

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DE LA STRUCTURE D'UNE PROTÉINE EN TONNEAU BÊTA ET SES
INTERACTIONS AU SEIN DE LA SÉCRÉTION DE POLYSACCHARIDE BIOSURFACTANT (BPS) CHEZ LA
BACTÉRIE MYXOCOCCUS XANTHUS

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

AHMAD KEZZO

DÉCEMBRE 2025

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.12-2023). 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

Mes remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué à l'accomplissement de ma maîtrise. Je tiens à exprimer ma gratitude au professeur Laurent Cappadocia, mon directeur de recherche, au professeur Salim Timo Islam, mon co-directeur de recherche et mon encadrant tout le temps au courant de ma maîtrise, Dr Fares Saïdi, qui m'encadrerait à mes débuts. Je remercie également toute l'équipe de mes professeurs à l'UQAM et à l'INRS. Grâce à votre présence, votre suivi et votre soutien ce projet a pu voir le jour.

DÉDICACE

À Najwa, Lynne, Loujaine et ma famille

AVANT-PROPOS

Mettre en lumière les mécanismes de sécrétion et de métabolisme chez les bactéries permet de comprendre les processus biochimiques primaires qui ont constitué les prémices de mécanismes plus complexes chez toutes les différentes formes de vie.

Une protéine en tonneau bêta est impliquée dans la sécrétion de polysaccharide biosurfactant (BPS), qui joue un rôle essentiel dans la motilité chez la bactérie *Myxococcus xanthus*, ainsi que dans les formations sociales et les interactions entre les cellules de cet organisme social. Ce mécanisme de sécrétion récemment découvert a offert l'opportunité d'identifier ces protéines en tonneau bêta impliquées dans la voie de sécrétion de polysaccharides Wzx/Wzy-dépendante et de montrer qu'il s'agit du mécanisme le plus répandu chez les bactéries. Cela a mis fin à un dogme scientifique vieux d'une quinzaine d'années concernant ce processus.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE	iii
AVANT-PROPOS.....	iv
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	xii
RÉSUMÉ	xv
ABSTRACT	xvi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	2
1.1 Les polysaccharides bactériens	2
1.1.1 Les polysaccharides structuraux	2
1.1.1.1 Peptidoglycane	2
1.1.1.2 Les polysaccharides de lipopolysaccharides	3
1.1.2 Les polysaccharides fonctionnels.....	4
1.1.2.1 Les polysaccharides sécrétés	5
1.1.2.1.1 La capsule bactérienne	5
1.2 Synthèse de polysaccharides bactériens	5
1.2.1 La voie ABC transporteur-dépendante	5
1.2.2 La voie synthase-dépendante	8
1.2.3 La voie Wzx/Wzy-dépendante	10
1.3 <i>Myxococcus xanthus</i>	12
1.3.1 Cycle de vie de <i>M. xanthus</i>	12
1.3.2 La motilité chez <i>M. xanthus</i>	14
1.3.2.1 Motilité aventurière (motilité A)	14
1.3.2.2 Motilité sociale (motilité S).....	15
1.3.2.3 L'interchange et la coordination entre la motilité A et S :.....	16
1.3.3 Les polysaccharides chez <i>M. xanthus</i>	17
1.3.3.1 La synthèse et les fonctions d'EPS	17
1.3.3.2 La synthèse et les fonctions du MASC	18
1.3.3.3 La synthèse et les fonctions du BPS.....	19
1.3.3.4 Le polysaccharide antigène-O du LPS	21
1.3.3.5 Les porines en tonneau bêta et les OPX de la voie Wzx/Wzy-dépendante chez <i>M. xanthus</i> ..	22
1.3.3.5.1 La protéine OPX (WzaB) de la voie Wzx/Wzy-dépendante de BPS	23

1.3.3.5.2 La protéine en tonneau bêta WzpB de la voie Wzx/Wzy-dépendante de BPS	24
1.4 Hypothèse	25
1.5 Objectifs de la recherche	25
CHAPITRE 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES	26
2.1 Les structures virtuelles de WzpB (porine), WzaB (OPX) et leurs complexes et l'analyse Bio-informatique.....	26
2.1.1 Formation des complexes protéiques	27
2.1.2 Analyse des interactions et de la stabilité des complexes formés par WzaB et/ou WzpB.....	27
2.2 Clonage du vecteur de la surexpression de la porine en tonneau bêta WzpB	28
2.2.1 Vérification des produits de PCR	31
2.3 La transformation de souche d' <i>E. coli</i> pour multiplier le vecteur cloné exprimant de WzpB	31
2.4 Surexpression de la porine en tonneau bêta WzpB.....	32
2.4.1 Les souches de surexpression.....	32
2.4.2 La concentration de l'agent d'induction et de la température de croissance de souches d'expression	32
2.4.3 L'analyse de résultats par l'électrophorèse de SDS-PAGE :	33
2.4.4 Immunobuvardage.....	33
2.4.5 Le fractionnement des cultures et la détermination de la solubilité de WzpB	34
2.4.6 La purification et la cristallographie aux rayons X.	35
2.5 Les transformations et les tests phénotypiques chez <i>Myxococcus xanthus</i>	35
2.5.1 Transformations de <i>M. xanthus</i> et l'intégration du vecteur dans le génome.	36
2.5.1.1 L'électroporation et la récupération de cellules transformées.	36
2.5.1.2 Coulage de top agar (gélose) et l'intégration du vecteur dans le génome (chromosome) de <i>M. xanthus</i>	37
2.5.1.3 Le criblage de colonies transformées de <i>M. xanthus</i> et l'extraction d'ADN gnomique	37
2.5.2 Les tests phénotypiques de <i>M. xanthus</i>	37
2.5.2.1 Motilité sociale	38
2.5.2.2 Motilité aventurière.....	38
CHAPITRE 3 RÉSULTATS.....	39
3.1 La structure virtuelle de WzaB et WzpB et leurs complexes	39
3.1.1 Structure, charges et distribution de résidus polaires de WzaB (OPX)	39
3.1.2 Structure, charges et distribution de résidus polaires de WzpB (porine en tonneau bêta).....	41
3.1.3 Structure, charges et distribution de résidus polaires de WzcB (PCP)	42
3.2 La formation de complexes protéiques de WzpB et WzaB.....	43
3.2.1 Les complexes d'un nombre croissant de WzaB.....	43
3.2.1.1 Complexe d'un protomère de WzaB et un de WzpB	44
3.2.1.2 Complexe des deux protomères WzaB seuls et avec un WzpB	45
3.2.1.3 Complexe des trois, quatre et cinq protomères de WzaB seuls et avec un de WzpB	46
3.2.1.4 Complexes de six, sept et huit protomères de WzaB seuls et avec un de WzpB	52
3.2.2 Analyse des interactions et de l'équilibre des complexes formés par WzaB (OPX) seuls ou avec WzpB (porines)	58

3.2.3 La prédiction des erreurs d'alignements (PAE).....	65
3.3 Clonage du vecteur pET20B(+) :: <i>mxan_1916</i> codant de WzpB (porine en tonneau bêta).....	73
3.3.1 Clonage du gène <i>mxan_1916</i> à partir du génome de <i>Myxococcus xanthus</i> :	74
3.4 La surexpression de WzpB (porine en tonneau bêta).....	75
3.4.1 Transformation des souches d'expression	75
3.4.2 L'optimisation de la température et la concentration de l'agent d'induction IPTG.....	76
3.4.3 Fractionnement des cultures et détermination de la solubilité de WzpB produite.....	81
3.5 Les transformations de <i>Myxococcus xanthus</i> et les tests phénotypiques.....	84
CHAPITRE 4 DISCUSSION	87
4.1 Approche virtuelle de l'élucidation des structures et des interactions entre WzaB (OPX) et WzpB (porine).....	87
4.2 La surexpression de WzpB (porine).....	90
4.3 Effets de la délétion et de la complémentation sur les phénotypes de <i>Myxococcus xanthus</i>	91
CONCLUSION	92
ANNEXE A Les souches utilisées	93
ANNEXE B La séquence de vecteur pet20(b)+:: <i>mxan_1916</i>	96
ANNEXE C Résultat su séquençage obtenu pour pet20(b)+:: <i>mxan_1916</i>	98
ANNEXE D Les séquences des vecteurs pSWU19 avec les gènes de complémentation du <i>mxan_1915</i> et du <i>mxan_1916</i>	99
ANNEXE E Les diagrammes PAE des complexes constitués de protomères WzaB (OPX) seuls et des ceux constitués de protomères WzaB et d'un WzpB (porine).....	103
RÉFÉRENCES	110

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : La paroi cellulaire chez la bactérie.	3
Figure 1.2 : Structure du lipopolysaccharide (LPS) au sein de la membrane externe.....	4
Figure 1.3 : La voie ABC transporteur-dépendante.....	7
Figure 1.4 : La voie synthase-dépendante.....	9
Figure 1.5 : La voie dépendante des Wzx/Wzy.	11
Figure 1.6 : Le cycle de vie de <i>M. xanthus</i>	14
Figure 1.7 : Les motilités A et S chez <i>Myxococcus xanthus</i>	16
Figure 1.8 : La structure chimique du BPS.....	19
Figure 1.9 : La voie Wzx/Wzy-dépendante du BPS.	21
Figure 1.10 : Schéma de WzaB (OPX) et WzpB (tonneau bêta) de BPS et l'OPX classique.	24
Figure 2.1 : Les caractéristiques du vecteur pET-20b(+).	28
Figure 3.1 : Structure, résidus polaires et charge nette de WzaB (OPX).....	40
Figure 3.2 : Structure, résidus polaires et charge nette de WzpB (porine).....	41
Figure 3.3 : Structure, résidus polaires et charge nette de WzcB (PCP).	42
Figure 3.4 : Structure du complexe formé d'un protomère WzaB (OPX) et d'un WzpB (porine)	44
Figure 3.5 : Structure du complexe formé de deux protomères WzaB (OPX) seuls et avec un WzpB (porine).	45
Figure 3.6 : Structure du complexe formé de trois protomères WzaB (OPX) seuls et avec un WzpB (porine).	47
Figure 3.7 : Structure du complexe formé de quatre protomères WzaB (OPX) seuls et avec un WzpB (porine).	49
Figure 3.8 : Structure du complexe formé de cinq protomères WzaB (OPX) seuls et avec un WzpB (porine).	51
Figure 3.9 : Structure du complexe formé de six protomères WzaB (OPX) seuls et avec un WzpB (porine).	53
Figure 3.10 : Structure du complexe de sept protomères WzaB (OPX) seuls et avec un WzpB (porine). ..	55

Figure 3.11 : Structure du complexe formé de huit protomères WzaB (OPX) seuls et avec un WzpB (porine).	57
Figure 3.12 : Diagramme de prédiction des erreurs d'alignements (PAE) pour le complexe de quatre protomères WzaB (OPX) seuls.	66
Figure 3.13 : Diagramme de prédiction des erreurs d'alignements (PAE) pour le complexe de six protomères WzaB (OPX) seuls.	67
Figure 3.14 : Diagramme de prédiction des erreurs d'alignements (PAE) pour le complexe de huit protomères WzaB (OPX) seuls.	68
Figure 3.15 : Diagramme de prédiction des erreurs d'alignements (PAE) pour le complexe de neuf protomères WzaB (OPX) seuls.	69
Figure 3.16 : Diagramme de prédiction des erreurs d'alignements (PAE) pour le complexe de quatre protomères WzaB (OPX) et d'un WzpB.	70
Figure 3.17 : Diagramme de prédiction des erreurs d'alignements (PAE) pour le complexe de six protomères WzaB (OPX) et d'un WzpB.	71
Figure 3.18 : Diagramme de prédiction des erreurs d'alignements (PAE) pour le complexe de huit protomères WzaB (OPX) et d'un WzpB.	72
Figure 3.19 : Diagramme de prédiction des erreurs d'alignements (PAE) pour le complexe de neuf protomères WzaB (OPX) et d'un WzpB.	73
Figure 3.20 : : Gel d'agarose des produits PCR du premier cycle du clonage de <i>mxan_1916</i> .	75
Figure 3.21 : Transformation des souches BL21 (DE3), C41 (DE3) et C43 (DE3) avec le vecteur pET20(b)+:: <i>mxan_1916</i> .	76
Figure 3.22 : Surexpression de WzpB (porine en tonneau bêta) à 25 °C dans différentes souches et à diverses concentrations d'IPTG.	78
Figure 3.23 : Surexpression de WzpB (porine en tonneau bêta) à 30 °C dans différentes souches et à diverses concentrations d'IPTG.	79
Figure 3.24 : Surexpression de WzpB (porine en tonneau bêta) à 37 °C dans différentes souches et à diverses concentrations d'IPTG.	80
Figure 3.25 : Surexpression de WzpB (porine en tonneau bêta) par la souche C43 (DE3) à différentes températures et concentrations d'IPTG.	81
Figure 3.26 : Fractionnement de la culture de C43 (DE3) à 30 °C et 0,25 mM IPTG.	82
Figure 3.27 : Fractionnement de la culture de C43 (DE3) à 37 °C et 2,00 mM IPTG.	83
Figure 3.28 : Phénotypes de motilité A (aventurière) des souches type sauvage (WT), $\Delta mxan_{1915}$ et $\Delta mxan_{1916}$ et de leurs souches complémentées avec divers promoteurs.	85

Figure 3.29 : Phénotypes de motilité S (Sociale) dans des souches type sauvage (WT), $\Delta mxan_{1915}$ et $\Delta mxan_{1916}$ et de leurs souches complémentées par divers promoteurs..... 86

Figure 4.1 : L'alignement des résidus polaires dans un complexe de sept et de huit protomères WzaB (OPX) et d'un WzpB et la circonférence du canal entre les bords du canal de WzaB et l'ouverture périplasmique de WzpB..... 89

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Les amorces de RF (restriction free cloning) du clonage de l'insert <i>mxan_1916</i> à partir du génome ou l'ADN cible.	29
Tableau 2.2 : La programmation du thermocycleur pour le premier cycle RF.	29
Tableau 2.3 : Le mélange du PCR pour le premier cycle RF.	30
Tableau 2.4: La programmation du thermocycleur pour le deuxième cycle RF.	30
Tableau 2.5 : Le mélange de PCR pour le deuxième cycle RF.	30
Tableau 2.6 : Les séquences de promoteurs de la transformation chez <i>M. xanthus</i>	36
Tableau 3.1 : Données d'interactions entre un nombre accru de protomères WzaB (OPX) seuls ou en présence d'un protomère WzpB (porine en tonneau bêta).	61
Tableau 3.2: Données d'interactions entre WzpB (tonneau bêta) et chaque WzaB (OPX) dans des complexes comportant un nombre croissant de WzaB.	63
Tableau 3.3: Données d'interactions entre un nombre accru de protomères WzaB (OPX), seuls et en présence d'un protomère de WzCB (PCP).	64
Tableau 3.4: Données d'interactions entre WzCB (PCP) et chaque WzaB (OPX) dans des complexes formés de nombre accru de WzaB.	65

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ABC	<i>ATP-binding cassette</i> - cassette de liaison de l'ATP
AFM	<i>atomic force microscopy</i> - microscopie à force atomique
BPS	<i>biosurfactant polysaccharide</i> - polysaccharide biosurfactant
BYK	<i>bacterial tyrosine autokinase</i> - tyrosine autokinase bactérienne
ECM	<i>extracellular matrix</i> - matrice extracellulaire
EPS	exopolysaccharide
D.O. ₆₀₀	densité optique à 600 nm
FA	<i>focal adhesion complex</i> - complexe d'adhésion focal
GlcNAc	N-acétylglucosamine
GT	glycosyl-transférase
LPS	lipopolysaccharide
MASC	<i>major spore coat</i> - manteau majeur de spore
MCS	<i>multiple cloning sites</i> - sites du clonage multiples
MST	<i>microscale thermophoresis</i> - thermophorèse à micro-échelle
MurNAc	<i>N-acetylmuramic acid</i> - acide N-acétylmuramique
NBD	<i>nucleotide binding domain</i> - domaine liant les nucléotides

OPX	<i>outer membrane polysaccharide export</i> - exportation des polysaccharides de la membrane externe
PAE	<i>predicted aligned error</i> - erreur d'alignement prédite
PCP	<i>polymerase co-protein</i> - co-protéine de la polymérase
PISA	<i>protein interfaces, surfaces and assemblies</i> - interfaces protéiques, surface et assemblages
PNAG	Poly- β -1,6-N-acétyl-D-glucosamine
PMSF	<i>phenylmethanesulfonyl fluoride</i> - fluorure de phénylméthanesulfonyle
PNPT	polyisoprenyl-phosphate N-acétylhexosamine-1-phosphate transférase
RBS	<i>ribosome binding site</i> - site de liaison de ribosome
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i> – Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
SEM	<i>scanning electron microscopy</i> - microscopie électronique à balayage
SLBB	<i>soluble ligand binding β-grasp</i> - domaine liant de ligand soluble à repliement β -grasp
T4P	<i>type IV pilus</i> - pilus de type IV
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
TMD	<i>transmembrane domains</i> - domaines transmembranaires
TPR	<i>tetratricopeptide repeat–containing scaffold protein</i> - protéine d'échafaudage à répétitions tetratricopeptidique
UndPP	undécaprényl pyrophosphate

motilité A motilité aventurière

motilité S motilité sociale

RÉSUMÉ

Les rôles de polysaccharides chez les bactéries sont extrêmement variés. Ils sont essentiels à la formation de biofilms, la motilité, et aussi à la survie bactérienne. Par conséquent, lutter contre la persistance bactérienne nécessite de comprendre leurs mécanismes biochimiques. La récente découverte, chez la bactérie à Gram négatif *Myxococcus xanthus*, de gènes codant des protéines en tonneau bêta (porine) situés au sein du même cluster de sécrétion que les trois systèmes Wzx/Wzy-dépendants est particulièrement notable. Ces gènes sont directement adjacents à ceux codant des protéines OPX, auparavant considérées comme les dernières composantes formant le canal de sécrétion des polysaccharides. De plus, il apparaît que ce type de protéines en tonneau bêta, associé aux systèmes Wzx/Wzy-dépendants, est le plus répandu chez les bactéries et, de manière intéressante, intervient dans le système de sécrétion de polysaccharide biosurfactant (BPS) qui joue des rôles dans la multicellularité chez *M. xanthus*. Alors cette étude a pour objectif d'explorer et de valider, par approches virtuelle et expérimentale, la structure de tonneau bêta impliquée dans la sécrétion du BPS chez *M. xanthus*, où ces protéines ont été identifiées, ainsi que d'examiner les interactions entre ces tonneaux bêta et les autres composants de systèmes Wzx/Wzy-dépendants, en particulier les protéines OPX. Dans ces systèmes comportant des tonneaux bêta, les protéines OPX manquent de domaines intégratifs dans la membrane externe, pourtant essentiels à la formation du canal de sécrétion. L'analyse structurale et interactionnelle a d'abord été menée par approche virtuelle : modélisation de la structure, optimisation de la structure obtenue par l'ajout des charges et des atomes manquants, puis évaluation de la stabilité par mesurer les forces et les interactions des complexes. Cette étape a été suivie d'une approche expérimentale visant à résoudre la structure par cristallographie aux rayons X, afin de croiser et valider les résultats issus de deux approches. Les résultats mettent en évidence un modèle structurel stable dont l'état actif se compose de la porine en tonneau bêta (WzpB) associée à une formation octamérique/heptamérique d'OPX (WzaB). À l'inverse, l'état de repos se répartit en deux configurations issues de la dissociation de l'assemblage précédent, une fermeture de la porine par un ou deux OPX, et la formation d'agglomérats trimérique ou tétramérique de OPX. Sur le plan expérimental, l'approche a rencontré des obstacles, au premier rang desquels la toxicité, qu'il reste à surmonter, mettant en lumière l'impact marqué des porines sur la régulation cellulaire bactérienne. L'implication de la porine en tonneau bêta dans la sécrétion du polysaccharide BPS est corroborée par les effets de sa délétion sur les phénotypes, comparés à ceux de la souche sauvage, des effets comparables à ceux observés lors de la délétion d'autres composants de cette voie de sécrétion, notamment OPX et PCP, ont été observés.

Mots clés :

Protéines en tonneau bêta, Polysaccharides bactériens, Voies Wzx/Wzy-dépendantes, biofilm, polysaccharide biosurfactant (BPS), porines, membrane externe, *Myxococcus xanthus*.

ABSTRACT

The roles of polysaccharides in bacteria are extremely diverse. They are essential for biofilm formation, motility, and bacterial survival. Consequently, combating bacterial persistence requires understanding their biochemical mechanisms. The recent discovery in the Gram-negative bacterium *Myxococcus xanthus* of genes encoding beta-barrel (porin) proteins located within the same cluster as the three Wzx/Wzy-dependent systems is particularly noteworthy. These genes are directly adjacent to those encoding OPX proteins, previously considered the terminal components forming the polysaccharide secretion channel. Moreover, this class of beta-barrel proteins associated with Wzx/Wzy-dependent systems appears to be the most widespread among bacteria and, interestingly, participates in the secretion system of the biosurfactant polysaccharide (BPS), which plays roles in multicellularity in *M. xanthus*. This study aims to explore and validate, through computational and experimental approaches, the beta-barrel structure implicated in BPS secretion in *M. xanthus*, where these proteins have been identified, as well as to examine interactions between these beta-barrels and other components of Wzx/Wzy-dependent systems, particularly OPX proteins. In these beta-barrels containing systems, OPX proteins lack outer-membrane-integrating domains, which are nonetheless essential for forming the secretion porin. Structural and interaction analyses were first conducted computationally: structural modeling, structure optimization by adding missing charges and atoms, and assessment of stability by measuring the forces and the interactions of the complexes. This step was followed by an experimental approach aimed to resolve the structure by X-ray crystallography, to cross-validate the results from the two approaches. The results reveal a stable structural model whose active state consist of the beta-barrel porin (WzpB) associated with an octameric/heptameric formation of OPX (WzaB). In contrast, the resting state partitions into two configurations arising from dissociation of the prior assembly: occlusion of the porin by one or two OPX protomers, and the formation of OPX trimers or tetramers. Experimentally, the approach encountered obstacles, majorly the toxicity, that remains to be overcome, highlighting the pronounced impact of porins on bacterial cellular regulation. The involvement of the beta-barrel porin in BPS secretion is supported by the effects of its deletion on phenotypes, compared to the wildtype strain, effects comparable to those observed upon deletion of other components of this secretion pathway, notably OPX and PCP, were obtained.

Keywords :

Beta-barrel proteins, bacterial polysaccharides, Wzx/Wzy dependent pathways, biofilm, biosurfactant polysaccharide (BPS), porins, outer-membrane, *Myxococcus xanthus*.

INTRODUCTION

Les polysaccharides font partie de la triade biologique, aux côtés des protéines et des lipides. Les blocs constitutifs de ces macromolécules sont les monosaccharides, les acides aminés et plusieurs composants lipidiques (le cholestérol, les triglycérides et les acides gras) respectivement. Ainsi, les polysaccharides sont fondamentaux dans presque tous les aspects de la vie. Les polysaccharides sont des polymères complexes de monosaccharides, dont la diversité structurelle reflète une large gamme de fonctions biologiques. Leur classification repose généralement sur deux bases structurelle et fonctionnelle. Ces classifications permettent de mieux comprendre la relation entre la structure biochimique des polysaccharides et leurs rôles biologiques spécifiques (Misra *et al.*, 2021; Sutherland, 1988).

Les rôles de polysaccharides se répartissent en deux catégories majeures : rôles structurels et rôles fonctionnels. La participation structurelle à la formation de la paroi cellulaire bactérienne repose essentiellement sur des polysaccharides. Le peptidoglycane et l'acide téichoïque chez la bactérie à Gram positif, ainsi que les lipopolysaccharides de la membrane externe et la capsule chez la bactérie à Gram négatif sont des éléments protecteurs et structurels, auxquels s'ajoutent des structures communes telles que les biofilms (Misra *et al.*, 2021). La communication intercellulaire, l'adhésion aux surfaces abiotiques et biotiques (y compris celles des hôtes), les mécanismes de virulence, la résistance aux antibiotiques et l'adaptation environnementale sont des aspects fonctionnels des polysaccharides (Islam et Lam, 2014; Sutherland, 1988). Par ailleurs, les polysaccharides représentent une forme d'entreposage énergétique de monosaccharides utilisés en tant que sources d'énergie. Ils interviennent également dans la structure de l'ADN et l'ARN (Ai et Jane, 2016; Stylianopoulos, 2013).

Il est à noter que l'association entre les polysaccharides d'une part et les peptides, les protéines et les lipides d'une autre part constitue également un élément primordial dans la formation de la paroi cellulaire bactérienne et d'autres composantes cellulaires qui jouent un rôle protecteur et de virulence chez la bactérie (Misra *et al.*, 2021).

