuvenation and social behaviors promoted by LPS exchange in myxobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(22), e2939-e2946. <https://doi.org/10.1073/pnas.150355311>.
- Vickery, H. B. (1950). The origin of the word protein. *The Yale journal of biology and medicine*, *22*(5), 387.
- Vogel, S. N. (1990). The role of cytokines in endotoxin-mediated responses. *Immunophysiology role of cells and cytokines: Immunity and Inflammation*, 238.
- Vuorio, R., & Vaara, M. (1995). Comparison of the phenotypes of the lpxA and lpxD mutants of *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, *134*(2-3), 227-232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07942.x>.
- Wei, X., Vassallo, C. N., Pathak, D. T., & Wall, D. (2014). Myxobacteria produce outer membrane-enclosed tubes in unstructured environments. *Journal of Bacteriology*, *196*(10), 1807-1814. <https://doi.org/10.1128/JB.00850-13>.
- Whitfield, D. L., Sharma, G., Smaldone, G. T., & Singer, M. (2020). Peripheral rods: a specialized developmental cell type in *Myxococcus xanthus*. *Genomics*, *112*(2), 1588-1597. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.09.008>.
- Whitfield Ra (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochem*, *71*,635-700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>.
- Ye, X., Kaczmarczyk, J. A., Luke, B., Saul, R. G., Whiteley, G. R., Nissley, D. V., & Blonder, J. (2020). *Cell surface protein enrichment for biomarker and drug target discovery using mass spectrometry-based proteomics*. (2<sup>nd</sup> ed.) Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery (pp. 409-420). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818607-7.00024-4>.
- Zeng, D., Zeglis, B. M., Lewis, J. S., & Anderson, C. J. (2013). The growing impact of bioorthogonal click chemistry on the development of radiopharmaceuticals. *Journal of Nuclear Medicine*, *54*(6), 829-832. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.115550>.

- Zhang W, Zhou G, Zhao Y, White MA, Zhao Y. (2003). Affinity enrichment of plasma membrane for proteomics analysis. *Electrophoresis*, 24(16), 2855-63. <https://doi.org/10.1002/elps.200305569>.
- Zhang, Y., Ducret, A., Shaevitz, J., & Mignot, T. (2012). From individual cell motility to collective behaviors: insights from a prokaryote, *Myxococcus xanthus*. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(1), 149-164. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00307.x>.