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Les polysaccharides bactériens

La diversité et la répartition de polysaccharides conditionnent plusieurs catégorisations chimiques et fonctionnelles. La classification des polysaccharides bactériens met l'accent sur leur fonctionnalité et leurs rôles chez la bactérie. Ces polysaccharides exercent majoritairement deux types de rôles spécifiques, de rôles structurels, où ils participent aux structures cellulaires, ces polysaccharides sont notamment impliqués dans les structures cellulaires externes. Des rôles fonctionnels des polysaccharides sont modulés par le mode de vie bactérien, dans lesquels ils interviennent dans la motilité bactérienne, la communication intercellulaire, la résistance aux contraintes environnementales et l'adhésion sur les surfaces. Par exemple cette dernière fonction, l'adhésion aux surfaces, est à l'origine de réponses immunitaires spécifiques, qui varient selon la composition en polysaccharides impliqués.

1.1.1 Les polysaccharides structurels

Les polysaccharides structurels sont essentiels à l'intégrité mécanique et la protection des cellules bactériennes. Ils sont généralement linéaires ou ramifiés et contiennent des groupements polaires, tels que des groupements acides ou des acides aminés. Plusieurs structures distinctes sont composées de ces polysaccharides :

1.1.1.1 Peptidoglycane

Le peptidoglycane est une structure unique présente dans la paroi cellulaire de presque toutes les bactéries, à l'exception de certaines mycobactéries et de bactéries parasitaires. Il est constitué de deux parties principales : une chaîne polysaccharidique composée de résidus alternés de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'acide N-acétylmuramique (MurNAc), liés par des liaisons $\beta(1-4)$, et une partie peptidique (Kurata *et al.*, 2006).

Chez les bactéries à Gram positif, le peptidoglycane représente jusqu'à 90 % du poids sec de la paroi cellulaire, il est la composante majeure (figure 1.1). Les chaînes polysaccharidiques sont reliées par des ponts peptidiques complexes. En revanche, chez les bactéries à Gram négatif, le peptidoglycane est plus mince et moins complexe (Misra *et al.*, 2021).

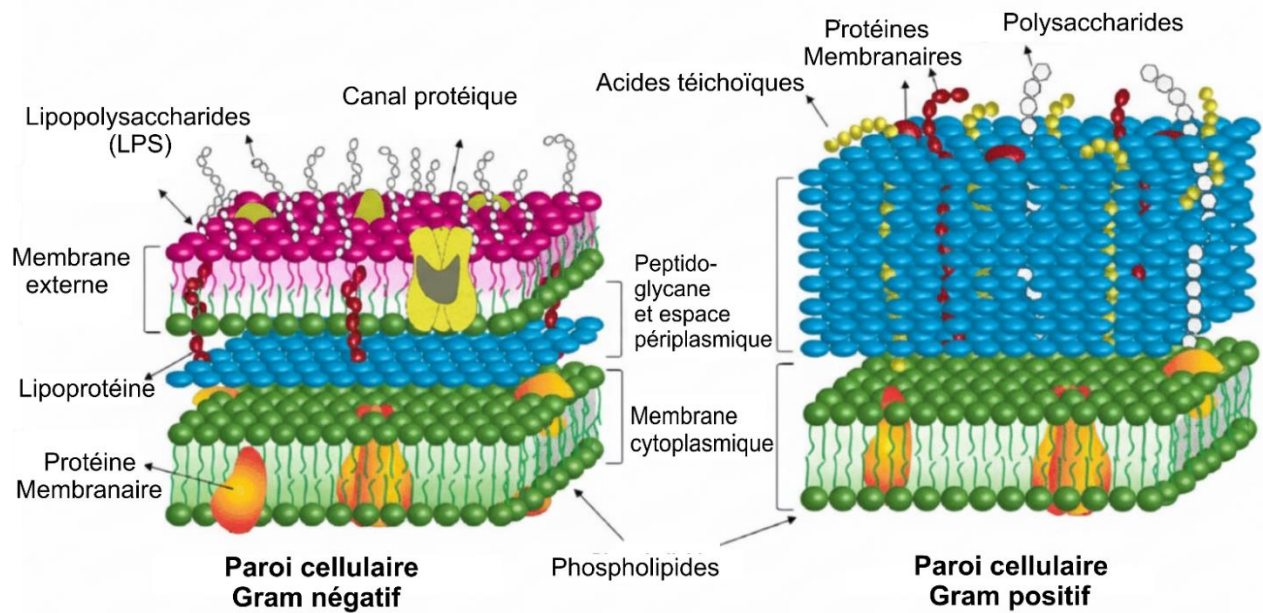


Figure 1.1 : La paroi cellulaire chez la bactérie. Chez la bactérie à Gram négatif, la paroi cellulaire est formée d'une membrane cytoplasmique suivie d'une couche mince de peptidoglycane au milieu de l'espace périplasmique, puis d'une membrane externe. En revanche, la bactérie à Gram positif dépourvue de membrane externe présente une couche épaisse de peptidoglycane contenant des polysaccharides et des acides téichoïques. Cette différence explique les divergences dans les mécanismes d'actions des antibiotiques (Liu *et al.*, 2015).

1.1.1.2 Les polysaccharides de lipopolysaccharides

Le lipopolysaccharide (LPS) constitue le feuillet externe de la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif, rendant cette membrane asymétrique. (Tang *et al.*, 2021). Le LPS se compose du lipide A, partie lipidique ancrant la molécule dans la membrane externe, d'un noyau d'oligosaccharide et d'un polysaccharide distal (lorsqu'il est présent, on parle de LPS lisse) (Vizcaino *et al.*, 1991). Le LPS forme une barrière protectrice vis-à-vis de l'environnement et confère une identité spécifique à chaque bactérie à Gram négatif (Figure 1.2), parce que la réponse immunitaire se diffère selon la composition en monosaccharides, pour cela le polysaccharide de LPS est appelé antigène-O ou polysaccharide-O (Bertani et Ruiz, 2018).

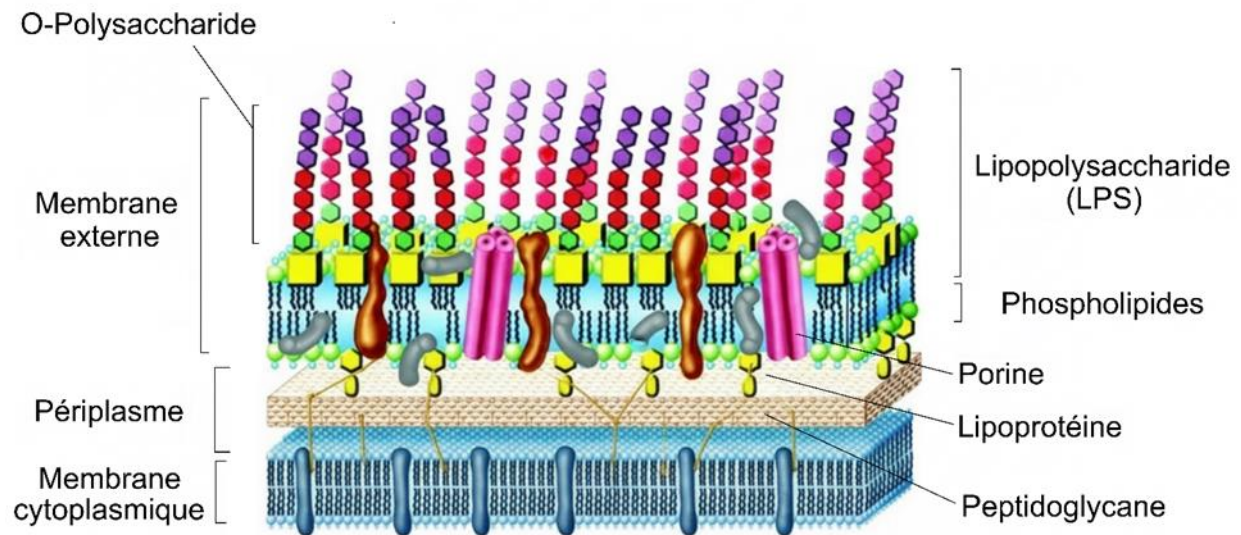


Figure 1.2 : Structure du lipopolysaccharide (LPS) au sein de la membrane externe. LPS constitue la couche la plus externe chez la bactérie à Gram négatif. La partie saccharidique est responsable de la réponse immunitaire de l'hôte, il participe aussi aux mécanismes de virulence, en plus de son rôle protecteur, cela explique la présence de porines spécialisées au sein de la membrane externe. En revanche, le feuillet périplasmique de la membrane externe ressemble à celui de la membrane cytoplasmique. Certaines bactéries sont dépourvues de la partie polysaccharidique du LPS, cela les rend LPS de forme rugueuse (Silhavy *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014).

1.1.2 Les polysaccharides fonctionnels

Les polysaccharides fonctionnels regroupent un grand spectre de macromolécules polysaccharidiques, notamment ceux impliqués dans les biofilms, les slimes et les capsules. Bien qu'ils participent aux rôles structuraux, leur classification repose sur le fait qu'il s'agit d'exopolysaccharides, autrement dit, des polysaccharides sécrétés. Cette classe comprend une très grande diversité de molécules, en raison de la variété des unités constitutives (monosaccharides) et des liens glucidiques entre eux (Khan, R. *et al.*, 2022). De nombreux polysaccharides de cette classe sont connus pour leur utilisation, par exemple, la cellulose, l'amidon et l'alginate (Netrusov *et al.*, 2023).

Les fonctions de ces polysaccharides se répartissent selon les propriétés de leurs composantes et les bactéries sécrétrices. Parmi ces fonctions figurent la communication intercellulaire, l'adhésion aux surfaces, la formation de biofilms protecteurs, la formation de slimes favorisant la motilité, ainsi que la virulence et la résistance aux antibiotiques (Islam et Lam, 2014; Kaur et Dey, 2023; Sutherland, 1988).

1.1.2.1 Les polysaccharides sécrétés

Les exopolysaccharides sont des polysaccharides sécrétés par certaines bactéries sous la forme d'un glycocalyx, majoritairement constitué de polysaccharides et de glycoprotéines. Le glycocalyx peut se présenter sous la forme d'une structure extracellulaire appelée la capsule, ou sous une forme plus lâche, formant un biofilm ou un slime. À l'inverse, les polysaccharides sécrétés peuvent aussi être sécrétés dans le milieu extérieur sans former de structures extracellulaires (Kaur et Dey, 2023). Ces polysaccharides ont acquis une importance croissante ces dernières années en raison de leurs utilisations industrielles (Alizadeh-Sani *et al.*, 2019).

1.1.2.1.1 La capsule bactérienne

La capsule bactérienne est une structure spécialisée chez certaines bactéries, elle joue un rôle protecteur et peut contribuer à la virulence. De longue date, la capsule est associée à la pathogénicité (Gao *et al.*, 2024).

La capsule est constituée de chaînes longues de polysaccharides généralement chargées négativement. Ces chaînes peuvent atteindre la longueur entre 100-400 nm. Parfois une même souche peut produire plusieurs types de capsules. En plus de son rôle protecteur, la capsule protège également les structures bactériennes externes, par exemple, le flagelle, les pili et même le lipopolysaccharide (Willis et Whitfield, 2013).

1.2 Synthèse de polysaccharides bactériens

Trois voies principales sont impliquées dans la synthèse et la sécrétion des polysaccharides bactériens. Ces voies diffèrent par leurs mécanismes moléculaires, les types de polysaccharides qu'elles produisent, et leur régulation. Ces trois voies sont :

1.2.1 La voie ABC transporteur-dépendante

Les transporteurs ABC (ATP-binding cassette) sont des systèmes universels présents dans tous les domaines du vivant. Ils jouent un rôle clé dans la sécrétion de nombreux polysaccharides bactériens, notamment : les antigènes-O des LPS, les polysaccharides capsulaires des groupes II et III, par exemple, celui chez *Streptococcus pneumoniae* impliqué dans l'évasion du système immunitaire de l'hôte, ainsi que les acides téichoïques produits par *Bacillus subtilis* (Kasahara *et al.*, 2016; Kuklewicz et Zimmer, 2024).

Le complexe du transporteur ABC est composé de quatre domaines principaux : deux domaines transmembranaires (TMD), qui forment un canal dans la membrane interne et permettent le passage du polysaccharide, et deux domaines de liaison à l'ATP (NBD), qui hydrolysent l'ATP pour fournir l'énergie nécessaire au transport. Des protéines de polymérisation de polysaccharides et de son transport sont impliquées aussi (Akhtar et Turner, 2022; Vasiliou *et al.*, 2009; Whitney et Howell, 2013).

Les étapes globales de la voie ABC transporteur-dépendante (figure 1.3) : *En premier*, La polymérisation du polysaccharide naissant prend place dans le cytoplasme par des protéines glycosyl-transférases, cela se fait par l'ajout des unités de monosaccharides à l'ancre de monosaccharide lié à un porteur lipidique. *Le transport actif* : Une fois synthétisés, les polysaccharides sont transportés à travers la membrane interne par le complexe ABC, en utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. *Sécrétion finale* : Les polysaccharides sont transloqués à travers la membrane externe par des protéines spécifiques Wza (OPX) et Wzc (PCP), souvent associées au complexe ABC (Cuthbertson *et al.*, 2007; Masselot--Joubert et Di Renzo, 2025).

La voie ABC transporteur – dépendante

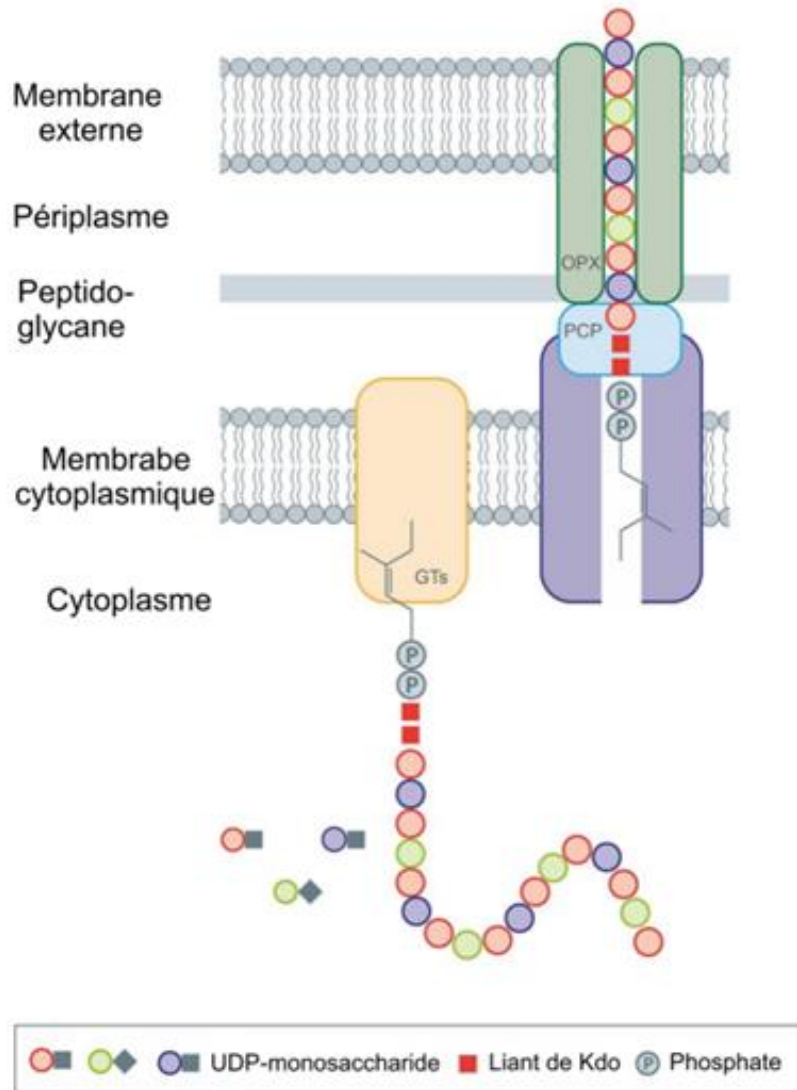


Figure 1.3 : La voie ABC transporteur-dépendante. Le mécanisme ABC transporteur-dépendant implique quatre protéines. La polymérisation a lieu dans le cytoplasme avec des protéines d'activité de glycosyl-transférase (GT), le nombre et la spécificité des GTs impliquées dans la synthèse déterminent la nature du polysaccharide, qu'il s'agisse d'un homopolymère ou d'un hétéropolymère (Schmid et al., 2015). Les unités ajoutées sont activées par la liaison avec les dinucléotides d'uracile. Une fois la chaîne de polysaccharide est synthétisée au sein du cytoplasme, elle est transportée vers le périplasma par les transporteurs d'ABC. La sécrétion finale vers l'espace extracellulaire s'effectue par deux protéines d'export l'OPX et la PCP (Schmid *et al.*, 2015).

1.2.2 La voie synthase-dépendante

Cette voie est principalement impliquée dans la synthèse et la sécrétion des homopolymères, tels que la cellulose et l'alginate. Contrairement aux voies ABC transporteur-dépendantes et Wzx/Wzy-dépendantes, généralement, cette voie ne requiert pas l'activation de monosaccharides (unités de polysaccharides), sous forme liés à des porteurs lipidiques. En plus les protéines de type glycosyl-transférase impliquées dans cette voie effectuent les étapes de polymérisation et de transport de polysaccharide naissant vers le périplasme au lieu de deux protéines, comme dans les deux autres voies. Le nombre de protéines impliquées est en général inférieur à celui des autres voies. Généralement les polysaccharide produits par les voies synthase-dépendantes sont linéaires (Whitney et Howell, 2013).

Les étapes de synthèse et de sécrétion passent en premier par l'activation d'une co-polymérase associée à la glycosyl-transférase. Cette co-polymérase se lie avec di-GMP cyclique (c-di-GMP), un second messenger qui déclenche l'activation. Puis une Glycosyl-transférase membranaire (la synthase) catalyse la polymérisation des monosaccharides pour former le polymère. Une fois le polysaccharide synthétisé atteint le périplasme, une protéine périplasmique (TPR- tetratricopeptide repeat containing scaffold protein) l'accompagne pour éviter la dégradation, et le guider vers des protéines en tonneau bêta intégrées dans la membrane externe, qui facilitent sa sécrétion (figure 1.4).

Les polysaccharides synthétisés par ce type de voie sont bien connus et répandus globalement en raison de leurs utilisations. La cellulose est produite par plusieurs bactéries, notamment *Gluconacetobacter xylinus*, et est un composant majeur des biofilms bactériens. L'alginate chez *Pseudomonas aeruginosa* confère une résistance accrue aux antibiotiques et joue un rôle clé dans les infections chroniques des patients atteints de la fibrose kystique (Whitney et Howell, 2013).

La voie synthase- dépendante

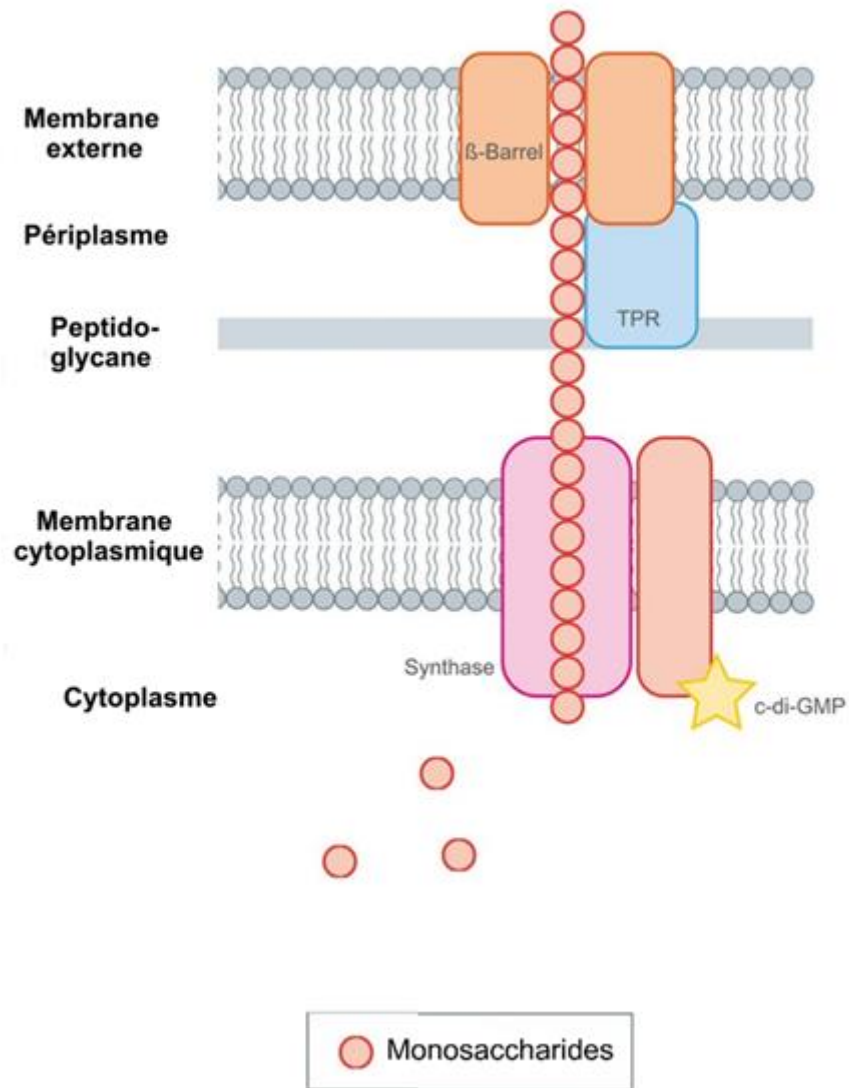


Figure 1.4 : La voie synthase-dépendante. Cette voie comprend quatre protéines essentielles. La glycosyl-transférase polymérise le polysaccharide à partir des monosaccharides dans le cytoplasme, où la polymérisation a lieu. La synthase simultanément assure l'export du polysaccharide vers le périplasm. La protéine TPR le protège et guide vers la porine en tonneau bêta pour la sécrétion (Cuthbertson *et al.*, 2007; Schmid *et al.*, 2015; Whitney et Howell, 2013).

1.2.3 La voie Wzx/Wzy-dépendante

La voie Wzx/Wzy-dépendante est la voie de production pour les polysaccharides la plus répandue chez les bactéries. Elle est impliquée dans la synthèse et la sécrétion de polysaccharides complexes, tels que les polysaccharides capsulaires des groupes I et IV, des exopolysaccharides (EPS) et certains antigènes-O attachés aux molécules de LPS (Ascari et Morona, 2025).

Pour les voies Wzx/Wzy-dépendantes (figure 1.5), la synthèse débute dans le cytoplasme par l'ajout de phosphate de monosaccharide au phosphate undécaprényle, formant un monosaccharide undécaprényle pyrophosphate (Und-PP). Les monosaccharides suivants sont transférés séquentiellement depuis leurs précurseurs de nucléotides de monosaccharides (par exemple, UDP-glucose, GDP-mannose) par des glycosyl-transférases spécifiques (Ascari et Morona, 2025; Hong *et al.*, 2015). Quand l'unité de répétition, qui consiste de trois à six monosaccharides, est synthétisée, la translocation se fait par Wzx (flippase) qui transloque l'unité prête de la face cytoplasmique à la face périplasmique de la membrane interne (Islam et Lam, 2014). La polymérisation des unités de répétition se fait par Wzy (polymérase) dans l'espace périplasmique pour former une chaîne polysaccharidique. Ce processus est hautement spécifique et dépend de la reconnaissance des motifs structuraux des unités répétitives. À la suite de polymérisation, la régulation de la longueur du polysaccharide est faite par la protéine Wzz ou Wzc (PCP), une co-polymérase qui agit comme un régulateur de la longueur des chaînes polysaccharidiques. Cette régulation est essentielle pour la fonctionnalité des polysaccharides, notamment pour les antigènes-O du LPS, où la longueur peut influencer la capacité d'évasion immunitaire. Dans le cas de LPS, la protéine ligase WaaL attache le polysaccharide à l'oligosaccharide du noyau lié au lipide A dans le périplasma pour former une molécule de LPS complète (Islam et Lam, 2014).

La sécrétion finale de la chaîne polysaccharidique synthétisée s'effectue à travers de la membrane externe par la formation d'un complexe de sécrétion par des protéines telle que Wza (Dong *et al.*, 2006). La structure du complexe de Wza a été conçue pendant une quinzaine d'années comme étant la sortie finale à travers la membrane externe, étant donné que la Wza, comme l'un du système de sécrétion du polysaccharide capsulaire du groupe I, contient des domaines transmembranaires qui reposent dans la membrane. La fin de ce dogme était faite par la découverte de gènes codant de porines en tonneau bêta avec une classe spécifique de Wza qui manque les domaines transmembranaires chez *M. xanthus*. Cette classe s'avouait la plus répandue chez les bactéries pour les voies Wzx/Wzy-dépendantes (Saïdi, Mahanta, *et al.*, 2022).

La voie Wzx/Wzy est particulièrement complexe en raison de la diversité des polysaccharides qu'elle produit, notamment les antigènes-O des LPS et les polysaccharides sécrétés. La structure chimique de ces polysaccharide est également variée, en raison de l'implication de plusieurs glycosyl-transférases dans cette voie, alors ces polysaccharides sont souvent des hétéropolymères, composés d'unités de répétition variées (Islam et Lam, 2014).

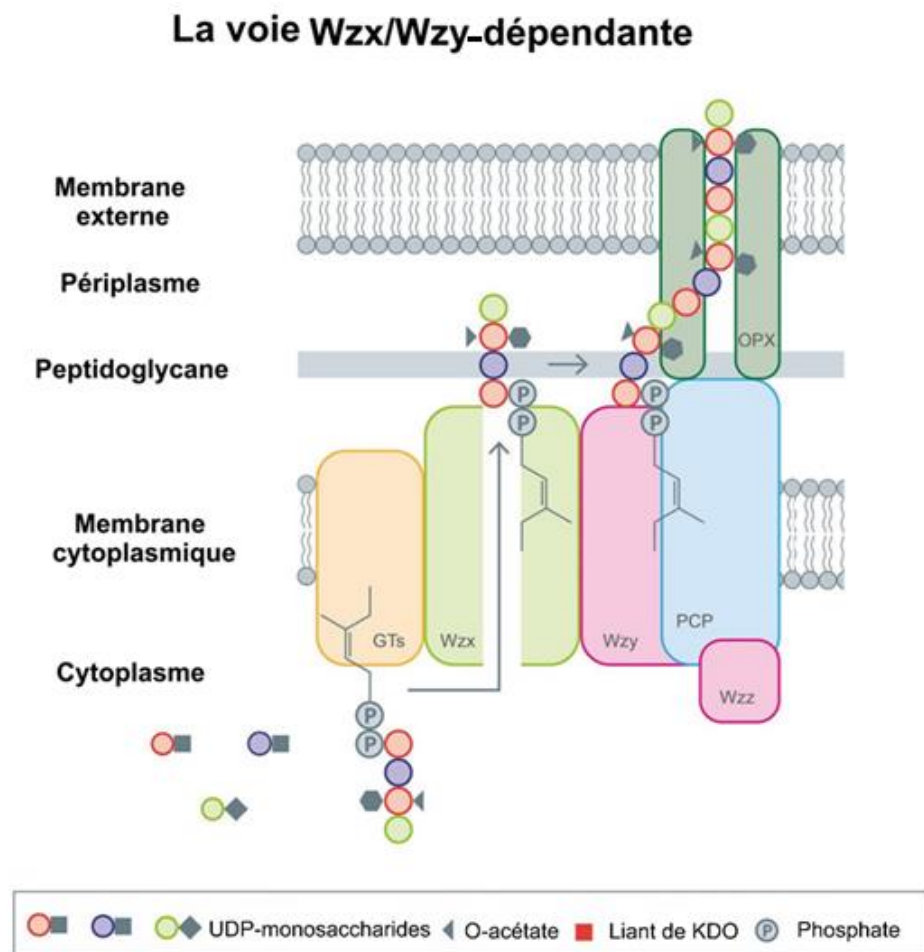


Figure 1.5 : La voie dépendante des Wzx/Wzy. Le schéma général de la voie Wzx/Wzy-dépendante, où des glycosyl-transférases lient les monosaccharides activés sous formes attachées à des porteurs lipidiques. Le premier ajout est particulier en raison de la formation de UndPP (undécaprényl pyrophosphate). Les ajouts suivants se font par clivage du porteur lipidique et liaison à l'unité de répétition naissante. Lorsque l'unité est prête, elle est transférée par la flippase (Wzx) qui la fait basculer vers la face périplasmique, où s'effectue la polymérisation de ces unités. La régulation de la longueur et l'export sont assurées par les protéines PCP et OPX (Islam et Lam, 2014; Schmid *et al.*, 2015).

1.3 *Myxococcus xanthus*

Myxococcus xanthus est une bactérie tellurique à Gram négatif qui appartient à l'embranchement de Myxococcota (anciennement delta-protéobactérie) (Kroos *et al.*, 2025). Elle est de forme bacillaire et se rencontre dans de nombreux environnements terrestres et aquatiques. L'importance de *M. xanthus* provient de son mode de vie sociale et multicellulaire. Contrairement aux autres bactéries, dont les cellules s'assemblent de façon aléatoire, combinées au sein d'un biofilm amorphe. *M. xanthus* présente un système avancé de différenciation, certaines cellules forment des corps fructifères, d'autres entrent en mort programmée et d'autres s'éloignent par motilité individuelle ou sociale afin de rechercher des sources nutritionnelles. De plus *M. xanthus* adopte un comportement de prédation qui nécessite une coordination et une collaboration entre les cellules pour former des essaims capables d'attaquer les proies. Ce comportement collaboratif de prédation n'empêche pas la prédation individuelle (Kroos *et al.*, 2025; Mohr, 2018).

Par ailleurs, *M. xanthus* et les espèces de Myxococcota possèdent de grands génomes, *M. xanthus* a un génome d'environ 9,14 millions pb. Cela s'accompagne d'une forte variation de contenu de gènes accessoires : entre 70%-90% des gènes sont accessoires selon la souche au sein de l'embranchement (Chambers *et al.*, 2020). Ce taux élevé de gènes accessoires n'amoindrit pas leur importance, il met l'accent de la complexité et de la richesse génétiques de cet embranchement. Par ailleurs, environ un cinquième des gènes chez *M. xanthus* sont différemment régulés et contrôlés selon la phase de développement de la cellule (Muñoz-Dorado *et al.*, 2019). La capacité de sporulation (formation de spores), phénomène plutôt connu chez les bactéries à Gram positif, fait de *M. xanthus* un modèle d'étude privilégié pour examiner ce processus.

La communication entre les cellules de *M. xanthus* est médiée par le pilus de type IV (T4P), qui oriente et régule la motilité sociale (Saïdi, Bitazar, *et al.*, 2022). Ces pili sont polaires (aux pôles du bacille) et interviennent dans la rétraction et les interactions entre les cellules pendant la motilité sociale (Wu et Kaiser, 1995). Tous ces aspects de *M. xanthus* sont médiés, au moins en partie, par les polysaccharides (Kroos *et al.*, 2025).

1.3.1 Cycle de vie de *M. xanthus*

Le mode de vie sociale de *M. xanthus* est bidirectionnel, alternant entre les formes végétatives en présence de nutriments ou de proies, ce qui sollicite le comportement de prédation, la motilité sociale et la

formation d'essaims (Keane et Berleman, 2016), et la forme dormante représentée par les spores. En conditions de pénurie de nutriments, ou au cours de la prédation et de la consommation de nutriments/proies, des corps fructifères commencent à se former, une forme de différenciation bactérienne parmi les plus élaborées chez les bactéries. Les corps fructifères représentent un niveau de différenciation élevé. Des myxospores se forment au centre, et les cellules périphériques meurent (figure 1.6).

Dans ce cycle de vie complexe, les polysaccharides jouent des rôles clés dans la différenciation et l'accomplissement de chaque étape du processus (décrit en détail en dessous). Les polysaccharides EPS et BPS sont impliqués dans la motilité et la formation des corps fructifères, le polysaccharide antigène-O de LPS et l'EPS impliqués dans la communication et l'identification entre les cellules. En revanche, le polysaccharide MASC est primordial dans le processus de sporulation (Kroos *et al.*, 2025; Saïdi, Mahanta, *et al.*, 2022).

Le comportement de prédation de *M. xanthus* requiert également organisation et collaboration. La prédation peut s'effectuer selon la technique « meute de loups ». Ce comportement collectif repose sur la formation des essaims qui attaquent en vagues de cellules adhérentes pour entourer la proie. Cette adhésion dépend de l'EPS et du pilus (T4P). Plus récemment, il a été montré qu'elle peut aussi être réalisée par des cellules individuelles (Berleman et Kirby, 2009; Kroos *et al.*, 2025).

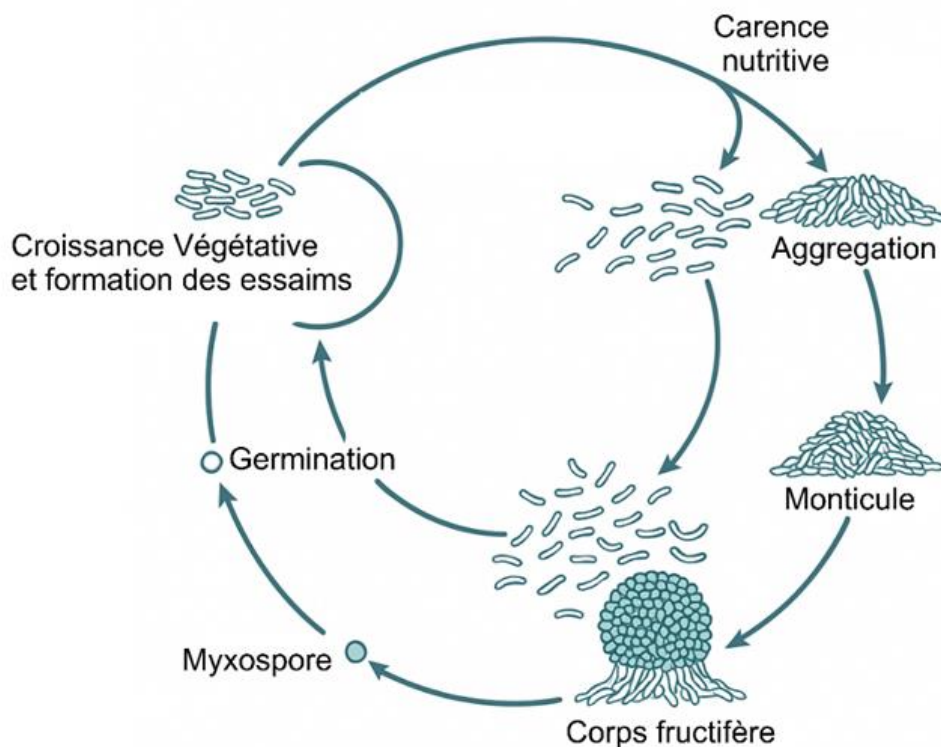


Figure 1.6 : Le cycle de vie de *M. xanthus*. Les étapes du cycle de vie de *M. xanthus* alternent entre la croissance à partir de spores et les étapes végétatives, au cours desquelles la collaboration (rôle de l'antigène-O du LPS) et la motilité sociale (médiée principalement par les polysaccharides EPS et BPS) ont lieu. Les étapes végétatives successives aboutissent à la formation de corps fructifères, où des myxospores se forment (processus médié par le polysaccharide MASC) et où des cellules à motilité individuelle aventureuse partent à la recherche de sources alimentaires. Le comportement de prédation et la formation des essaims ont lieu pendant ces étapes végétatives. Les myxospores germinent de nouveau dans des conditions favorables de croissance (Pérez-Burgos et Søgaard-Andersen, 2020; Zusman *et al.*, 2007).

1.3.2 La motilité chez *M. xanthus*

M. xanthus manifeste deux types distincts de motilité : la motilité sociale (motilité S) et la motilité individuelle ou aventureuse (motilité A). La première (motilité S) dépend de la collaboration entre les cellules médiée par le pilus de type IV (T4P), comparée à la deuxième, où la motilité individuelle implique l'adhésion et le transport dirigé d'un complexe trans-enveloppe vers l'arrière de la cellule (Islam et Mignot, 2015; Islam *et al.*, 2020).

1.3.2.1 Motilité aventureuse (motilité A)

Compte tenu de la forme bacillaire de *M. xanthus*, la motilité A est polaire et bidirectionnelle, c'est-à-dire qu'elle peut débiter à partir de l'un ou l'autre des pôles, avec des changements périodiques de direction.

Cette motilité implique une adhésion au substrat, suivie du déplacement de complexes protéiques (figure 1.7 A, B et C). Plusieurs mécanismes et protéines sont impliqués, notamment la protéine AglZ dont les clusters sont stabilisés aux sites d'adhésion au substrat. Ce système, connu sous le nom de système Agl-Glt ou complexe d'adhésion focale (FA), fonctionne par l'accouplement de moteurs cytosquelettiques à des structures extracellulaires pour promouvoir la motilité (Cambillau et Mignot, 2025). Une autre protéine importante est MglA, qui forme un complexe avec AglZ et MreB (actine bactérienne). Ce complexe se localise au pôle de tête qui dicte la direction du mouvement. MglA est inhibée par la protéine MglB, enrichie au pôle opposé. La présence de MglB déstabilise le complexe formé de AglZ-MreB-MglA (Islam *et al.*, 2023; Islam et Mignot, 2015). Ce dispositif présente plusieurs analogies avec les systèmes de migration cellulaire eucaryotes.

1.3.2.2 Motilité sociale (motilité S)

Étant donné que *M. xanthus* est une bactérie sociale. Sa motilité découle de la capacité de collaboration et de signalisation communes entre les cellules. En réponse à un signal indiquant la présence de nutriments, la motilité S se met en place, notamment par la formation d'essaims attaquant les proies en masse. Cette motilité tire aussi parti des trajectoires déjà tracées par les cellules précédemment passées et de l'énergie mécanique fournie par les cellules de tête, grâce à l'utilisation du T4P qui permet la rétractation et la traction cellulaires (figure 1.7 D, E et F). La présence du polysaccharide EPS est primordiale pour la motilité S, tant pour la communication que pour l'adhésion médiées par le pilus (Islam et Mignot, 2015; Muñoz-Dorado *et al.*, 2016).

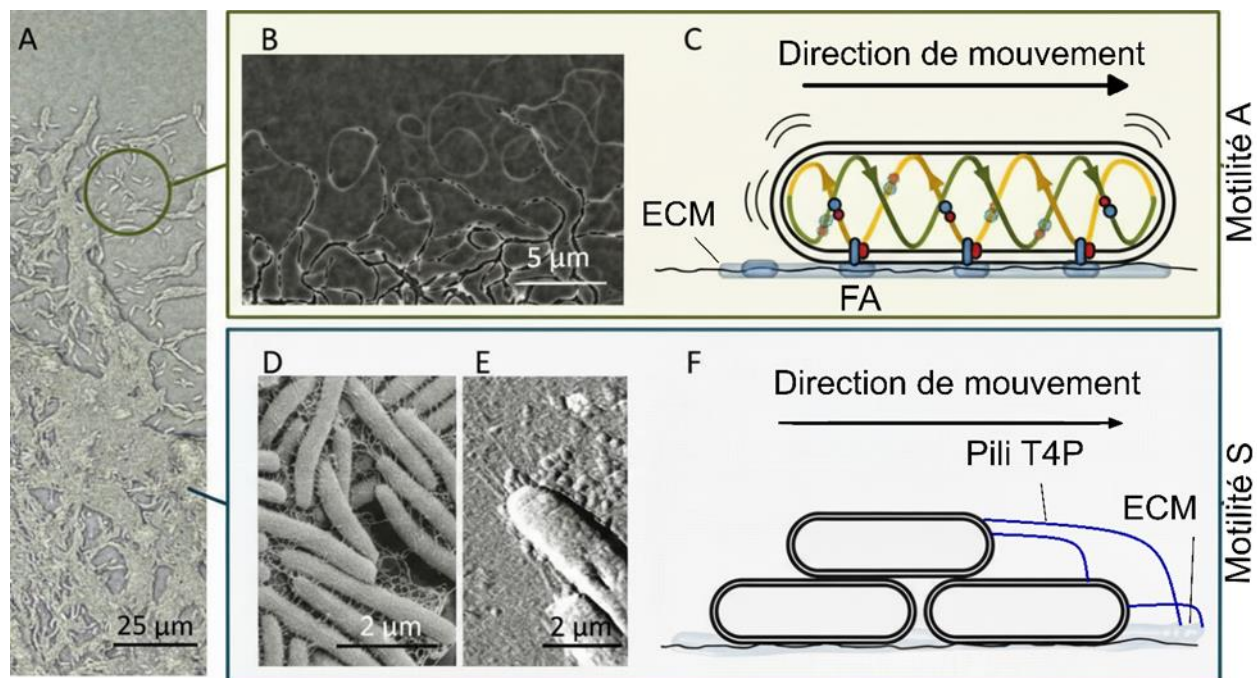


Figure 1.7 : Les motilités A et S chez *Myxococcus xanthus*. (A) Bord d'un essaim de *M. xanthus*. Des cellules individuelles en mode de motilité A sont visibles dans le cercle haut, et des cellules en mode de motilité S en bas. (B) Image en microscopie à contraste de phase montrant les pistes (trajectoires) utilisées pour la motilité A au front de l'essaim. Ces pistes servent de précurseurs à la motilité de groupes de cellules alignées (motilité S). (C) Modèle de motilité A : le système Agl-Glt forme de points d'adhésion au substrat, ces complexes se déplacent en hélice autour de la cellule et poussent le corps cellulaire via leur couplage aux moteurs cytosquelettiques. L'adhésion au substrat s'effectue via le slime de la matrice extracellulaire (ECM), formant des complexes d'adhésion focales (FA). (D) Image de MEB (microscopie électronique à balayage) de fibrilles cellulaires entrelacées assurant l'adhésion et la cohésion cellulaires. (E) Image de MFA montrant les pili (T4P) attachés aux cellules voisines (F) Modèle de motilité S : l'ancrage de pili (T4P) aux cellules voisines se fait par l'attachement au polysaccharide EPS, générant des cycles de rétraction et de traction. Adapté de (Muñoz-Dorado *et al.*, 2016).

1.3.2.3 L'interchange et la coordination entre la motilité A et S :

La coordination et le changement de motilité entre A et S dépend du système Frz chimio-sensoriel, ce système contrôle les deux mécanismes responsables de ces deux motilités, régulant la motilité S par les pili de type IV (T4P), et régulant la motilité A par le système Agl-Glt. Cela permet ainsi de changer l'orientation et le pôle conducteur (Guiseppe *et al.*, 2019). Parallèlement, les collisions entre des cellules individuelles et des groupes de cellules favorisent des alignements cellulaires qui forment des agrégats en mouvement (Khan, T. T. *et al.*, 2025).

1.3.3 Les polysaccharides chez *M. xanthus*

Les polysaccharides de *M. xanthus* sont synthétisés et sécrétés par les voies mentionnées précédemment. À ce jour, quatre polysaccharides ont été identifiés chez *M. xanthus*, EPS, BPS, MASC et l'antigène-O du LPS. L'antigène-O du LPS est synthétisé par la voie ABC transporteur-dépendante. Les trois autres polysaccharides importants EPS (exopolysaccharide), le polysaccharide BPS (biosurfactant polysaccharide) et MASC (major spore coat) sont tous synthétisés par la voie Wzx/Wzy-dépendante. Ils interviennent dans tous les processus du cycle de vie de *M. xanthus*, incluant la motilité et la sporulation (Saïdi, Mahanta, *et al.*, 2022). Le mécanisme de cette voie des trois polysaccharides est globalement identique chez *M. xanthus*, à l'exception de l'activation de la protéine PCP (Polymerase co-protein) : pour l'EPS et le MASC, l'activation est contrôlée par une tyrosine phosphatase associée avec PCP. En revanche, la PCP de BPS contient une tyrosine autokinase bactérienne (BYK) dans sa structure (figure 1.9) (Islam *et al.*, 2020; Saïdi, Mahanta, *et al.*, 2022). L'activation et l'inactivation de PCP de BPS alors sont réglées par la phosphatase Wzb et le domaine BYK.

La récente mise en évidence de gènes codants de protéines en tonneau bêta, voisins de ceux codant les protéines OPX dans les trois clusters de systèmes Wzx/Wzy d'EPS, BPS et MASC, met en lumière un nouveau mécanisme et invite à examiner les rôles de ces protéines porines (Saïdi, Mahanta, *et al.*, 2022).

1.3.3.1 La synthèse et les fonctions d'EPS

L'EPS est la composante principale de l'ECM chez *M. xanthus*. Plus de moitié de la masse sèche de l'ECM est constituée d'EPS. Sa composition inclut du glucose, du rhamnose, du mannose et du N-acétyl glucosamine, ainsi que d'autres monosaccharides en faible proportion. Cette composition variable en monosaccharides, ainsi que la diversité des liaisons glycosidiques, reflètent la complexité de cette molécule et mettent en lumière ses fonctions diverses (Gibiansky *et al.*, 2013).

Les fonctions de l'EPS sont diverses et dépendent de la phase du cycle de vie, elles incluent la survie cellulaire, la motilité sociale et la formation de corps fructifères, ainsi que la constitution du biofilm et de l'ECM. Il participe aussi à la réponse au stress et à la communication intercellulaire. Le rôle important de ce polysaccharide dans la motilité sociale découle de son interaction avec le pilus de type IV (T4P). Il est proposé que l'EPS serve d'ancre au pilus (T4P) et facilite la motilité en soutenant la rétraction et l'extension du pilus (T4P) (Saïdi, Mahanta, *et al.*, 2022; Zhou et Nan, 2017). L'absence d'EPS, chez des mutants de délétion, entraîne des défauts phénotypiques, notamment l'absence de motilité sociale et

l'absence de la formation des essaims. Ces fonctions nécessitent des interactions avec plusieurs mécanismes cellulaires. Par exemple, la voie chimio-sensoriel Dif contrôle la production d'EPS. Le c-di-GMP régule également cette production (Black *et al.*, 2015; Skotnicka *et al.*, 2016).

La voie Wzx/Wzy-dépendante est le mécanisme de synthèse et la sécrétion de l'EPS chez *M. xanthus*. Elle débute avec la protéine WzxX (MXAN_7416 - flippase), qui transloque l'unité de répétition liée à l'undécaprényl pyrophosphate (Und-PP) naissante vers le périplasma, la polymérisation de ces unités est assurée par WzyX (MXAN_7442 - polymérase) à partir des unités préalablement transloquées. La longueur de cette chaîne est déterminée par PCP (MXAN_7421 - WzcX). L'état de phosphorylation/déphosphorylation est contrôlé par la kinase (MXAN_7447 - WzeX) et la phosphatase Wzb (MXAN_4227). Le complexe formé par PCP et OPX (MXAN_7417 - WzaX), constitué de plusieurs protomères de chaque protéine, établit le canal de sécrétion avec la porine en tonneau bêta (MXAN_7418 – WzpX) pour la sécrétion finale de l'EPS (Pérez-Burgos et Sogaard-Andersen, 2020; Saïdi, Mahanta, *et al.*, 2022).

1.3.3.2 La synthèse et les fonctions du MASC

MASC est sécrété au cours de la sporulation. Cependant, il est synthétisé dès les phases de développement. Il enrobe les myxospores, leur conférant une brillance distinctive aux myxospores, il est également primordial à la formation des myxospores (Kroos *et al.*, 2025; Pérez-Burgos *et al.*, 2020). La couche de MASC couvrant les spores contient aussi des protéines non-essentiels à la formation de cette couche. Outre la formation de myxospores au sein des corps fructifères en cas de pénurie de nutriments, des myxospores se forment aussi en réponse à un stress chimique induit par des produits comme le glycérol ou le DMSO (Di-méthyl sulfoxyde). La couche de MASC qui couvre les myxospores dans les deux contextes reste similaire et demeure indispensable (Holkenbrink *et al.*, 2014; Pérez-Burgos *et al.*, 2020).

Le mécanisme de synthèse et de sécrétion du MASC chez *M. xanthus* ressemble à celui de l'EPS. Translocation des unités de répétition vers le périplasma par la flippase (MXAN_3260 – WzxS), polymérisation de ces unités par la polymérase (MXAN_3026 – WzyS), contrôle de la longueur et transport par PCP (MXAN_3227 – WzcS). L'état de phosphorylation/déphosphorylation est contrôlé par la kinase (MXAN_3228 – WzeS) et la phosphatase Wzb (MXAN_4227). Le transport final est assuré par OPX (MXAN_3225 – WzaS) et la protéine en tonneau bêta (MXAN_3226 -WzpS) (Saïdi, Mahanta, *et al.*, 2022).

1.3.3.3 La synthèse et les fonctions du BPS

D'après sa dénomination, BPS (biosurfactant polysaccharide) présente des propriétés d'émulsification, ce qui constitue l'un de ses rôles majeurs. BPS a été récemment identifié comme possédant une structure originale. Il s'agit le seul polysaccharide chez *M. xanthus* dont la composition chimique est connue. Les unités de répétition sont composées d'une N-acétyl-D-mannosamine et des trois acides de N-acétyl-D-mannosaminuronique (figure 1.8). Cette composition acide rapproche BPS de l'APE (*Acinetobacter* polyelectrolytic exopolysaccharide), composant principal du produit bactérien RAG-1 emulsan, utilisé pour le bio-nettoyage des hydrocarbures dans les océans (Islam *et al.*, 2020).

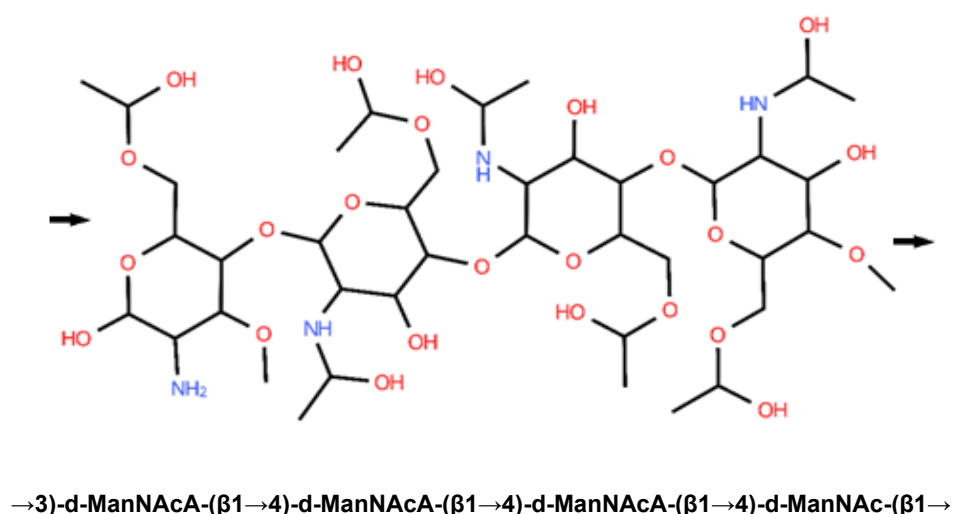


Figure 1.8 : La structure chimique du BPS. La structure chimique des unités de répétition du BPS, composé de quatre monosaccharides, le premier (à gauche) est une N-acétyl-D-mannosamine, et les trois suivants sont monosaccharides acides de N-acétyl-D-mannosaminuronique. Une acétylation a été détectée sur l'atome de carbone 3 de ces trois derniers monosaccharides. La configuration de tous ces monosaccharides est de bêta β. La présence du groupe amine au sein du premier monosaccharide confère une charge polaire positive partielle proche de la neutralité. À l'inverse, les trois autres monosaccharides, porteurs d'un groupe d'acétyle peuvent exprimer une charge partielle négative. Cette combinaison, ainsi que l'atténuation des charges par le chevauchement et l'interaction de groupes chimiques alternant charges positive et négative, mettant en place de propriétés chimiques des émulsifiants (Islam *et al.*, 2020), (structure créée par moldraw.com).

Les fonctions et les rôles généraux de BPS ont été récemment déterminés et restent à approfondir. La fonction principale est liée à la motilité. Les souches de délétions qui causent l'absence du BPS ont montré que les essais issus des corps fructifères ne sont plus homogènes ni bien distribués au tour du corps fructifère. La production de BPS a été confirmée comme étant réprimée par le mécanisme de production

de pilus de type IV (T4P). Le criblage de cellules de corps fructifères a également montré que la production de BPS est concentrée vers le centre de corps, alors que la production d'EPS est plutôt périphérique dans les essaims (Islam *et al.*, 2020). La nécessité concertée de ces deux polysaccharides, BPS et EPS, suggère une fonctionnalité commune et une coordination de production. Les deux agissent de manière coordonnée pour réguler la motilité. Lors de la motilité sociale, caractérisée par une élévation du niveau d'EPS et de pilus (T4P), ce dernier réprime l'expression de BPS. La constitution du centre de corps fructifère requiert la formation d'ECM et de Biofilm accompagnant les cellules. Étant donné que le niveau de BPS est élevé à ce centre, cela suggère un rôle de BPS dans ce processus (Islam *et al.*, 2020).

La synthèse de BPS s'effectue par la voie Wzx/Wzy-dépendante (figure 1.9), codée par deux loci. Elle débute par le couplage de monosaccharide au porteur lipidique undécaprényl- pyrophosphate (UndPP) par la protéine PNPT (MXAN_1043), suivi par l'activité de plusieurs glycosyl-transférases (MXAN_1026, MXAN_1027, MXAN_1029, MXAN_1030, MXAN_1031, MXAN_1032, MXAN_1033, MXAN_1036, MXAN_1037 et MXAN_1042) (Pérez-Burgos et Søgaaard-Andersen, 2020). La deuxième étape concerne la formation des unités de répétition par la polymérase (MXAN_1035, WzxB) qui transmet l'unité de répétition naissante à la flippase (MXAN_1028, WzyB) pour leur translocation vers la face périplasmique. La longueur de la chaîne polysaccharidique est contrôlée par la protéine PCP (MXAN_1025), qui contient également une tyrosine autokinase intégrée et dont l'activité est régulée par une phosphatase (Wzb, MXAN_4427) (Saïdi, Mahanta, et al., 2022). L'export s'effectue ensuite via le complexe de WzaB (MXAN_1915) et par le canal final, la protéine en tonneau bêta WzpB (MXAN_1916) (Saïdi, Mahanta, et al., 2022).

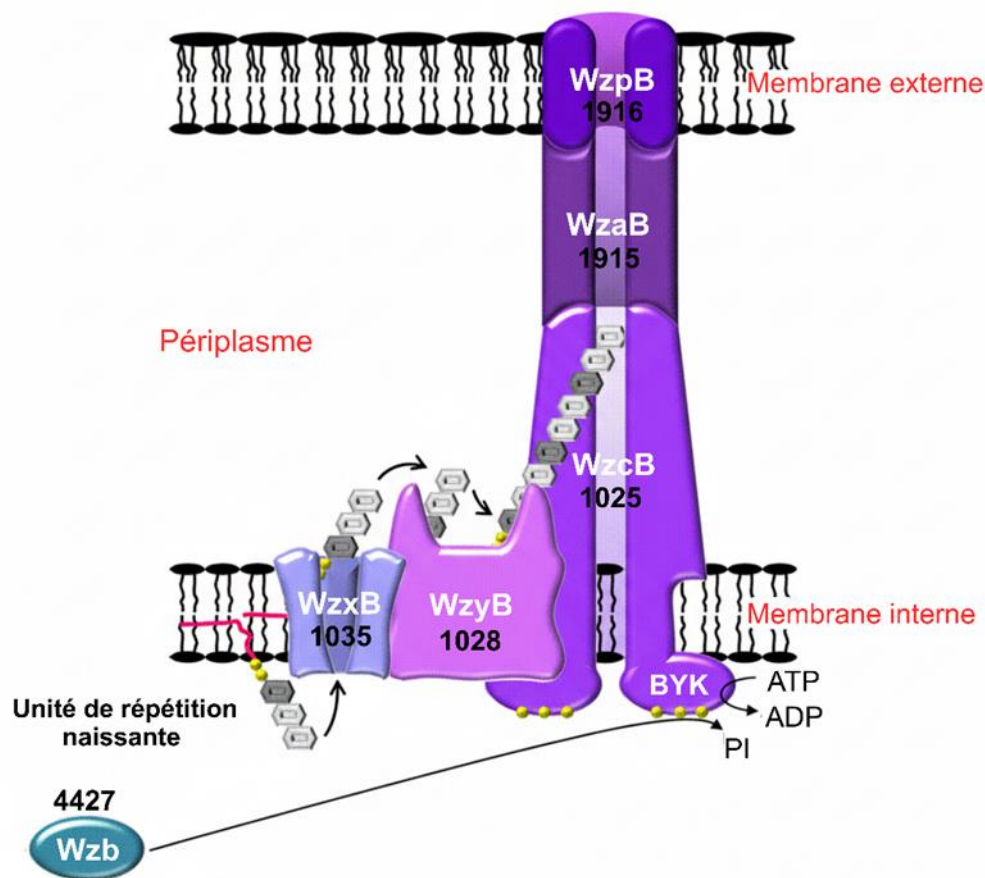


Figure 1.9 : La voie Wzx/Wzy-dépendante du BPS. Le système de sécrétion de BPS est constitué des protéines canoniques de cette voie. WzxB (MXAN_1035), la flippase, fait basculer les unités de répétition de la face cytoplasmique à la face périplasmique de la membrane interne. WzyB (MXAN_1028), la polymérase, polymérise ces unités. La PCP (MXAN_1025) détermine la longueur de la chaîne polysaccharidique, elle contient uniquement un domaine de tyrosine autokinase. La sécrétion s'opère via un canal formé par le complexe d'OPX (WzaB - MXAN_1915) et la sortie finale par la protéine en tonneau bêta WzpB (MXAN_1916). La déphosphorylation est assurée par une phosphatase commune aux trois voies Wzx/Wzy-dépendantes chez *M. xanthus*, la Wzb (MXAN_4427). Ces cycles de phosphorylation/déphosphorylation régulent l'activité de PCP, en permettant le passage du polysaccharide et en favorisant la formation d'un complexe, de PCP, qui interagit avec le complexe WzaB et WzpB (Saïdi, Mahanta, *et al.*, 2022).

1.3.3.4 Le polysaccharide antigène-O du LPS

Le LPS constitue le feuillet externe de la membrane externe qui, à son tour, est en contact avec l'environnement. La présence du LPS rend la membrane externe asymétrique, parce que le feuillet périplasmique est composé de phospholipides semblables à ceux des deux feuillets de la membrane

interne (cytoplasmique). La composition chimique du LPS est constituée de trois parties : le lipide A, l'oligosaccharide de cœur (core) et la partie polysaccharidique (antigène-O). La partie polysaccharidique du LPS, autrement nommée antigène-O, est importante, au-delà de son rôle de protection. Elle participe à la communication intercellulaire et il est suggéré qu'elle contribue à la motilité sociale (Pérez-Burgos *et al.*, 2019). Ce polysaccharide, antigène-O, est sécrété par la voie ABC transporteur-dépendante chez *M. xanthus*. La sécrétion implique quatre protéines essentielles formant le complexe ABC, Wzm (MXAN_4622 – TMD) est le domaine transmembranaire, Wzt (MXAN_4623 – NBD) qui hydrolyse d'ATP et deux glycosyl-transférases, WbgA (MXAN_4621) et WbgB (MXAN_4619). De plus, deux protéines ont été découvertes, PHPT (MXAN_2922) qui initie la formation du polysaccharide en le couplant au porteur lipidique et Waal (MXAN_2919), une protéine ligase qui lie l'antigène-O au reste de LPS (lipide A et oligosaccharide de cœur) (Pérez-Burgos *et al.*, 2019). La composition de l'antigène-O comprend deux monosaccharides : le D-glucose et la N-acétyl-6-O-méthyl D-galactose. Une méthylation variable est présente le long de l'antigène-O (≈60% de monosaccharides) (Saïdi, Gamboa Marin, *et al.*, 2022).

1.3.3.5 Les porines en tonneau bêta et les OPX de la voie Wzx/Wzy-dépendante chez *M. xanthus*

La découverte récente d'une classe de protéines de la membrane externe, associées aux protéines OPX, et leur large répartition, a remis en question le dogme qui prévalait depuis une quinzaine d'années. La théorie précédente mettait l'accent sur le rôle exclusif des OPX dans la sécrétion finale des polysaccharides, ces protéines formant, via leurs domaines transmembranaires externes, un canal pour la sortie du polysaccharide à travers de la membrane externe. Le canal est formé du complexe OPX octamérique (Collins et Derrick, 2007; Dong *et al.*, 2006).

De plus, l'identification des gènes codant des protéines en tonneau bêta adjacents à ceux des OPX a souligné leurs rôles. Cependant, le criblage des OPX a révélé une classe, la plus répandue au sein de toutes les bactéries, dépourvue de domaines transmembranaires, ce qui a renforcé l'hypothèse d'un rôle central des protéines en tonneau bêta (porines) (Saïdi, Mahanta, *et al.*, 2022).

Cette découverte a été faite chez *M. xanthus*, plus précisément au sein des trois voies de Wzx/Wzy-dépendantes (celles d'EPS, de BPS et de MASC). Les protéines en tonneau bêta (porines) s'observent dans toutes les classes d'OPX, malgré leur absence ponctuelle chez certaines bactéries. Ces porines présentent une homologie avec celles de la voie synthase-dépendante de sécrétion de PNAG (N-acétyl D-glucosamine)

(Saïdi, Mahanta, *et al.*, 2022). La nature des interactions et la formation des complexes sécrétoires par ces deux types de protéines restent à élucider dans cette nouvelle découverte.

Parmi les trois voies Wzx/Wzy-dépendantes chez *M. xanthus*, celle du BPS demeure la seule dont le polysaccharide possède une structure détaillée. En outre, la protéine PCP de BPS présente un mécanisme d'activation/désactivation évident, lié à la présence de domaine tyrosine autokinase. Ainsi, la caractérisation de cette voie et ses protéines constitue un atout majeur.

1.3.3.5.1 La protéine OPX (WzaB) de la voie Wzx/Wzy-dépendante de BPS

La structure de cette protéine comprend deux domaines essentiels. Un unique domaine N-terminal poly_export, conservé dans toutes les OPX et un domaine C-terminal SLBB (soluble ligand binding β -grasp) (figure 1.10). WzaB manque le domaine ou la partie finale de C-terminal transmembranaire ancré dans la membrane externe, ce qui la place dans la classe 3 des OPX (Saïdi, Mahanta, *et al.*, 2022). Cette particularité interroge son rôle direct dans la sécrétion du polysaccharide, la présence de protéine en tonneau bêta peut y répondre.

Le modèle global d'activité de Wza dans le système de sécrétion du polysaccharide capsulaire de groupe 1 chez *E. coli* repose sur la formation d'un complexe octamérique qui constitue un canal interagissant avec le complexe formé par des PCP (Wzc) (Collins et Derrick, 2007). Cependant, l'absence de domaines transmembranaires de WzaB (OPX), accompagnée avec la présence de protéines en tonneau bêta (WzpB) simultanément imposent de réévaluer ce modèle pour cette voie, afin d'établir le mécanisme par lequel un canal pourrait former et sécréter les polysaccharides. La structure chimique de WzaB compte 204 acides aminés, les 18 premiers correspondant au peptide signal (prédit par SignalP 6.0 (Teufel *et al.*, 2022)). Le domaine poly_export s'étend des acides aminés de 44 à 114 et le SLBB de 120 à 199. Le poids moléculaire est environ 20 kDa.

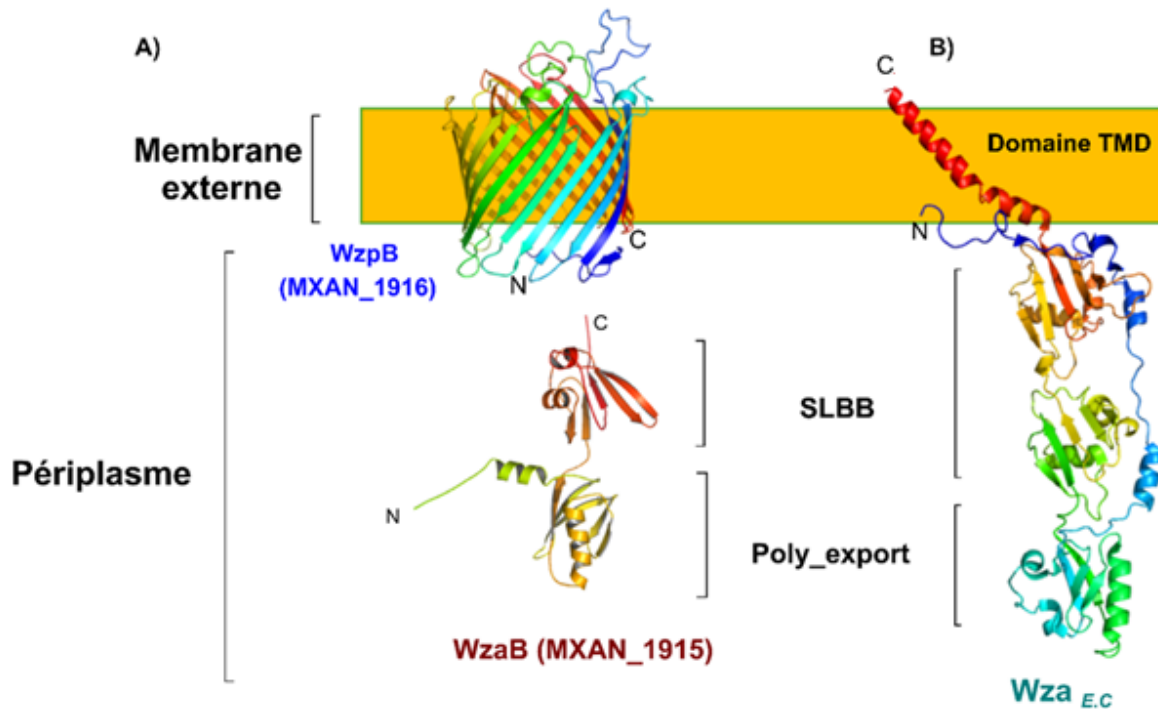


Figure 1.10 : Schéma de WzaB (OPX) et WzpB (tonneau bêta) de BPS et l'OPX classique. A) L'OPX (WzaB) de BPS est constituée de deux seuls domaines, poly_export et SLBB, l'absence de domaine transmembranaire est compensée par la présence et l'utilisation de la protéine en tonneau bêta WzpB chez *M. xanthus*. B) La comparaison avec des systèmes ne contenant que des OPX montre la présence d'un domaine transmembranaire pour l'OPX (Wza_{E.C}) canonique chez *E. coli* pour la sécrétion du polysaccharide capsulaire du groupe 1 (Dong *et al.*, 2006; Saïdi, Mahanta, *et al.*, 2022).

1.3.3.5.2 La protéine en tonneau bêta WzpB de la voie Wzx/Wzy-dépendante de BPS

La structure prédite par AlphaFold a montré une homologie à la protéine en tonneau bêta (porine) de la voie synthase-dépendante pour la sécrétion du PNAG (N-acétyl D-glucosamine). Cette homologie oriente la prédiction de fonctions de WzpB. Cette protéine adopte une forme de tonneau bêta de 18 brins (Saïdi, Mahanta, *et al.*, 2022). La fonction principale suggérée est donc liée à la dernière étape d'export à travers de la membrane externe. L'interaction entre cette protéine et l'OPX (WzaB) fait également l'objet d'investigations. Pour élucider son mode d'action, le profil électrostatique révèle une charge positive faible interne au sein du lumen, en accord avec la charge négative du polysaccharide BPS (Saïdi, Mahanta, *et al.*, 2022).

1.4 Hypothèse

En vue de la présence des protéines en tonneau bêta (Wzp - porines) et de leurs gènes dans les clusters de sécrétion des trois voies Wzx/Wzy-dépendantes chez *Myxococcus xanthus*, et du fait que les protéines OPX (Wza) de ces voies sont dépourvues de domaines transmembranaires (TMD). Je formule l'hypothèse suivante : il existe un mécanisme fonctionnel d'interaction entre les protéines en tonneau bêta et les OPX, l'absence de TMD (domaines transmembranaires) chez les OPX exige une interaction avec les porines pour assurer l'export des polysaccharides.

1.5 Objectifs de la recherche

Les objectifs de recherche sont élaborés en lumière de l'hypothèse :

1- Élucider la structure de la protéine en tonneau bêta (WzpB - porine) dans la voie Wzx/Wzy-dépendante du polysaccharide BPS chez *Myxococcus xanthus* : A) Virtuellement (informatiquement) et B) expérimentalement.

2- Définir les profils des complexes formés par des OPX (WzaB) seules et puis en présence de la porine en tonneau bêta (WzpB) et de la PCP (WzcB), par approche de modélisation (virtuelle).

3- Examiner les effets de l'absence et la complémentation de chaque protéine sur les profils phénotypiques.

CHAPITRE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les matériels et les méthodes employés dans ce projet, se répartissant en trois champs, les méthodes virtuelles, les matériels et les méthodes de la surexpression de la protéine WzpB (porine en tonneau bêta) et les effets des manipulations génétiques de délétion et de complémentation de gènes codant des protéines impliquées dans la voie Wzx/Wzy-dépendante du BPS.

2.1 Les structures virtuelles de WzpB (porine), WzaB (OPX) et leurs complexes et l'analyse Bio-informatique

Les structures tridimensionnelles des protéines WzaB et WzpB ont été obtenues à l'aide du service AlphaFold 3 (Abramson *et al.*, 2024), un outil de prédiction de structures protéiques basé sur l'intelligence artificielle. Les séquences des protéines ont été soumises au service, et les modèles générés ont été sélectionnés en fonction de leur score de confiance (pLDDT). Les modèles présentant un pLDDT supérieur à 90 ont été retenus pour des analyses ultérieures en prenant compte des diagrammes de PAE (predicted aligned error). Les étapes suivantes ont été réalisées, au moyen du solveur de Poisson Boltzmann et le logiciel ChimeraX (Jurrus *et al.*, 2018; Meng *et al.*, 2023) :

I- Ajout des atomes d'hydrogène : Les atomes d'hydrogène manquants ont été ajoutés pour mimer des conditions physiologiques, et éviter la perte de leur charge.

II- Attribution des charges : Les charges atomiques ont été calculées en fonction du pH physiologique (pH 7,0).

III- Analyse des résidus polaires : Les résidus polaires de chaque protéine ont été identifiés pour évaluer leur rôle potentiel dans les interactions.

IV- Calcul des charges nettes : Les charges nettes des protéines ont été déterminées afin de prédire leur comportement électrostatique.

2.1.1 Formation des complexes protéiques

Les interactions potentielles entre les protomères de WzaB (OPX) seuls et puis en présence de WzpB (porine en tonneau bêta) ont été explorées en générant des complexes protéiques contenant différents nombres de protomères pour WzaB. Les complexes ont été construits à l'aide de AlphaFold-Multimer, une extension d'AlphaFold dédiée à la prédiction des complexes protéiques. Les configurations suivantes ont été générées :

I- Homopolymères : Assemblage de protomères de WzaB (OPX) pour former de complexes sécrétoires.

II- Hétéropolymères : Assemblage de protomères de WzaB, avec ceux de WzpB et/ou de WzcB (PCP).

Les structures des complexes générés ont été optimisées en ajoutant des atomes d'hydrogène et en attribuant des charges atomiques, comme décrit précédemment. Les complexes ont ensuite été soumis à une analyse approfondie pour évaluer leurs interactions.

2.1.2 Analyse des interactions et de la stabilité des complexes formés par WzaB et/ou WzpB

Les complexes formés ont été analysés à l'aide du service PDBePISA (Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies) (Krissinel et Henrick, 2005), un outil spécialisé pour l'évaluation des interactions interprotéiques. Les paramètres suivants ont été mesurés pour chaque complexe, ces paramètres ont été obtenus au moyen du solveur de Poisson Boltzmann et le logiciel ChimeraX (Jurrus *et al.*, 2018; Meng *et al.*, 2023).

I- Énergie libre de dissociation (ΔG) : La valeur de ΔG a été utilisée pour évaluer la stabilité des complexes.

II- Nombre de liaisons hydrogène : Les liaisons hydrogène entre les protomères ont été comptées pour évaluer la contribution des interactions polaires.

III- surface des protomères et des interfaces : La superficie totale de chaque protomère et la superficie d'interaction (interface area) ont été calculées pour quantifier l'étendue des contacts entre les protomères.

IV- Interactions hydrophobes : Les interactions hydrophobes ont été identifiées et quantifiées pour évaluer leur rôle dans la stabilisation des complexes.

2.2 Clonage du vecteur de la surexpression de la porine en tonneau bêta WzpB

En parallèle, un projet à notre laboratoire effectue l'expression WzaB (OPX). Alors, la concentration présente ici est sur la surexpression de WzpB (porine en tonneau bêta).

Le vecteur choisi est pET-20b(+) pour l'insertion du gène cloné est *mxan_1916*. Ce vecteur fait partie des vecteurs de surexpression compatibles avec des souches d'*E. coli* portant le système de T7 de la polymérase d'ARN, par exemple les souches BL21 (DE3), C41 (DE3) et C43 (DE3). Outre le promoteur et le terminateur de T7, ce vecteur contient le peptide signal pelB, qui dirige la protéine codée par le gène inséré vers la membrane externe, ainsi qu'un marqueur d'histidine (His-tag). Le système de sélection antibiotique est basé sur le gène de résistance à l'ampicilline (figure 2.1). Le vecteur comprend également un site de liaison de ribosome (RBS) et des sites du clonage multiples (MCS). Des modifications ont été effectuées sur ce vecteur, notamment l'insertion d'un site de protéase TEV après le marqueur d'histidine et l'allongement du marqueur d'histidine de 6 résidus à 8.

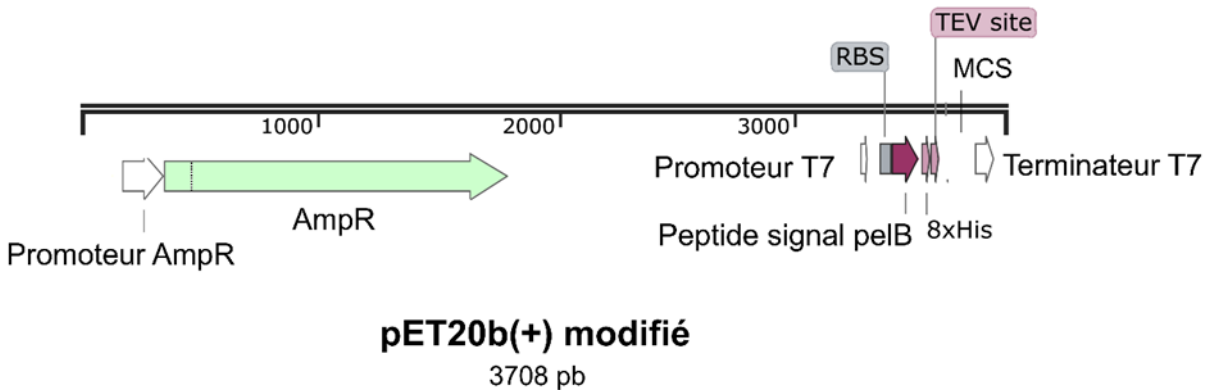


Figure 2.1 : Les caractéristiques du vecteur pET-20b(+). Le vecteur pET-20b(+) fait partie des vecteurs de surexpression utilisés dans des souches d'*E. coli* portant le système de T7 de polymérase d'ARN. Il contient un promoteur et un terminateur de T7, ainsi qu'une séquence du ciblage, le peptide signal pelB, dirigeant la protéine surexprimée vers la membrane externe, une caractéristique majeure de ce vecteur. Il comporte également un marqueur d'histidine et un système de sélection antibiotique par la résistance à l'ampicilline (voir Annexe B pour la séquence complète).

Le clonage a été effectué par la méthode RF (Restriction Free cloning). Cette méthode ne nécessite pas l'utilisation d'enzymes de restriction, elle repose sur l'insertion du gène ou de la séquence dans le vecteur cible lors d'un premier cycle de clonage et d'amplification par PCR (tableau 2.2 et tableau 2.3) de l'insert

à partir du génome de *M. xanthus*, en utilisant des amorces (tableau 2.1) contenant des séquences avant et inverse de l'insert, excluant le peptide signal du gène cible, et incluant des séquences correspondant à celles du MCS (sites du clonage multiple) du vecteur, l'insert cloné, lors du premier cycle, est alors appelé méga amorces. Cette étape est suivie d'une purification de produits de PCR (Kit Monarch Spin gDNA Extraction Kit (NEB #T3010S/L). Un deuxième cycle du clonage par PCR (tableau 2.4 et tableau 2.5) est réalisé en utilisant ces méga amorces avec le vecteur cible afin d'obtenir le vecteur portant l'insert. Le vecteur d'origine est ensuite digéré par l'enzyme Dpn I (concentration finale 1 U/μl) qui hydrolyse l'ADN méthylé (incubation du mélange du PCR de deuxième cycle après l'ajout de Dpn I à 37 °C pour 2 h, puis inactivation à 80 °C pendant 20 min, cela peut s'effectuer dans le thermocycleur). Ce traitement élimine le vecteur parental provenant de la préparation bactérienne, qui était utilisé comme un gabarit du deuxième cycle, à la suite de l'extraction du vecteur (Peleg et Unger, 2014; Siwek *et al.*, 2012), ne laissant que le vecteur recombiné avec l'insert, utilisé ensuite pour la transformation dans des souches de clonage d'*E. coli* (Dh5α).

Amorce	Séquence 5' → 3'
Avant	<u>CACCATGAAAACCTGTATTTTCAGGGA</u> -GGT- <u>CAGGGCATCGCGACG</u> Du plasmide pET20b(+)- Gly - du gène <i>mxan_1916</i>
Inverse	<u>CTTCCTTCGGGCTTTGTTAGCAGC</u> -TCAGTACGTCACGGAGAGGC Du plasmide pET20b(+)- du gène <i>mxan_1916</i>

Tableau 2.1 : Les amorces de RF (restriction free cloning) du clonage de l'insert *mxan_1916* à partir du génome ou l'ADN cible. Les amorces utilisées pour le premier cycle de clonage et de l'amplification. un codon d'un résidu glycine a été ajouté à N-terminal pour éviter l'entrave structurelle au site de protéase TEV.

Étape	Température	Durée
Dénaturation initiale	98 °C	30 s
Cycle (x35)		
- Dénaturation	98 °C	15 s
- Annelage	62 °C	30 s
- Élongation	72 °C	45 s
Élongation finale	72 °C	5 min
Arrêt	4 °C	Indéfini

Tableau 2.2 : La programmation du thermocycleur pour le premier cycle RF. La programmation comprend des étapes répétées de dénaturation, d'annelage et d'élongation. Étant donné que la polymérase utilisée est de haute-fidélité (Q5 DNA polymérase), les températures employées sont plus élevées.

Composant	Concentration finale	Volume total (50 µl)
Génome de <i>M. xanthus</i>	≈ 700 ng/µl	Variable (250 ng)
Amorce sens	10 µM	2,5 µl
Amorce antisens	10 µM	2,5 µl
dNTPs	10 mM	1 µl
Tampon de réaction Q5 (5X)	-	10 µl
Q5 High GC Enhancer (5X)	-	10 µl
Q5 high fidelity polymérase	0.02U/ µl	0.5 µl
Eau stérile	-	Jusqu'à 50 µl

Tableau 2.3 : Le mélange du PCR pour le premier cycle RF. Ce cycle d'amplification utilise le génome de *M. xanthus* comme un gabarit pour cloner le gène conformément au mode d'emploi polymérase Q5 à haute-fidélité.

Étape	Température	Durée
Dénaturation initiale	98 °C	30 s
Cycle (x15)		
- Dénaturation	98 °C	15 s
- Annelage	62 °C	30 s
- Élongation	72 °C	2 min 45 s
Élongation finale	72 °C	10 min
Arrêt	4 °C	Indéfini

Tableau 2.4: La programmation du thermocycleur pour le deuxième cycle RF. Le deuxième cycle utilise les méga amorces, contenant la séquence du gène insert (*Δmxan_1916*), avec le vecteur vide. La polymérase Q5 à haute-fidélité a été utilisée.

Composant	Concentration finale	Volume total (50 µl)
Méga amorces	44 ng/µl	15,4 µl
Plasmide pET-20b(+)	200 ng/µl	0,25 µl
dNTPs	10 mM	0,4 µl
Q5 high fidelity polymérase	0.02U/ µl	0.2 µl
Tampon de réaction Q5 (5X)	-	4 µl
Eau stérile	-	Jusqu'à 50 µl

Tableau 2.5 : Le mélange de PCR pour le deuxième cycle RF. Ce cycle vise l'insertion du gène *Δmxan_1916* (insert) dans le vecteur, avec l'utilisation de la polymérase Q5 à haute-fidélité. Ce mélange est ensuite soumis à une digestion de l'ADN parental d'origine bactérienne (vecteur gabarit), laissant intact le vecteur recombiné portant l'insert.

2.2.1 Vérification des produits de PCR

Les produits des réactions de PCR ont été vérifiés par l'électrophorèse sur gel d'agarose. Des gels ont été préparés en préalable en dissolvant l'agarose dans le tampon TAE (1×) et en chauffant jusqu'à l'ébullition pour obtenir des gels à une concentration finale de 0,8 %. Après refroidissement à 60 °C, le Red Gel Stain (SafeStain, TransGen Biotech, Chine) a été ajouté. Le gel a ensuite été coulé dans le bac avec le peigne. Après solidification, les produits de PCR ont été mélangés avec le colorant de chargement (Loading Dye) (6×) (New England Biolabs, NEB) et déposés dans les puits, aux côtés d'une échelle ADN (mélange du laboratoire). L'électrophorèse a été effectuée à 120 V pendant 45 – 60 min (par Bio-Rad PowerPac™, É.-U). La révélation des bandes d'ADN a été réalisée à l'aide du Molecular Imager Gel Doc™ XR+system (Bio-Rad, É.-U). La purification des produits de PCR à partir du gel d'agarose a été effectuée avec le kit EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit (BS354).

2.3 La transformation de souche d'*E. coli* pour multiplier le vecteur cloné exprimant de Wzpb

20 µl du mélange obtenu, à la suite du deuxième cycle RF et le traitement avec Dpn I, ont été transformés dans des cellules compétentes *E. coli* DH5α par le protocole de choc thermique : 50 µl de cellules compétentes (10^7 CFU/ml), incubées pendant 15 min sur glace, puis suivi avec l'ajout du mélange contenant le vecteur à transformer (le 20 µl), le retour sur glace 15 min, le choc thermique à 42 °C pendant 50 s, le retour de nouveau sur glace pendant 2 min, l'ajout de 250 µl de LB liquide (tryptone 1 %, NaCl 1 % et extrait de levure 0,5 %) et l'incubation à 37 °C pendant 1 h avec agitation de 250 rpm. L'ensemencement des volumes variés, à partir de ce dernier mélange/culture sur des boîtes de gélose LB contenant de l'antibiotique ampicilline (100 µg/ml), s'est effectué, suivi avec l'incubation à 37 °C jusqu'au lendemain. Des cultures, dans LB liquide supplémenté en antibiotique (ampicilline 100 µg/ml), ont été ensemencées à partir des colonies à 37 °C avec agitation 250 rpm jusqu'au lendemain, puis suivi par la purification du vecteur à l'aide du kit Monarch Spin Plasmid Miniprep Kit (T1110L).

Pour obtenir le vecteur en grande quantité, les cultures de ces colonies ont été démarrées dans 10 ml de LB supplémenté en ampicilline à 100 µg/ml et laissées croître jusqu'au lendemain. Le vecteur a puis été purifié avec le Miniprep Kit (Promega, É.-U) selon les instructions du fabricant. La quantité de vecteur a été déterminée avec le spectromètre NanoDrop™ 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) et entreposé à –20 °C. Le vecteur obtenu a été envoyé pour séquençage chez GÉNOME QUÉBEC (voir Annexe C).

2.4 Surexpression de la porine en tonneau bêta WzpB

La surexpression a été précédée de plusieurs étapes d'optimisation afin d'obtenir des quantités suffisantes pour les étapes ultérieures de cristallographie aux rayons X. L'optimisation a porté sur le choix des souches de surexpression, la concentration de l'agent d'induction (IPTG) et la température de croissance des cultures bactériennes. Une étape d'optimisation de détergent a été planifiée pour l'extraction de WzpB, mais a été laissée en vue des résultats obtenus aux étapes d'optimisation précédentes.

2.4.1 Les souches de surexpression

La souche BL21 (DE3) et ses dérivées (C41, C43, STAR, pLysE) (Annexe A) ont été sélectionnées pour leur capacité à exprimer des protéines membranaires, en particulier, celles potentiellement toxiques. Ces souches présentent les caractéristiques suivantes (Studier, 1991):

I- C41 (DE3) et C43 (DE3) : souches modifiées pour réduire la toxicité associée à l'expression de protéines membranaires.

II- STAR (DE3) : stabilise l'ARNm grâce à une mutation affectant l'ARNase.

III- pLysE (DE3) : contient un plasmide exprimant la lysozyme T7, inhibiteur de la polymérase T7 par liaison directe.

La transformation avec le vecteur a été réalisée en utilisant le même protocole (choc thermique) susmentionné pour transformer la souche du clonage DH5 α .

2.4.2 La concentration de l'agent d'induction et de la température de croissance de souches d'expression

Des précultures de chaque souche transformée (20 ml) ont étéensemencées à partir de colonies dans 10 ml LB liquide contenant de l'ampicilline (100 μ g/ml), puis incubées à 37 °C et avec agitation à 250 rpm jusqu'au lendemain. Le D.O.₆₀₀ a été ensuite mesurée. Des cultures bactériennes de 100 ml de LB liquide ont étéensemencées à partir des précultures pour obtenir une D.O.₆₀₀ = 0.01, et laissées croître à 37 °C avec agitation de 250 rpm jusqu'à la phase mid-log (D.O.₆₀₀ 0,6-0,8), puis transférées à la température testée pendant 30 min avant l'ajout de l'agent d'induction (IPTG). Après addition d'IPTG, les cultures ont été retournées et incubées à la température testée pendant 8 h avec agitation de 250 rpm. L'optimisation

de concentration de l'agent d'induction (IPTG) a été effectuée avec les concentrations suivantes (1 mM, 2 mM, 4 mM et 8 mM). Ces concentrations ont été testées en parallèle de l'optimisation de la température de croissance (25 °C, 30 °C et 37 °C), générant 12 conditions pour chaque souche utilisée.

Les premiers résultats ont permis d'identifier une plage de concentrations d'IPTG et une souche préférée, un second tour d'optimisation a alors été réalisé avec les concentrations suivantes (0,25 mM, 0,50 mM, 1,00 mM et 2,00 mM) et aux mêmes températures (25 °C, 30 °C et 37 °C).

2.4.3 L'analyse de résultats par l'électrophorèse de SDS-PAGE :

Afin d'évaluer les résultats d'optimisation et les taux de surexpression de WzpB, l'électrophorèse SDS-PAGE (sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) a été réalisée. Les cultures ont été récoltées par centrifugation à 6000 ×g pendant 30 min à 4 °C. Les culots ont été re-suspendus dans le tampon d'HEPES (HEPES 20 mM et NaCl 200 mM, pH 7,0) de manière à égaliser la concentration de cellules et à obtenir une D.O.₆₀₀ identique pour tous les échantillons. Ensuite, 50 µl de chaque échantillon ont été mélangés avec le tampon Laemmli (×4) et chauffés à 95 °C pendant 20-30 min.

Des gels de SDS-PAGE ont été préparés à l'avance, de concentration 5 % pour le gel d'empilement et 10 % pour le gel de séparation. Les gels ont été préparés avec : acrylamide/bis-acrylamide 30 %, tampon Tris-HCl (1 M et pH 6,8 pour l'empilement, 1,5 M et pH 8,8 pour la séparation), SDS 10 %, Persulfate d'ammonium (APS) 10%, TEMED (N,N,N',N'-Tétraméthyléthylènediamine) et eau distillée. Le gel de séparation a été coulé en premier et laissé polymériser pendant 45 min et puis le gel d'empilement a été coulé avec la mise en place du peigne et laissé polymériser. L'électrophorèse a été effectuée sur une cuve Bio-Rad à 80 V pour l'empilement, et 120 Volt pour la séparation. Des volumes de 20 µl ou 30 µl d'échantillons ont été déposés dans les puits. L'électrophorèse a été effectuée dans un bain de tampon de Tris-Glycine (Tris 25 mM, Glycine 192 mM et SDS 0,1 %, pH 8,0).

2.4.4 Immunobuvardage

Les protéines séparées par l'électrophorèse de SDS-PAGE ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (0,45 µm). Le gel de polyacrylamide était aligné avec la membrane nitrocellulose et le transfert a été réalisé à 130 V dans un tampon de transfert (Tris-Glycine à ×1 dans 800 ml de l'eau et 200 ml de méthanol, pH 8,0). Plusieurs étapes de lavage avec le tampon TBS (Tris base 20 mM et NaCl 150 mM, pH 7,6) et TBST (TBS ×1 et 0,1 % v/v tween-20). Une étape de saturation de membrane était effectuée

dans le tampon TBST contenant 5 % du lait écrémé pendant 1 h. Une incubation suivante a été réalisée avec l'anticorps primaire (Anti-His de souris, sigma) de concentration 1/1000 v/v dans TBST-5 % lait écrémé une nuit. Après deux lavages dans le tampon TBST-5 % lait écrémé, l'incubation avec l'anticorps secondaire (HRP-conjugated anti-mouse antibody) a été réalisée pendant 2 h. Enfin trois lavages avec le TBS puis TBST ont été effectués. L'imagerie a été réalisée avec un substrat chimio-luminescent (Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-Rad) sur le (Bio-Rad ChemiDoc™ MP Imaging System).

2.4.5 Le fractionnement des cultures et la détermination de la solubilité de WzpB

Les cultures bactériennes ont été récoltées par centrifugation à 6000 ×g pendant 30 min à 4 °C. Les culots ont été re-suspendus dans le tampon d'HEPES (HEPES 20 mM et NaCl 200 mM, pH 7,0) de manière à égaliser la concentration de cellules et obtenir une D.O.₆₀₀ identique pour tous les échantillons. De la lysozyme (160 µg/ml), de la DNase I (20 µg/ml), du MgCl₂ (1 mM) et du PMSF (1 mM) ont été ajoutés à l'avance au tampon HEPES. Une incubation sous rotation à 4 °C a pris place pendant 30 min, suivie d'une sonication pour obtenir le lysat total des cellules. La sonication a été effectuée sur glace en 3-4 cycles de 1 min (4 s on/ 1 s off) de 40 % de puissance (échantillon prélevé ici représente le lysat total). Une centrifugation à 20000 ×g pendant 30 min à 4 °C a ensuite permis de séparer la fraction soluble (surnageant) de celle insoluble (culot), des échantillons ont été prélevés à ce stade pour le surnageant (fraction soluble) et pour le culot (fraction insoluble, re-suspendu dans un volume correspondant de tampon HEPES). La fraction soluble a ensuite subi une ultracentrifugation à 100000 ×g pendant 75 min à 4 °C. Cette étape permet de séparer les membranes et les organelles cellulaires (en attirant les protéines intégrales et membranaires) et laisse les protéines solubles dans le surnageant. Des échantillons ont été collectés du surnageant (fraction de protéines solubles) et du culot (après re-suspension en HEPES, fraction de protéines membranaires). Toutes les fractions ont été examinées et analysées par l'électrophorèse SDS-PAGE et immunobuvardage.

Après le premier tour d'optimisation et au cours du deuxième tour, des concentrations modifiées d'IPTG ont été utilisées (0,25 mM, 0,5 mM, 1,00 mM et 2,00 mM), ainsi qu'une étape supplémentaire de centrifugation (à 4000 ×g pour 15 min) a été ajoutée pour éliminer les cellules intactes (non-lysées), cette étape a été introduite après la sonication et avant la centrifugation à 20000 ×g pour 30 min à 4 °C.

2.4.6 La purification et la cristallographie aux rayons X.

La protéine WzpB est couplée avec un marqueur d'histidine. Après la lyse cellulaire par sonication (dans le tampon 20 mM HEPES/ 200 mM NaCl pH 7,0 , inhibiteurs de protéases : 1 mM MgCl₂ et PMSF, et 160 µg/ml lysozyme et 20 µg/ml DNase I). La fraction soluble séparée par centrifugation est chargée sur une colonne d'affinité Ni-NTA. WzpB est à élucider par gradient d'imidazole (jusqu'à 250-300 mM), puis à désétiqueter par le traitement avec la protéase TEV, en éliminant le marqueur d'histidine. La pureté est vérifiée par l'électrophorèse SDS-PAGE et immunobuvardage. Des concentrations ~ 5-20 mg/ml est nécessaire pour la cristallographie. La cristallisation est effectuée par diffusion de vapeur (goutte pendante ou assise, 4–20 °C), en utilisant des écrans (sparse-matrix). Les cristaux obtenus sont cryo-protégés (solution réservoir 15–25 % glycérine ou éthylène-glycol) dans l'azote liquide. Les données de diffraction à 100 K sont puis à intégrer. La structure ensuite est résolue par remplacement moléculaire et le modèle de la structure est construit.

Remarque, dans cette étude, ces étapes n'ont pas été réalisées en raison de problèmes de surexpression; le texte décrit le flux de travail standard.

2.5 Les transformations et les tests phénotypiques chez *Myxococcus xanthus*

Les souches de type sauvage (WT) et de délétion pour les gènes *wzaB* et *wzpB* de *M. xanthus* ont été obtenues grâce au laboratoire du Prof. Salim Timo Islam. (Voir Annexe A pour la liste complète des souches utilisées).

Les vecteurs de complémentations (généralement des vecteurs pSWU19 ou ses dérivés) ont été obtenus grâce à l'étudiant doctorant Abdelkader Mellouk (Voir Annexe D pour les séquences de vecteurs). Les vecteurs contenant le gène *mxan_1915* ont été couplés avec un marqueur Flag x2 interne plus proche à C-terminal. Les vecteurs du gène *mxan_1916* ont été couplés avec un marqueur STREPII en C-terminal. Trois promoteurs ont également été insérés, à faible force d'expression pPilA, à moyenne force d'expression Mx0530 et à force élevée d'expression J23104, (tableau 2.6) contient leurs séquences. (Hu *et al.*, 2021).

Les vecteurs utilisés (pSWU19 et ses dérivés) contiennent un site de Mx8-attP qui dirige l'insertion du gène (inséré complètement ou partiellement ou portant de modifications dans le vecteur) au site spécifique d'attachement chromosomique (Mx8), aboutissant à la complémentation du gène délété (Wu et Kaiser,

1995). Ces vecteurs ont été multipliés par transformation dans *E. coli* DH5 α , en utilisant le même protocole mentionné en (2.6 La transformation de souche d'*E. coli*).

Promoteur	Séquence
PilA	GTTGGCATGCGTAGTGCTAATCCCATCCGCGGGCGCAG
Mx0530	TTGACACACTGGCATGTCGCCCCGTACCATTCACTTCAAGC
J23104	TTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATTGTGCTAGC

Tableau 2.6 : Les séquences de promoteurs de la transformation chez *M. xanthus*. Les trois promoteurs insérés pour une expression différenciée des gènes complémentés chez *M. xanthus*, faible pPilA, moyen Mx0530 et fort J23104.

2.5.1 Transformations de *M. xanthus* et l'intégration du vecteur dans le génome.

Des boîtes de Pétri de souches (à transformer) sontensemencées chaque semaine pour les manipulations prévues au cours de la semaine. Ces boîtes contiennent de la gélose CYE (casitone 1 % w/v, extrait de levure 0,5 % w/v, Sulfate de magnésium 0,1 % w/v, MOPS 0,01 M (pH 7,4) et gélose 1,5 %).

Des précultures liquides de CYE à 12,5 ml ont étéensemencées et incubées à 32 °C avec agitation à 220 rpm jusqu'au lendemain. La densité de cultures a été mesurée au spectrophotomètre à 600 nm. Des Cultures à 100 ml de CYE ont été préparées à partir de précultures de manière à obtenir, le lendemain, une D.O.₆₀₀ de 0,05-0,1 avec l'incubation à 32 °C et l'agitation à 220 rpm. Après la lecture de la D.O.₆₀₀, une centrifugation à 4500 xg pendant 15 min a été réalisée, suivie par trois lavages avec de l'eau milli Q stérile (premier lavage 100 ml, deuxième 25 ml, troisième 1 ml). La re-suspension finale a été effectuée dans 100 μ l de l'eau milli Q stérile. 50 μ l de cette suspension ont été mélangés avec 1-5 μ l de vecteur ($\approx$ 1 μ g de vecteur) et laissés reposer pour 5 min à température ambiante. Puis l'électroporation a été réalisée.

2.5.1.1 L'électroporation et la récupération de cellules transformées.

Le mélange de suspension de cellules et du vecteur a été transféré dans une cuvette d'électroporation de 0,2 cm et soumis à une impulsion de 0,9 kV, 25 μ F et 400 Ω (constante de temps est entre 0,7 -0,9) à l'aide du Bio-Rad Gene Pulser Xcell™ électroporation system (Bio-Rad, É.-U). Le mélange a ensuite été lavé avec 1 ml CYE liquide et transféré pour la récupération à 32 °C avec agitation à 220 rpm dans un tube Falcon 15 ml pendant 4-6 h. Après l'étape de récupération, 2 ml de CYE liquide contenant de la kanamycine ont été ajoutés pour atteindre une concentration finale à 100 μ g/ml de kanamycine, puis incubés jusqu'au lendemain pour couler le top agar.

2.5.1.2 Coulage de top agar (gélose) et l'intégration du vecteur dans le génome (chromosome) de *M. xanthus*

Le top agar a été préparé de la gélose CYE (à 0,7 %) et maintenu liquide à 55 °C. Des aliquotes du mélange transformé (25 µl, 100 µl et 400 µl) ont été préparées et mélangées avec 3 ml de top agar contenant kanamycine à 100 µg/ml, puis coulées sur des boîtes de CYE gélose (1,5%) déjà préparées et supplémentées avec kanamycine 100 µg/ml. Les boîtes ont alors été laissées solidifier en condition stérile, para-filmées, puis incubées à 32 °C. L'incubation dure environ 4-7 jours pour permettre l'apparition de colonies de ≈ 2 mm de diamètre.

2.5.1.3 Le criblage de colonies transformées de *M. xanthus* et l'extraction d'ADN génomique

Les colonies candidates présumées transformées sont puis patchées sur des boîtes de CYE gélose (1,5%) supplémentées en kanamycine 100 µg/ml afin de vérifier la transformation par PCR et de préparer de cryoconserves.

L'ADN génomique a été extrait avec le kit Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, É.-U) en suivant les instructions du fabricant. Les cryoconserves ont été préparées en ensemencant des cultures de CYE liquide avec kanamycine 100 µg/ml à partir de colonies patchées, puis incubées à 32 °C et 220 rpm jusqu'au lendemain, suivi par l'ajout de DMSO (35 µl pour chaque 1 ml de culture) et l'incubation pour favoriser la formation de myxospores jusqu'au lendemain. Après cela, une centrifugation à 4600 ×g pendant 15 min a été effectuée, les culots puis ont été re-suspendus dans TPM (10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM KH₂PO₄, 8 mM MgSO₄, pH 7,4), puis 250 µl DMSO a été ajoutés pour chaque 1 ml de re-suspension et finalement conserver à - 80 °C. La vérification de la transformation et de la complémentation a été réalisée en collaboration avec l'étudiant doctorant Abdelkader Mellouk.

2.5.2 Les tests phénotypiques de *M. xanthus*

Les tests phénotypiques ont été réalisés pour évaluer les motilités aventurière et sociale. Des cultures liquides CYE ont été incubées à 32 °C avec agitation à 220 rpm jusqu'au lendemain. Puis 10 ml de ces cultures ont été centrifugés à 4000 ×g pendant 10 min. Re-suspension dans 10 ml de TPM et lecture de D.O.₆₀₀. suivie d'une autre centrifugation à 4000 ×g pendant 10 min. Re-suspension dans TPM pour obtenir une D.O.₆₀₀ de 5.

2.5.2.1 Motilité sociale

Le médium de CYE gélose 0,5 % est coulé dans des boîtes carrées (10x10 cm) et laissé solidifier la veille du dépôt, suivi par l'application de 5 µl de re-suspension cellulaire à D.O.₆₀₀ de 5 le lendemain, suivi par incubation à 32 °C pendant 48-72 h. L'examen et l'imagerie des résultats ont été réalisés avec un stéréoscope Olympus SZX16 équipé d'une caméra UC90 4k, avec un objectif ×0,5 et un zoom ×0,8, en couleur linéaire. L'illumination était en champ noire (darkfield).

2.5.2.2 Motilité aventurière

Le milieu de CYE gélose 1,5 % est coulé dans des boîtes carrées (10x10 cm) et laissé solidifier la veille du dépôt, suivi par l'application de 5 µl de re-suspension cellulaire à D.O.₆₀₀ de 5 le lendemain. En suite par incubation à 32 °C pendant 18-24 h. L'examen et l'imagerie des résultats se sont réalisés avec un stéréoscope Olympus SZX16 équipé d'une caméra UC90 4k, un objectif ×2 et un zoom ×8, avec une couleur linéaire. L'illumination était à mi-ouverture entre l'ouverture complète et le champ clair (brightfield).

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

Dans ce chapitre, les résultats obtenus par les méthodes virtuelles de la structure de WzpB (porine en tonneau bêta) et de WzaB (OPX) et leurs complexes, ainsi que les données de leur stabilité sont présentés. Les résultats de la surexpression de WzpB et l'optimisation de ce processus, ainsi les résultats de tests phénotypiques des souches de délétions de WzpB ou WzaB sont présentés. Les tests phénotypiques sont pour la motilité sociale et aventurière.

3.1 La structure virtuelle de WzaB et WzpB et leurs complexes

Les structures disponibles de WzaB, WzpB et WzcB sur le site web Uniprot sont prédites par AlphaFold 2, une vérification de ces modèles a été réalisée en obtenant les structures par AlphaFold 3. Toutes les structures obtenues présentent un score de confiance (pLDDT) supérieure à 90 % (figure 1.10).

L'ajout des atomes d'hydrogène et l'attribution des charges ont permis une meilleure caractérisation des résidus polaires et de la charge nette, afin d'optimiser la structure et les interactions de chaque protéine.

3.1.1 Structure, charges et distribution de résidus polaires de WzaB (OPX)

L'attribution de charges à la structure a révélé que WzaB possède une charge nette positive (figure 3.1), cohérente avec une interaction avec le BPS, chargé négativement (Islam *et al.*, 2020). Cependant, certains résidus polaires positifs sont enfouis et non exposés à la surface, ce qui peut suggérer un changement conformationnel potentiel pour le relargage du polysaccharide. Cela est étayé par des études antérieures sur des protéines OPX similaires, qui mettent en évidence des réarrangements conformationnels lors du transport des polysaccharides (Dong *et al.*, 2006).

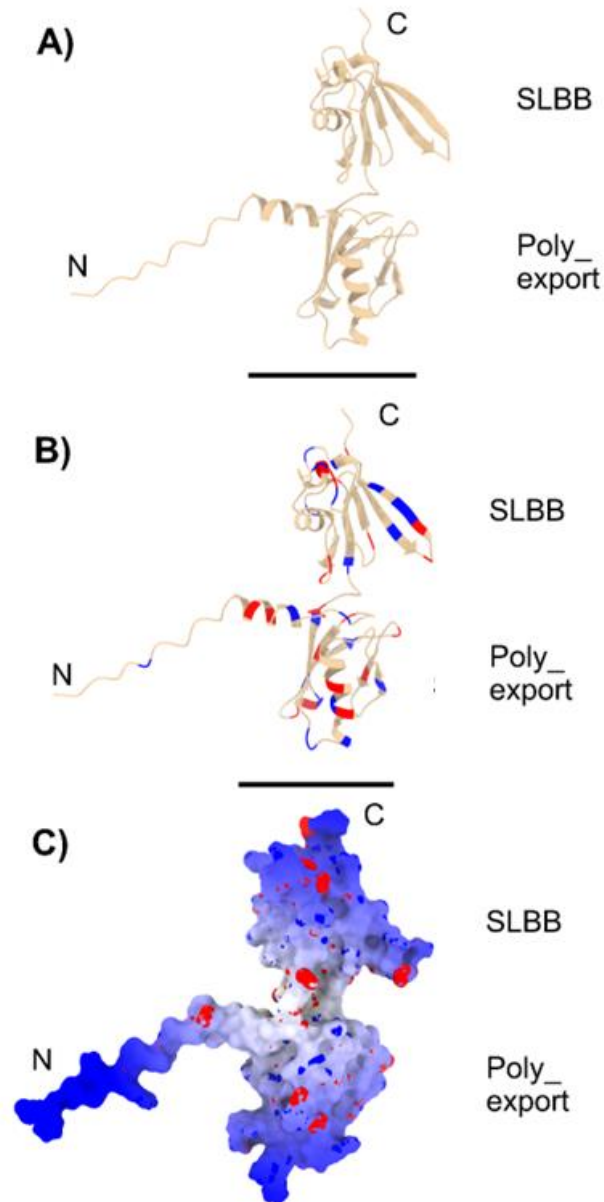


Figure 3.1 : Structure, résidus polaires et charge nette de WzaB (OPX). A) Structure globale prédite de WzaB avec ses deux domaines, poly_export et SLBB. B) Résidus polaires dans la structure WzaB, les uns positifs colorés en bleu et les négatifs en rouge. C) Charge nette globale de WzaB, une charge positive (en bleu) domine la protéine, malgré la présence de résidus négatifs enfouis vers le lumen, la charge reste positive (les résidus polaires affichés dans l'image avec la coloration de charge, qui a été effectuée avec le seuil de charges négatives $\leq -10\text{kT/e}$ (rouge), le seuil de charges positives $\geq +40\text{ kT/e}$ (bleue) et zones proches de la neutralité (blanche) autour de $+5\text{ kT/e}$). Cela est cohérent avec la charge d'interaction avec le BPS. Visualisation réalisée avec ChimeraX (Meng *et al.*, 2023).

3.1.2 Structure, charges et distribution de résidus polaires de WzpB (porine en tonneau bêta)

L'analyse électrostatique de charge a montré que les résidus positifs sont principalement localisés au niveau de l'ouverture périplasmique vers les bords latéraux, tandis que les résidus négatifs sont concentrés dans l'ouverture côté espace externe (figure 3.2). Cette distribution est cohérente avec un mécanisme de transport directionnel, dans lequel les charges positives interagissent avec les polysaccharides chargés négativement pour guider leur passage vers l'extérieur. Les modèles de structures obtenus de WzaB (OPX) et WzpB (porine), conjointement avec leur distribution de charges, invitent à reconsidérer le mécanisme de la sécrétion finale de BPS.

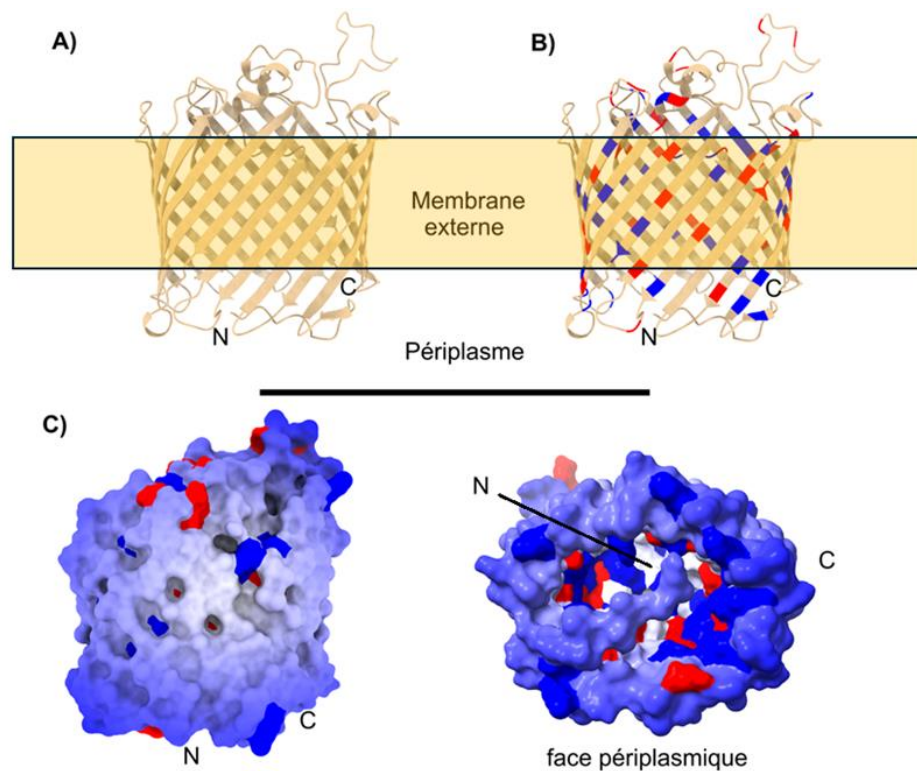


Figure 3.2 : Structure, résidus polaires et charge nette de WzpB (porine). A) Structure globale prédite de WzpB, avec les deux extrémités N- et C-terminales orientées vers l'espace périplasmique. B) Résidus polaires dans la structure WzpB. Les résidus polaires positifs sont colorés en bleu et les négatifs en rouge. C) Charge nette globale de WzpB. Une charge positive (en bleu) domine également cette protéine. La densité de charge diminue dans la portion intégrale dans la membrane externe, ce qui est compatible avec des propriétés hydrophobes nécessaires à une intégration stable. Cependant, la charge positive est concentrée aux extrémités (les ouvertures périplasmique et externe) de la protéine (les résidus polaires gardés dans l'image avec la coloration de charge, qui a été réalisée avec le seuil de charges négatives $\leq -15 \text{ kT/e}$ (rouge), le seuil de charges positives $\geq +44 \text{ kT/e}$ (bleue) et zones proches de la neutralité (blanche) autour de $+10 \text{ kT/e}$). Cela est cohérent avec une interaction avec le BPS. La protéine à droite présente une vue côté périplasmique de la protéine. Visualisation réalisée avec ChimeraX (Meng *et al.*, 2023).

3.1.3 Structure, charges et distribution de résidus polaires de WzcB (PCP)

Afin d'élucider les effets des interactions des autres protéines impliquées dans la voie Wzx/Wzy-dépendante pour le BPS, la structure de WzcB a également été prédite avec AlphaFold 3. WzcB comprend un domaine périplasmique contenant une boucle avec deux hélices transmembranaires, deux autres interactifs impliqués dans la formation du complexe de sécrétion et un domaine cytoplasmique, qui comporte des sites de phosphorylation participant à la régulation de l'activité de la protéine (figure 3.3). Cette protéine est classifiée dans la classe 2a des Wzc, en raison de la présence d'un domaine cytoplasmique C-terminal et de son activité de tyrosine autokinase du domaine BYK (Drummelsmith et Whitfield, 1999).

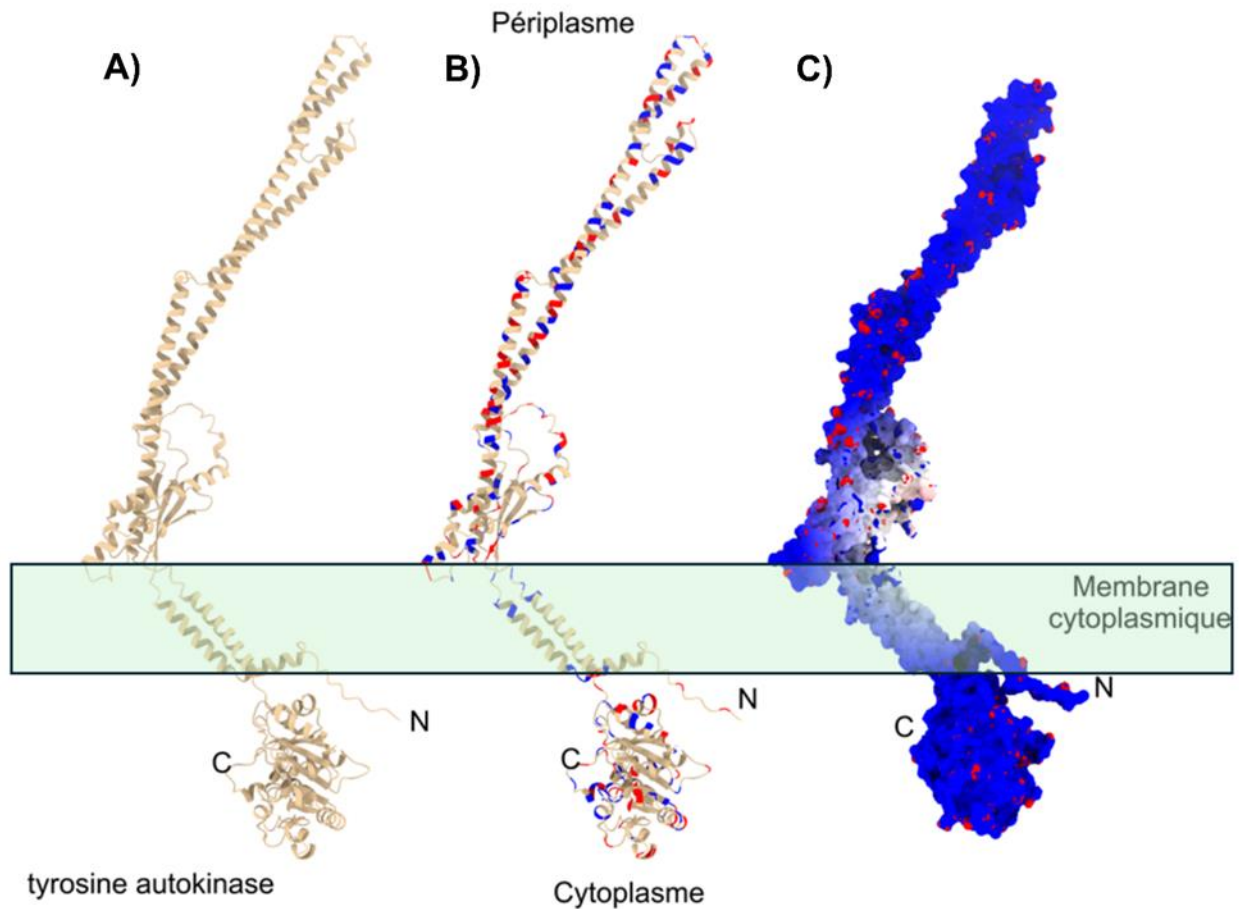


Figure 3.3 : Structure, résidus polaires et charge nette de WzcB (PCP). A) Structure globale prédite de WzcB montrant le domaine cytoplasmique contenant la tyrosine autokinase et le domaine périplasmique incluant la portion intégrale dans la membrane cytoplasmique. B) Résidus polaires dans la structure WzcB. Les résidus polaires positifs sont colorés en bleu et les négatifs en rouge. C) Charge nette globale de WzcB, une charge positive (en bleu) domine la protéine, plus concentrée aux extrémités, avec une quasi-

neutralité au niveau de la région intégrale dans la membrane (les résidus polaires gardés dans l'image et la coloration de charge, qui a été effectuée avec le seuil de charges négatives $\leq -5\text{kT/e}$ (rouge), le seuil de charges positives $\geq +50\text{ kT/e}$ (bleue) et zones proches de la neutralité (blanche) autour de $+10\text{ kT/e}$). Cela est cohérent avec l'interaction avec le BPS. Visualisation réalisée avec ChimeraX (Meng et al., 2023).

3.2 La formation de complexes protéiques de WzpB et WzaB

Selon les mécanismes de sécrétion des polysaccharides, les OPX forment un octamère constituant un canal à travers du périplasme et de la membrane externe (via des hélices alpha intégrales dans la membrane) qui facilite la sécrétion (Dong *et al.*, 2006).

Afin d'examiner la possibilité de former ce type de complexe sécrétoire (sans la partie intégrale dans la membrane externe), des complexes avec un nombre croissant de protomères de WzaB (OPX) ont été générés. Leur stabilité et leur force d'interaction ont été mesurées. En parallèle, des complexes de WzaB et WzpB ont été également générés et leur stabilité et leur force d'interaction ont été mesurées pour comparer les deux complexes, l'un des WzaB seuls à l'autre, incluant WzpB. La modélisation a été réalisée avec AlphaFold Multimer 3 (Abramson *et al.*, 2024). Des contraintes structurelles ont limité le nombre de WzpB (tonneau bêta) à un seul protomère.

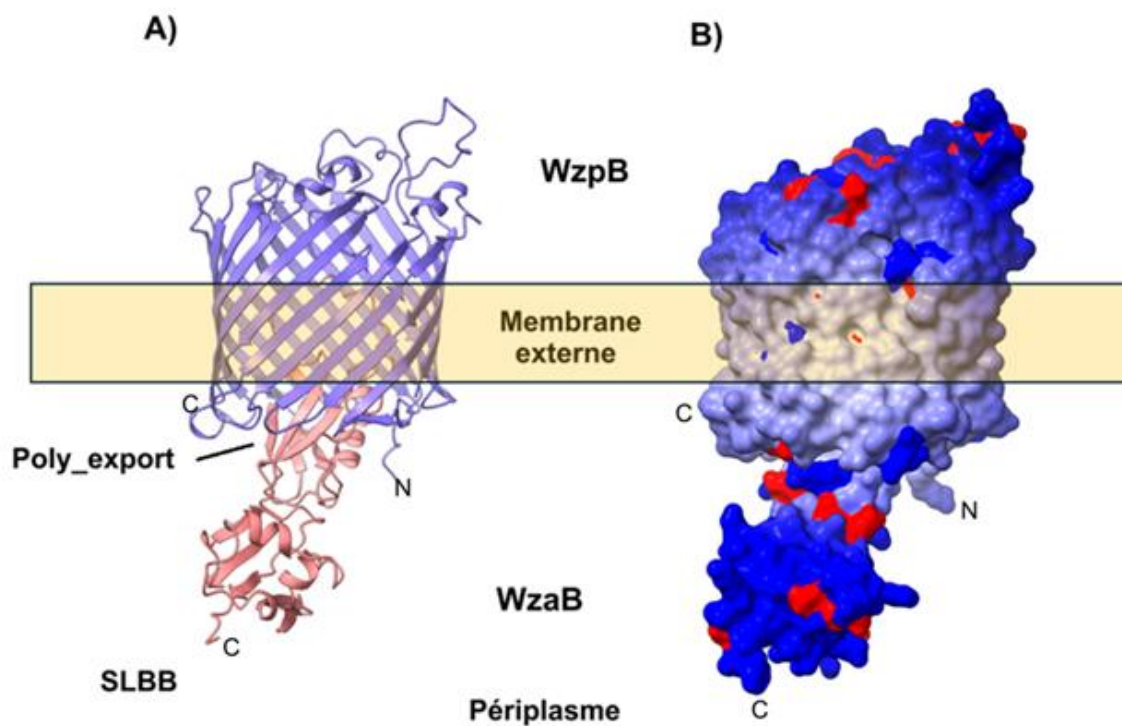
Les résultats de simulation ont révélé des conformations distinctes en fonction du nombre de protomères de WzaB présents dans le complexe. Ces conformations suggèrent un mécanisme dynamique dans lequel les interactions entre WzaB et WzpB évoluent pour permettre le transport des polysaccharides à travers de la membrane externe, qui, en accord partiel avec des mécanismes classiques impliquant la formation de structure octamérique (ou heptamérique ou nonamérique) de WzaB. Ces complexes de WzaB pourraient également interagir avec des complexes octamériques de WzcB (PCP) pour former un canal assurant la sécrétion du polysaccharide (Dong *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2021).

3.2.1 Les complexes d'un nombre croissant de WzaB

La formation des complexes comprenant un nombre croissant de WzaB (OPX) vise à décrire un mécanisme d'interaction et de formation des complexes. Les complexes obtenus incluent des protomères WzaB seuls (homopolymères), et avec un protomère WzpB (porine en tonneau bêta) (hétéropolymères), ainsi que des complexes de WzaB ont été formés en présence de WzcB (PCP). En raison des contraintes structurelles, le nombre de protomères WzaB interagissant avec la PCP a été limité à 3. Les figures 3.4-12 présentent les structures de complexes de WzaB seuls et avec WzpB générés.

3.2.1.1 Complexe d'un protomère de WzaB et un de WzpB

Les simulations ont montré que le protomère de WzaB (OPX) se lie principalement à l'ouverture périplasmique de WzpB (porine), ce qui maintient la porine fermée (figure 3.4). Le domaine poly_export, avec la queue de N-terminal, pénètre dans le lumen de WzpB, provoquant ainsi un blocage de la porine. Cette fermeture rappelle de celle observée pour les dimères de KpsD (OPX des transporteurs ABC), où les interactions stabilisent une conformation inactive (Cuthbertson *et al.*, 2009). La charge positive de deux protéines présente un léger décalage vers les extrémités des protéines, c'est-à-dire vers le milieu périplasmique et l'espace externe.



3.2.1.2 Complexe des deux protomères WzaB seuls et avec un WzpB

La fermeture de la porine WzpB persiste en présence de deux protomères WzaB (OPX). Toutefois, un protomère WzaB interagit directement avec WzpB, tandis que le second reste éloigné de la porine et au contact du premier WzaB (figure 3.5). La charge nette totale est positive et décalée vers les extrémités. Malgré l'interaction entre les deux protomères WzaB dans le complexe formé exclusivement de WzaB, la formation et l'assemblage de ce complexe demeure hétérogène, où le domaine poly_export interagit avec le SLBB de son homologue.

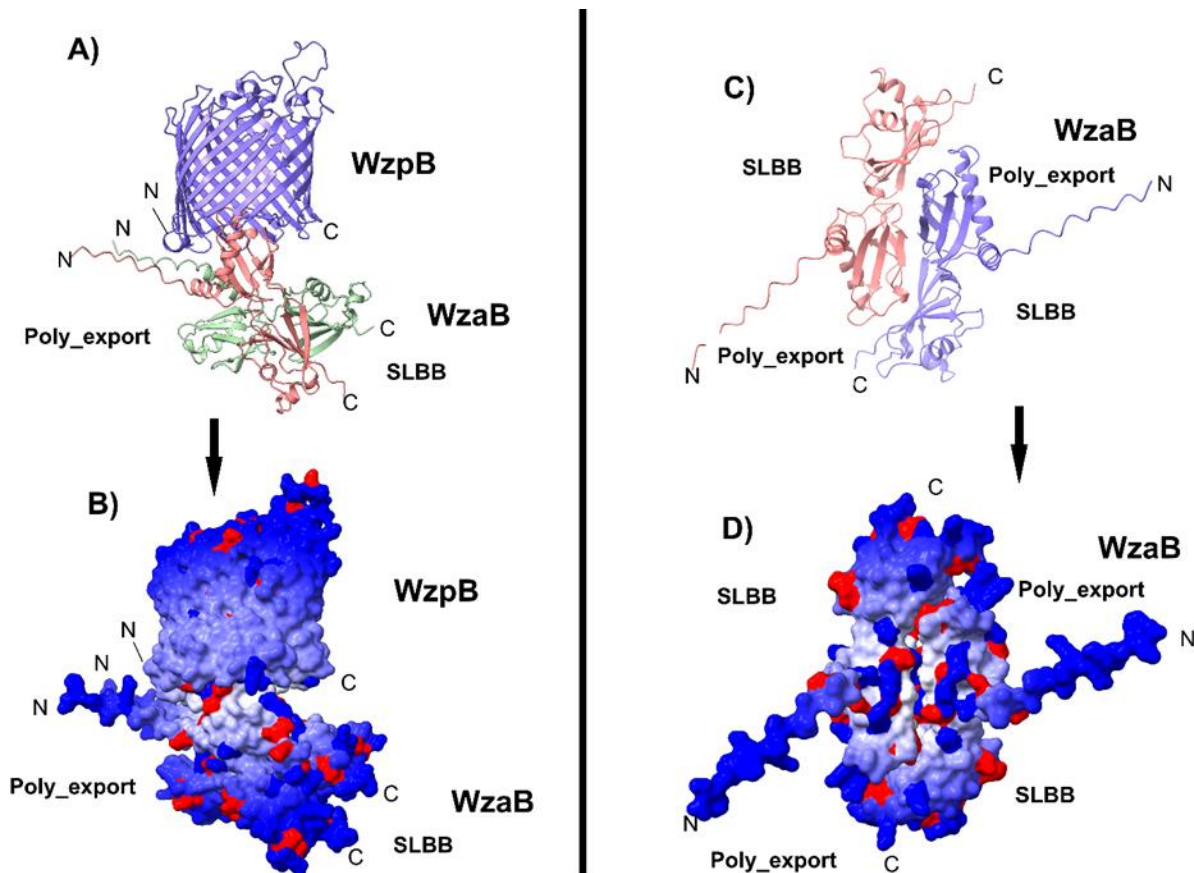


Figure 3.5 : Structure du complexe formé de deux protomères WzaB (OPX) seuls et avec un WzpB (porine). L'interaction entre de WzaB et de WzpB montre la persistance de la fermeture du lumen de WzpB, le canal présumé final d'export du BPS. A) Structure globale du complexe WzaB-WzpB obtenue par AlphaFold Multimer 3 (Abramson et al., 2024). B) Les charges nettes de protomères WzaB et WzpB conservées positives (en bleu), mais avec un léger décalage vers les extrémités, augmentant la neutralité du cœur du complexe. C) Structure globale du complexe composé de deux WzaB obtenue par AlphaFold Multimer 3 (Abramson et al., 2024). D) Charges nettes de deux protomères WzaB, elles demeurent positives, l'interaction est centrée vers les cœurs des deux protomères, tandis que les WzaB présentent une région centrale plus neutre. Visualisation réalisée avec ChimeraX (Meng et al., 2023).

3.2.1.3 Complexe des trois, quatre et cinq protomères de WzaB seuls et avec un de WzpB

I- Complexe de trois WzaB (OPX) seuls et avec WzpB (porine) : À partir de complexe formé de trois protomères WzaB et d'un WzpB, l'arrangement de WzaB adopte la forme de canal partiel (figure 3.6). Dans cette configuration incluant WzpB et trois protomères WzaB présentent la bonne orientation de ces trois derniers (Dong *et al.*, 2006), le domaine de SLBB est tourné vers la membrane externe/vers la porine, et le poly_export est orienté vers le PCP. La formation de ce pré-canal suggère un rôle important structurant de WzpB (porine) dans ce complexe. En revanche, le complexe formé de trois WzaB seuls (homopolymères) a tendance à s'agglomérer sans avoir une structure manifestement fonctionnelle.

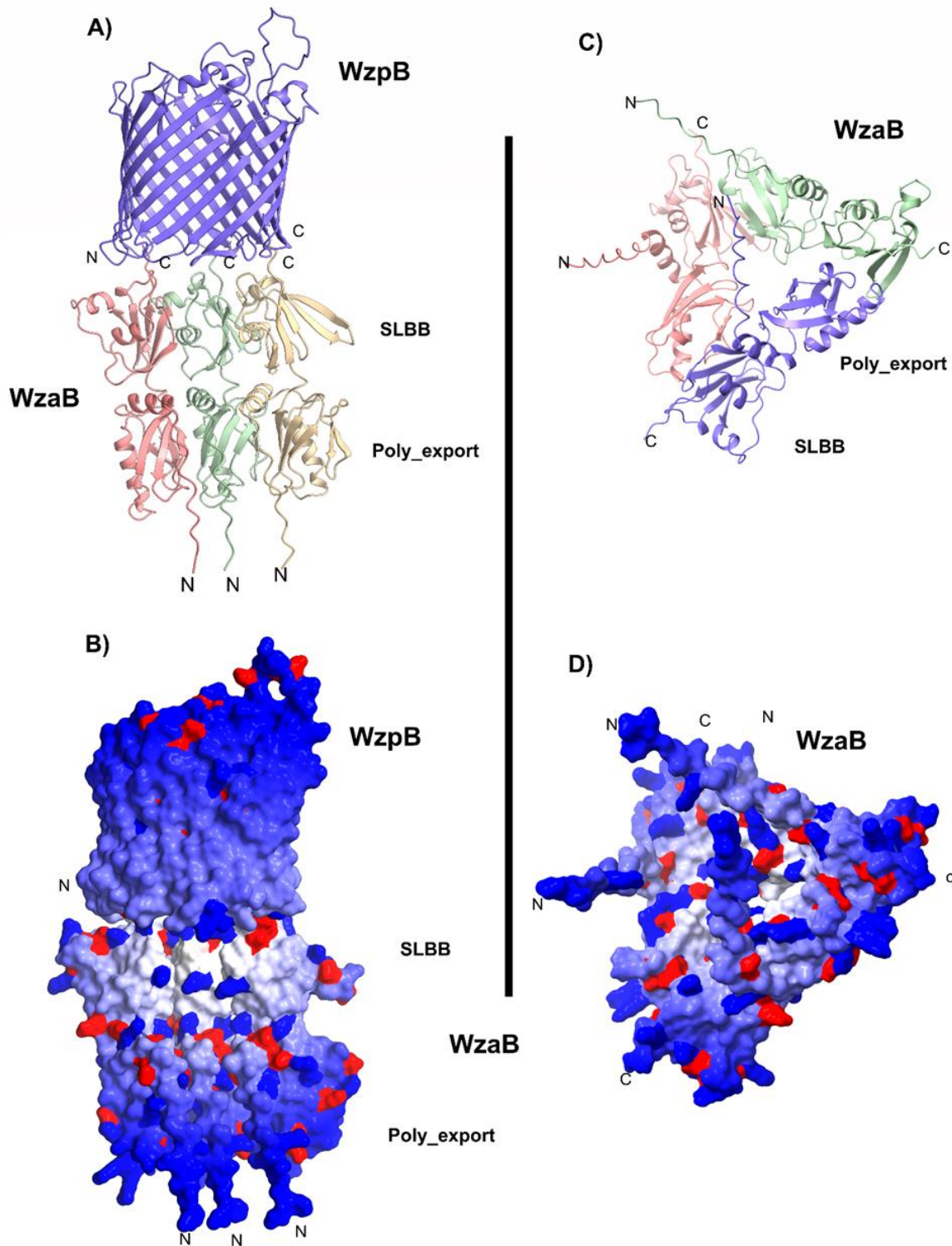


Figure 3.6 : Structure du complexe formé de trois protomères WzaB (OPX) seuls et avec un WzpB (porine). L'interaction entre de WzaB et de WzpB ici prend la forme de canal partiel, l'orientation de WzaB (OPX) est alignée pour que le SLBB soit en interaction avec WzpB et le poly_export soit dirigé vers le périplasme. A) Structure globale du complexe WzaB-WzpB obtenue par AlphaFold Multimer 3 (Abramson et al., 2024).

B) Les charges nettes de protomères WzaB et WzpB conservées positives (en bleu), mais aussi avec un déplacement marqué vers les extrémités, ce qui accroît de plus la neutralité du cœur du complexe. C) Structure globale du complexe de trois WzaB obtenue par AlphaFold Multimer 3 (Abramson et al., 2024). Le complexe présente une organisation d'agglomérat, avec des cœurs neutres D) Charges nettes de trois protomères WzaB reste globalement positives. L'interaction est centrée sur les régions centrales des trois protomères, tandis que la zone la plus neutre de WzaB demeure au niveau du cœur. Visualisation réalisée avec ChimeraX (Meng et al., 2023).

II- Complexe de quatre WzaB (OPX) seuls et avec WzpB (porine): La formation du canal se poursuit dans le complexe composé de quatre protomères WzaB et d'un WzpB (figure 3.7) et l'orientation des WzaB reste dans le bon sens (Dong *et al.*, 2006), le domaine de SLBB est tourné vers la membrane externe/vers la porine, et le poly_export vers le PCP. En revanche, le complexe formé de quatre WzaB seuls a également tendance à former un agglomérat sans avoir de structure manifestement fonctionnelle, en maintenant au contact leurs régions centrales neutres (cœurs).

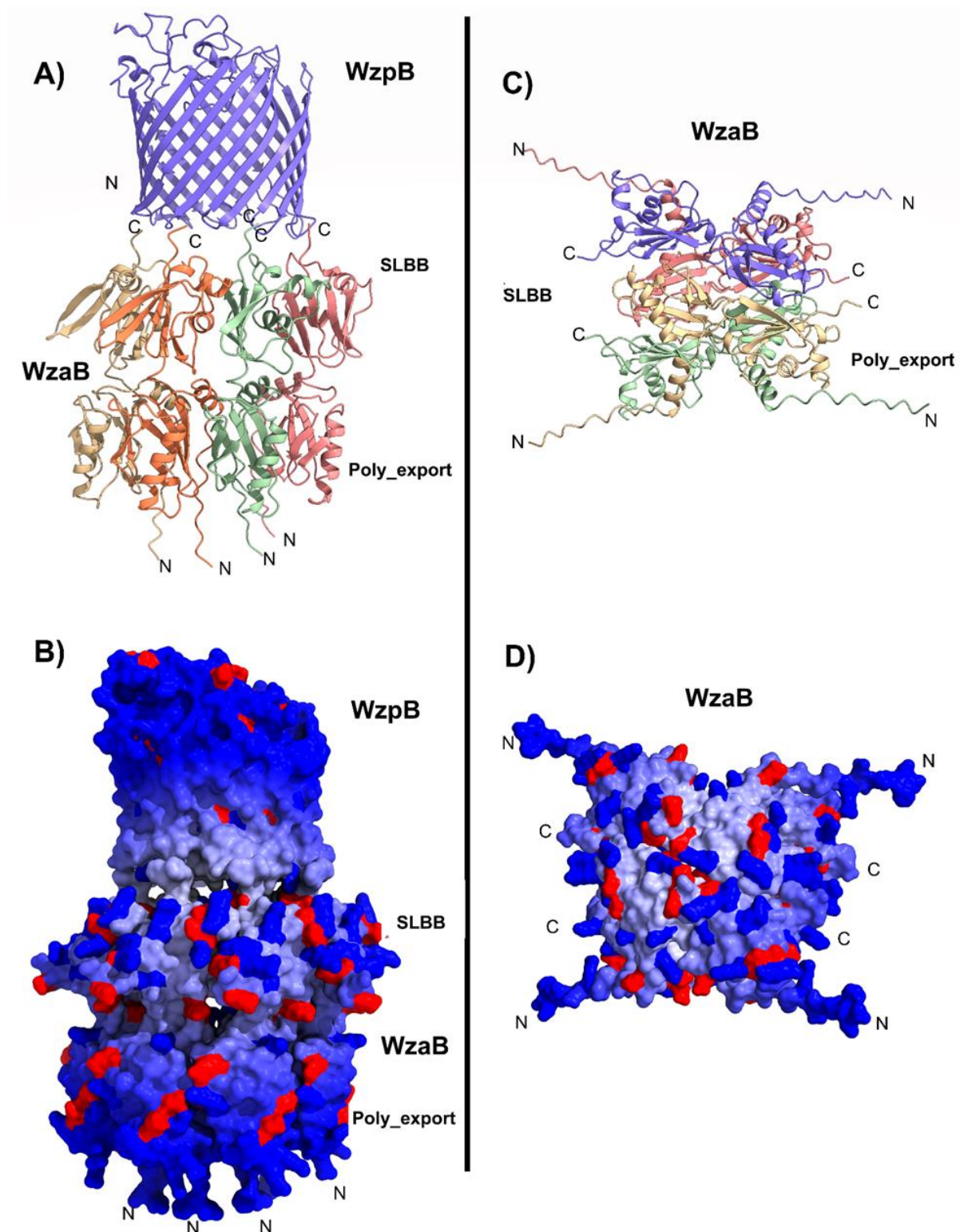


Figure 3.7 : Structure du complexe formé de quatre protomères WzaB (OPX) seuls et avec un WzpB (porine). La formation entre de WzaB et de WzpB continue à former un canal, l'orientation de WzaB (OPX) est alignée avec l'une canonique des WzaB. A) Structure globale du complexe WzaB-WzpB obtenue par

AlphaFold Multimer 3 (Abramson et al., 2024). B) Charges nettes de protomères WzaB et WzpB conservées positives (en bleu), avec la constitution d'un cœur plus neutre au sein du complexe, ce cœur neutre pourrait causer des effets de rapprochement et d'attraction entre les WzaB, parce que le complexe de WzaB seuls a tendance également à présenter cette neutralité au contact. C) Structure globale du complexe de quatre WzaB seuls obtenue par AlphaFold Multimer 3 (Abramson et al., 2024), le complexe présente un agglomérat maintenant au contact les cœurs neutres D) Charges nettes de quatre protomères WzaB restent positives. L'interaction est dirigée vers la formation d'un cœur neutre aussi, les WzaB présentent la région la plus neutre au centre. Visualisation réalisée avec (Meng et al., 2023).

III- Complexe de cinq WzaB (OPX) seuls et avec WzpB (porine) : La formation du canal aussi se poursuit dans ce complexe (figure 3.8). L'orientation des WzaB reste conforme aux observations précédentes (Dong *et al.*, 2006), le domaine de SLBB est tourné vers la membrane externe/vers la porine, et le poly_export est orienté vers le PCP. En revanche, le complexe formé de cinq WzaB seuls présente une tendance à l'agglomération, maintenant au contact leurs cœurs neutres.

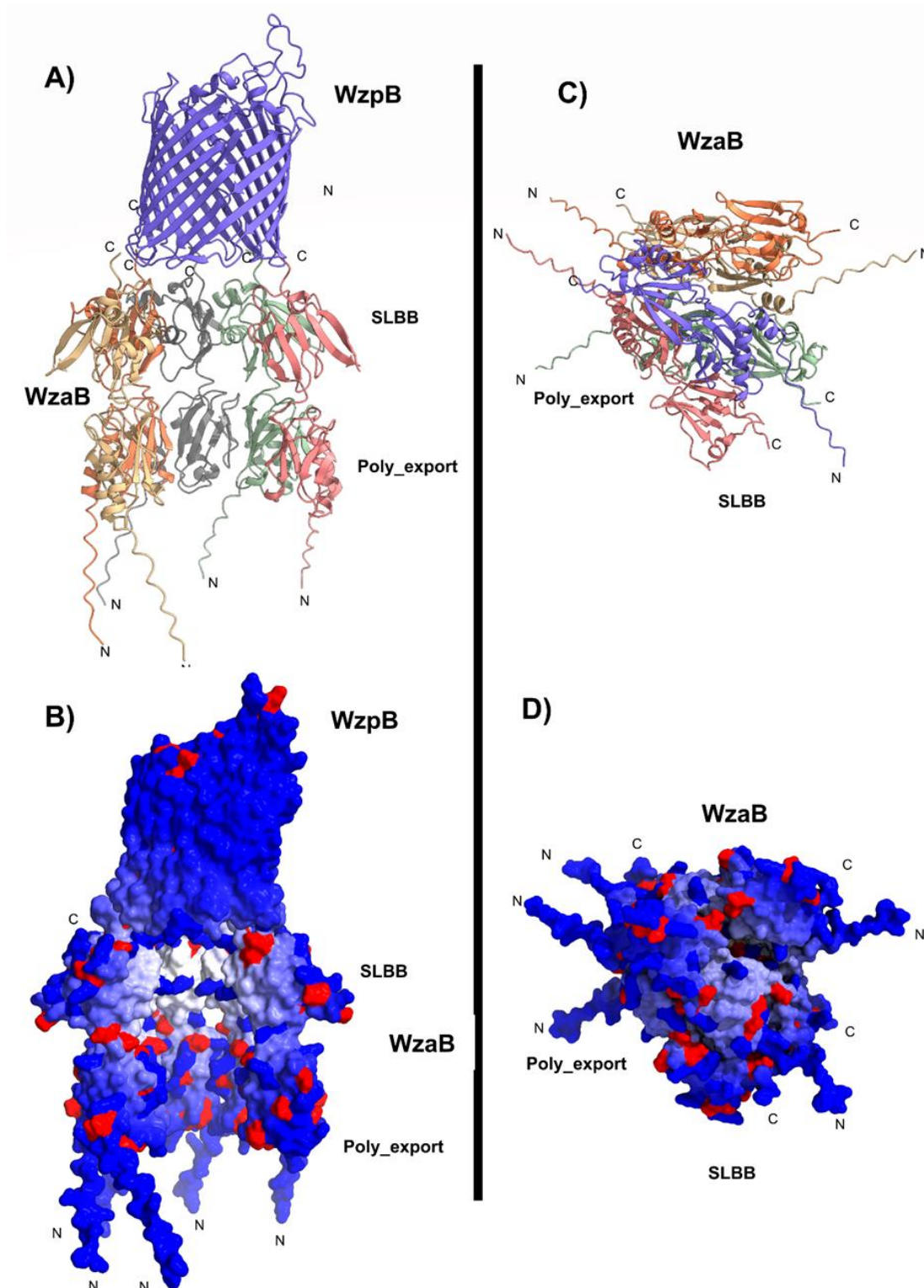


Figure 3.8 : Structure du complexe formé de cinq protomères WzaB (OPX) seuls et avec un WzpB (porine). Le complexe de WzaB et de WzpB continue à former un canal partiel, l'orientation des WzaB (OPX) est cohérente avec l'une canonique de Wza. A) Structure globale du complexe WzaB-WzpB obtenue avec

AlphaFold Multimer 3 (Abramson et al., 2024). B) Charges nettes de protomères WzaB et WzpB sont conservées positives (en bleu), avec la formation d'un cœur neutre au sein du complexe et intensification des charges positives distales C) Structure globale du complexe de cinq WzaB seuls obtenue avec AlphaFold Multimer 3 (Abramson et al., 2024), le complexe forme un agglomérat, maintenant au contact les cœurs neutres D) Charges nettes de cinq protomères WzaB demeure globalement positives. L'interaction est orientée vers la constitution d'un cœur neutre. Visualisation réalisée avec ChimeraX (Meng et al., 2023).

En conclusion, les complexes formés précédemment :

Avec un nombre croissant de protomères de WzaB (OPX), les simulations indiquent une ouverture progressive de l'extrémité périplasmique de WzpB (porine), qui est fermé avec un et deux protomères WzaB. Les protomères de WzaB interagissent avec les résidus situés aux bords de l'ouverture périplasmique de WzpB, tandis que leurs queues lipidiques restent orientées vers le périplasma dans les complexes formés de 3, 4 et 5 protomères WzaB avec un WzpB. Cette configuration pourrait représenter une étape intermédiaire dans le processus de formation du canal et de transport des polysaccharides.

La formation d'un cœur neutre dans tous les complexes pourrait refléter une zone électrostatique à force propulsant du polysaccharide BPS (chargé négativement) au cours du complexe lors de la sécrétion, tandis que l'intensification des charges positives aux extrémités distales du cœur du complexe, observée lors de la formation des complexes d'un nombre croissant de WzaB avec d'un WzpB suggère également une force d'attraction sur le polysaccharide BPS (chargé négativement) vers l'axe du canal.

3.2.1.4 Complexes de six, sept et huit protomères de WzaB seuls et avec un de WzpB

I- Complexe de six WzaB (OPX) seuls et avec WzpB (porine) : Dans le complexe formé de six protomères WzaB et d'un WzpB, le canal formé devient complet, tandis que le complexe de WzaB seuls forme un canal partiel (figure 3.9). Cette forme, incluant WzpB et six protomères WzaB respecte l'orientation canonique décrite pour Wza (Dong *et al.*, 2006), le domaine SLBB est tourné vers la membrane externe/vers la porine et le poly_export vers le PCP. La neutralité du cœur devient manifeste et évidente et tous les domaines SLBB deviennent quasi neutres, WzpB montre également un décalage de la charge positive vers l'extrémité externe distale. L'orientation des queues N-terminales demeure vers le périplasma, ce qui pourrait suggérer une entrave partielle au passage du BPS.

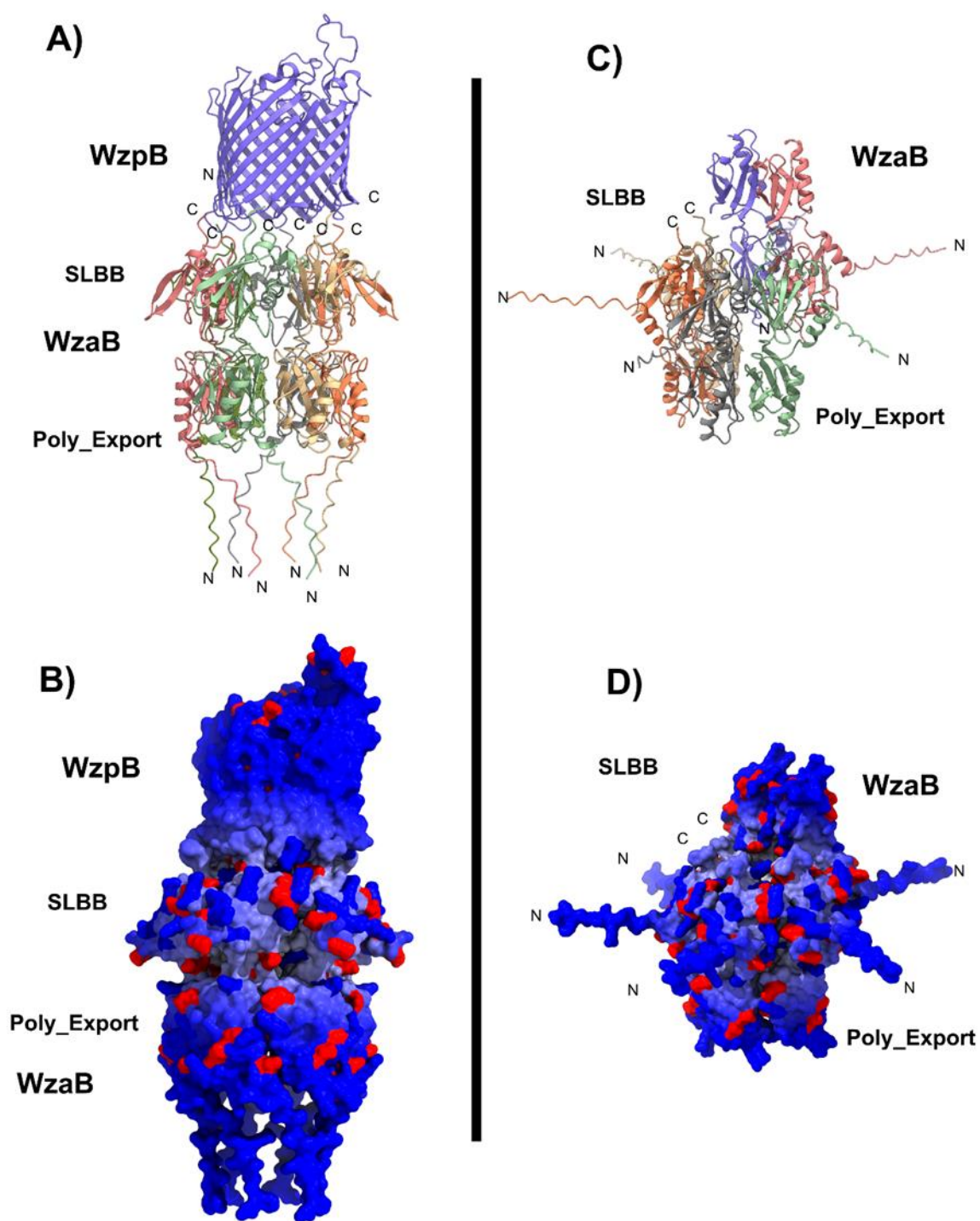


Figure 3.9 : Structure du complexe formé de six protomères WzaB (OPX) seuls et avec un WzpB (porine). La formation entre de WzaB et de WzpB forme un canal complet, l'orientation de WzaB (OPX) est conforme au modèle canonique décrit pour Wza, l'orientation des queues N-terminales est vers le périplasme

A) Structure globale du complexe WzaB-WzpB obtenue par AlphaFold Multimer 3 (Abramson et al., 2024). B) Charges nettes de protomères WzaB et WzpB conservées positives (en bleu), avec la formation d'un fort cœur neutre au sein du complexe et avec l'intensification des charges distalement, reflétant une polarisation marquée. C) Structure globale du complexe de six WzaB seuls obtenue par AlphaFold Multimer 3 (Abramson et al., 2024), le complexe forme un canal partiel, composé de quatre protomères alignés d'un côté et deux alignés en sens inverse D) Charges nettes de six protomères WzaB demeure globalement positives. L'interaction favorise l'alignement des protomères sans constitution d'un cœur intensivement neutre, la région intermédiaire de chaque protomère montre une neutralité faible. Visualisation réalisée avec ChimeraX (Meng et al., 2023).

II- Complexe de sept WzaB (OPX) seuls et avec WzpB (porine) : Dans le complexe formé de sept protomères WzaB et d'un WzpB, un canal canonique est établi, le complexe de WzaB seuls forme également un canal complet (figure 3.10). Le complexe de WzpB et de sept protomères WzaB respecte l'orientation canonique de Wza (Dong *et al.*, 2006), le domaine SLBB fait face à la membrane externe/à la porine et le poly_export est orienté vers le PCP. L'orientation des queues N-terminales devient vers la membrane externe par rapport du positionnement de WzpB, cela pourrait suggérer un ancrage dans cette membrane, libérant ainsi le passage du BPS. La charge neutre du cœur persiste, tandis que WzpB montre un décalage de charge positive vers l'extrémité externe distale. Le complexe WzaB seuls reproduit un canal quasi identique à celui formé en présence de WzpB.

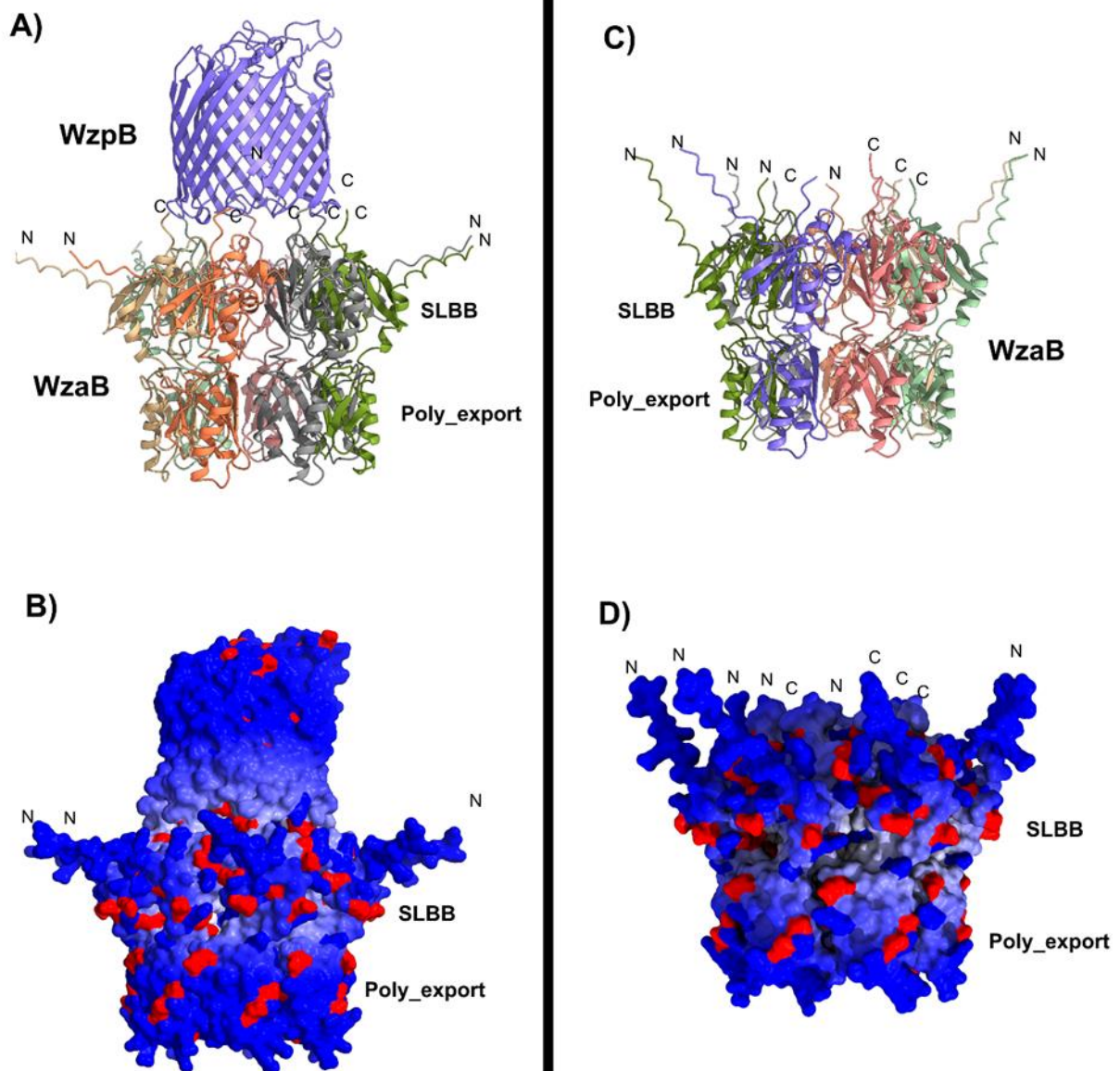


Figure 3.10 : Structure du complexe de sept protomères WzaB (OPX) seuls et avec un WzpB (porine). Le complexe de WzaB et de WzpB forme un canal complet canonique, l'orientation de WzaB (OPX) est conforme au modèle canonique, et l'orientation des queues N-terminales est tournée vers la membrane externe A) Structure globale du complexe WzaB-WzpB obtenue par AlphaFold Multimer 3 (Abramson et al., 2024). B) Charges nettes de protomères WzaB et WzpB conservées positives (en bleu), l'intensité de la neutralité au cœur du complexe pourrait constituer un facteur critique pour la sécrétion avec une forte intensification des charges positives distales. C) Structure globale du complexe de sept WzaB seuls obtenue par AlphaFold Multimer 3 (Abramson et al., 2024), le complexe forme un canal complet D) Charges nettes de sept protomères WzaB seuls sont toujours positives. La formation du canal complet rapproche les zones neutres de chaque protomère. Visualisation réalisée avec ChimeraX (Meng et al., 2023).

III- Complexe de huit WzaB (OPX) seuls et avec WzpB (porine) : Le complexe formé de huit protomères WzaB et d'un WzpB conserve la formation d'un canal complet canonique avec un alignement plus précis entre les bords du canal formé par WzaB et l'ouverture périplasmique de WzpB. Le complexe de WzaB seuls forme également un canal complet (figure 3.11). Le complexe d'un WzpB et de huit protomères WzaB respecte l'orientation canonique décrite pour Wza (Dong *et al.*, 2006). L'orientation des queues N-terminales devient entièrement vers la membrane externe, ce qui suggère fortement une interaction intégrale/ancrage au sein de cette membrane. La charge neutre du cœur persiste, tandis que WzpB présente un décalage de charge vers l'extrémité distale externe. Cependant, le complexe de WzaB seuls montre une inversion d'orientation selon l'axe verticale, où les queues N-terminales projettent dans le lumen du canal formé.

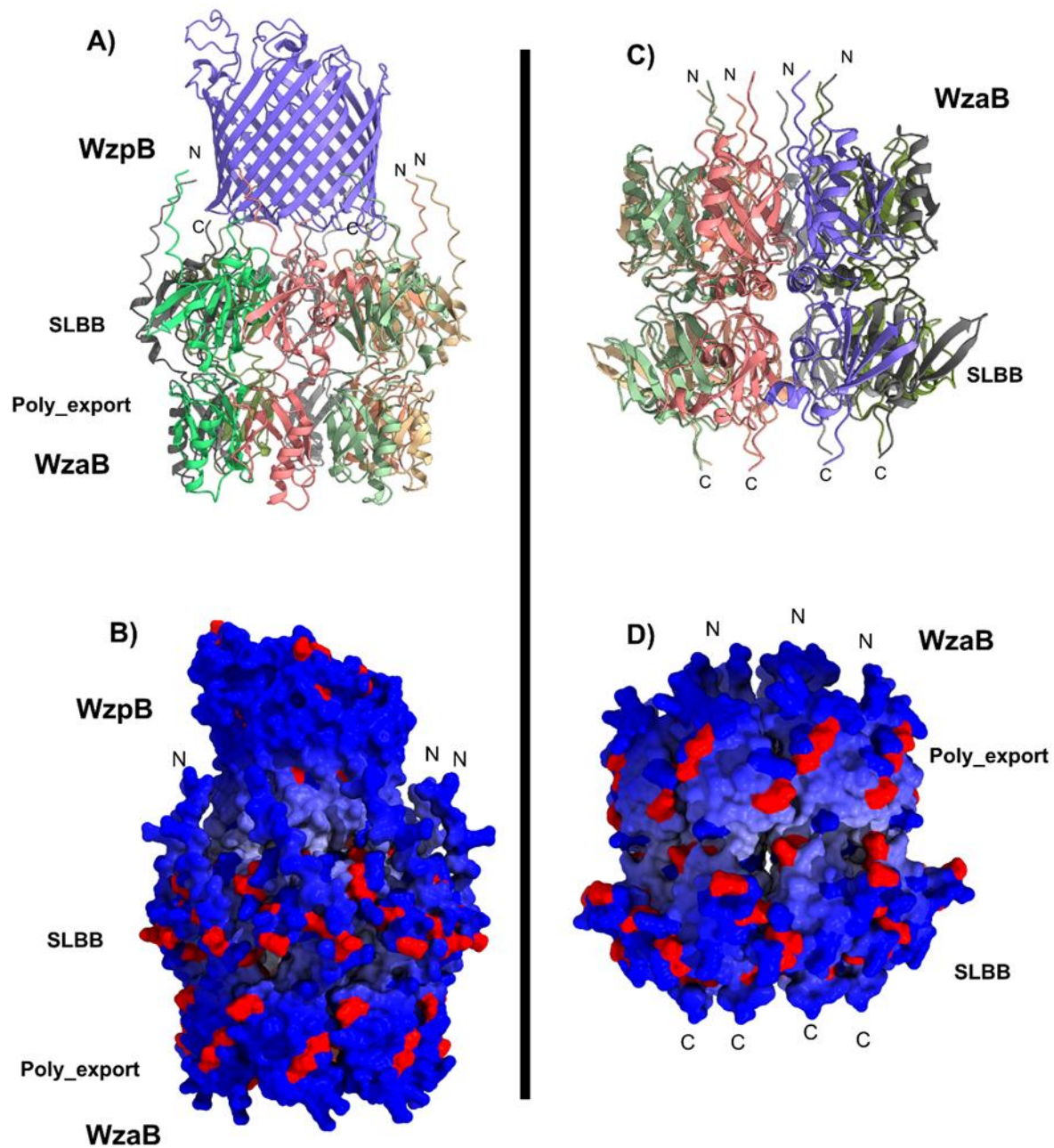


Figure 3.11 : Structure du complexe formé de huit protomères WzaB (OPX) seuls et avec un WzpB (porine). Le complexe de huit WzaB et d'un WzpB forme un canal complet canonique, l'orientation de WzaB (OPX) est conforme au modèle canonique de Wza, les queues N-terminales sont nettement orientées vers la membrane externe A) Structure globale du complexe WzaB-WzpB obtenue par Alphafold Multimer 3 (Abramson et al., 2024). B) Charges nettes de protomères WzaB et WzpB sont positives (en bleu). L'intensité de la neutralité au cœur du complexe augmente, notamment en raison de la couverture par les

queues N-terminales, et s'accompagne avec une forte intensification des charges positives distales. C) Structure globale du complexe de huit WzaB seuls obtenue avec AlphaFold Multimer 3 (Abramson et al., 2024), le complexe forme un canal complet, mais les queues N-terminales projettent dans le lumen de ce canal. D) Charges nettes de huit protomères WzaB demeurent positives. L'écartement entre les protomères expose des zones neutres vers l'extérieur. Visualisation réalisée avec ChimeraX (Meng et al., 2023).

En conclusion, les complexes formés précédemment :

À partir de six protomères de WzaB (OPX), un canal canonique se constitue au sein du complexe (avec WzpB), et à partir de sept protomères de WzaB, les queues N-terminales commencent à se réorienter vers la membrane externe, avec huit protomères, elles sont entièrement dirigées vers la membrane externe, de manière compatible avec l'intégration/l'ancrage. Les interfaces de protomères de WzaB en contact avec les résidus situés aux bords de l'ouverture périplasmique de WzpB (porine) deviennent plus alignées, plus précisément avec huit protomères WzaB, ceci peut être en raison de rapprochement des circonférences de l'ouverture de WzpB et le bord du canal de WzaB. La configuration de huit WzaB et d'un WzpB pourrait correspondre à l'étape active du transport des polysaccharides.

Le cœur neutre intensifié observé dans ces complexes, associé à une augmentation des charges positives aux extrémités distales du cœur, pourrait indiquer à la fois une propulsion électrostatique du polysaccharide BPS au cours de la sécrétion par la neutralité et aussi une attraction électrostatique du polysaccharide BPS par les charges positives distales.

3.2.2 Analyse des interactions et de l'équilibre des complexes formés par WzaB (OPX) seuls ou avec WzpB (porines)

Les complexes formés ont été analysés à l'aide du service PDBePISA (Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies) (Krissinel et Henrick, 2005), les résultats obtenus comprennent l'énergie libre de dissociation (ΔG), le nombre de liaisons hydrogène, la surface des protomères et des interfaces, ainsi que le nombre des résidus impliqués dans l'interaction.

Le critère principal le plus important, l'énergie libre de dissociation (ΔG), augmente avec l'accroissement du nombre de WzaB (OPX) au sein du complexe WzaB-WzpB en comparaison avec les complexes formés de WzaB seuls. Le tableau 3.1 présente les résultats d'interactions. Chaque paire de lignes (haut en jaune et bas en vert) représente l'interaction entre deux protomères WzaB, et le tableau se poursuit pour les complexes allant de deux protomères jusqu'à huit WzaB. La ligne supérieure (jaune) correspond aux

interactions entre les protomères WzaB (WzaB-WzaB) dans le complexe formé des WzaB seuls. Cependant la ligne inférieure (verte) correspond également aux interactions entre les protomères WzaB (WzaB-WzaB), mais dans le complexe formé du même nombre de WzaB et contenant la porine WzpB.

À partir des complexes formés par cinq protomères WzaB, la cohérence de données et de paramètres des interactions devient manifeste, soit pour l'énergie ou pour le nombre de résidus à l'interface. En revanche, les complexes formés de moins de cinq protomères WzaB seuls montrent des énergies d'interaction plus élevées que cinq protomères WzaB avec un WzpB, en faveur de la formation des agglomérats de WzaB. L'énergie d'interactions entre la porine WzpB et chaque protomère WzaB au fil de la formation de ces complexes, est inférieure à celle entre les protomères WzaB, que ce soit en présence ou en absence de la porine WzpB. (tableau 3.2)

Nombre de WzaB	No. de WzaB	Surface totale (Å²)	Interface (résidus)	Interface d'interaction (Å²)	ΔG (kcal/mol)	Liaison hydrogène	Interface (résidus)	Surface totale (Å²)	No. de WzaB
2	B	11952	41	1126.8	-8.4	2	40	11900	A
		12180	38	1006.4	1.9	5	40	12054	
3	B	11873	11	367.7	-7.2	2	12	11932	A
		11881.3	57	1508	-7.4	17	48	12148.9	
	B	11873	13	397.6	-7.2	2	12	11862	C
		11881.3	46	1440.1	-8.0	13	52	11844.7	
	A	11932	11	380.2	-7.2	2	12	11862	C
		-	-	-	-	-	-	-	
4	B	12098	41	1207.4	-7.5	8	40	12100	A
		12166	-	-	-	-	-	12218	
	B	12098	32	1024.1	-11.0	6	32	12082	C
		12053	57	1609.4	-9.2	16	53	12166	
	D	12088	38	1208.3	-8.2	8	40	12082	C
		12148	52	1610.9	-9.4	13	57	12053	
	D	12088	33	1042.7	-10.7	8	34	12100	A
		12148	57	1622.5	-8.9	16	50	12218	
5	B	11440	43	1314.2	-11.8	10	40	11444	A

Nombre de WzaB	No. de WzaB	Surface totale (Å²)	Interface (résidus)	Interface d'interaction (Å²)	ΔG (kcal/mol)	Liaison hydrogène	Interface (résidus)	Surface totale (Å²)	No. de WzaB
		11997	44	1285.8	-11.3	11	42	12053	
	D	11332	4	151.5	-1.3	0	6	11444	A
		-	-	-	-	-	-	-	
	E	11211	16	381.5	-4.1	1	17	11444	A
		-	-	-	-	-	-	-	
	D	11332	6	81.0	-0.5	1	4	11440	B
		-	-	-	-	-	-	-	
	E	11211	4	25.6	-0.7	0	3	11440	B
		-	-	-	-	-	-	-	
	C	11352	3	46.5	-0.1	0	2	11440	B
		11696	45	1288.9	-11.1	13	41	11997	
	C	11352	42	1358.5	-8.9	7	43	11332	D
		11969	42	1326.5	-11.7	13	43	11960	
	C	11352	19	564.1	-4.6	2	23	11211	E
		-	-	-	-	-	-	-	
	D	11332	1	31.2	0.2	0	1	11211	E
		11960	42	1359.8	-12.1	13	44	11934	
6	B	11602	44	1316.2	-9.1	9	44	11614	A
		11993	46	1367.7	-8.9	11	48	11919	
	B	11602	19	502.5	-2.8	2	19	11642	C
		11993	46	1296.2	-8.6	13	43	11983	
	D	11606	46	1203.9	-7.7	9	41	11642	C
		11989	45	1320.1	-7.8	11	45	11983	
	D	11606	44	1287.2	-8.3	8	47	11575	E
		11989	46	1297.5	-8.8	12	43	11997	
	F	11508	50	1398.4	-9.5	8	45	11575	E
		11967	43	1302.1	-8.7	13	45	11997	
7	F	11508	29	800.2	-5.9	7	28	11614	A
		11967	44	1300.0	-8.6	12	43	11919	
	B	11669	42	1357.3	-8.3	10	45	11688	A

Nombre de WzaB	No. de WzaB	Surface totale (Å²)	Interface (résidus)	Interface d'interaction (Å²)	ΔG (kcal/mol)	Liaison hydrogène	Interface (résidus)	Surface totale (Å²)	No. de WzaB
		11686	44	1294.6	-6.5	10	46	11963	
	B	11669	45	1327.1	-8.2	11	39	11672	C
		11686	48	1331.9	-6.3	12	43	11692	
	D	11712	40	1337.3	-8.4	7	44	11672	C
		11666	42	1343.4	-6.7	11	46	11692	
	D	11712	44	1310.0	-8.1	9	40	11681	E
		11666	47	1343.5	-6.8	10	42	11695	
	F	11649	40	1313.1	-8.3	10	44	11681	E
		11669	44	1352.7	-6.4	10	46	11695	
	F	11649	44	1305.1	-8.2	10	39	11671	G
		11669	48	1352.7	-6.6	11	43	11716	
	A	11688	39	1328.6	-8.2	7	44	11671	G
		11963	43	1354.4	-6.8	10	47	11716	
8	B	11305	60	1760.5	-13.4	15	60	11322	A
		11872	42	1312.5	-11.7	8	44	11851	
	B	11305	58	1765.2	-12.8	16	60	11316	C
		11872	42	1318.1	-11.4	9	42	11883	
	D	11298	58	1735.4	-14.0	15	57	11316	C
		11843	42	1293.1	-11.3	9	44	11883	
	D	11298	59	1750.2	-12.9	16	58	11294	E
		11843	42	1300.5	-11.1	8	41	11884	
	F	11348	60	1741.8	-12.9	15	59	11294	E
		11880	42	1266.9	-11.1	8	43	11884	
	F	11348	58	1751.4	-12.0	15	57	11352	G
		11880	43	1288.6	-11.4	8	42	11859	
	H	11336	61	1818.5	-14.6	19	62	11352	G
		11888	41	1309.9	-11.1	9	42	11859	
	H	11336	60	1723.0	-12.8	15	59	11322	A
		11888	44	1295.6	-11.5	8	42	11851	

Tableau 3.1 : Données d'interactions entre un nombre accru de protomères WzaB (OPX) seuls ou en présence d'un protomère WzpB (porine en tonneau bêta). La première colonne (à gauche) indique le

nombre total de protomères WzaB, et la première à droite et la deuxième à gauche indiquent le numéro (alphabétiquement) de protomères en interaction. Pour chaque paire de protomères WzaB (mentionnée dans les deux colonnes des extrémités), deux lignes rapportent les données de leur interaction et les paramètres d'interface, la ligne jaune correspond au complexe sans WzpB (complexe formé de n nombre de protomères de WzaB seuls), et la ligne verte au complexe contenant le même n nombre de WzaB, mais avec la présence de WzpB. Cette présentation permet d'évaluer l'effet de WzpB sur l'interaction WzaB-WzaB. Les colonnes suivantes droite et gauche, vers le centre, reportent les surfaces totales (en Å²) de chaque protomère, suivies par le nombre de résidus impliqués dans l'interface, indiquant les points d'interaction. Au centre du tableau, est indiquée la surface d'interface (en Å²) entre les deux protomères qui partage la ligne, suivie par l'énergie d'interaction (en kcal/mol) et le nombre des liaisons hydrogène. À partir de six protomères WzaB (avec ou sans WzpB) la cohérence des données et des paramètres d'interaction devient plus nette. Conformément aux structures du canal, le complexe de 7 et 8 protomères WzaB seuls (six et plus WzaB en présence de WzpB) forme un canal complet, la concordance des énergies et l'équilibre des forces y suggèrent une stabilité accrue de ces complexes. Les valeurs de ces données ont été obtenues avec BDPePISA (Krissinel et Henrick, 2005).

Surface totale de WzpB (Å ²)	Interface (résidus)	Interface d'interaction (Å ²)	ΔG (kcal/mol)	Liaison hydrogène	Interface (résidus)	Surface totale (Å ²)	Nombre de WzaB
20057.2	297	2467.7	6.6	25	54	11254.7	1
19945.9	42	1139.6	-2.5	8	29	12054	2x
	3	58.9	-1.4	0	3	12180	
19992.7	7	289.4	-2.0	4	8	12148.9	3x
	9	276.7	-2.6	5	7	11881.3	
	10	241.7	-3.2	2	6	11844.7	
19875	7	273.6	-2.4	3	7	12148	4x
	7	241.8	-2.2	2	7	12218	
	6	166.6	-2.4	2	6	12053	
	2	157.9	-2.1	0	2	12166	
20029	9	221.9	-3.6	2	6	11934	5x
	6	214.8	-1.8	4	7	12053	
	6	223.0	-1.7	4	7	11969	
	8	213.8	-2.9	3	5	11997	
	6	214.8	-1.8	0	7	12053	
19727	10	237.0	-2.1	1	6	11919	6x
	10	289.4	0.6	4	9	11993	
	10	271.5	0.0	3	5	11983	
	9	196.4	-2.1	1	5	11989	

Surface totale de WzpB (Å²)	Interface (résidus)	Interface d'interaction (Å²)	ΔG (kcal/mol)	Liaison hydrogène	Interface (résidus)	Surface totale (Å²)	Nombre de WzaB
	7	206.5	-2.0	1	6	11997	
	7	284.8	-3.3	2	6	11967	
19386	10	228.7	-3.3	2	6	11963	7x
	7	210.2	-1.6	0	6	11686	
	8	238.8	-2.7	1	6	11692	
	8	278.4	-2.7	1	6	11666	
	10	271.2	-1.7	5	9	11695	
	10	327.4	2.8	9	7	11669	
	9	262.9	-1.8	1	6	11716	
20155	8	237.3	-1.3	4	6	11851	8x
	8	248.2	-1.5	2	7	11872	
	9	226.8	-2.3	5	7	11883	
	7	247.9	-2.9	1	6	11843	
	9	273.9	-0.1	4	9	11884	
	9	317.9	0.1	5	7	11880	
	8	221.7	-1.9	0	5	11859	
	8	214.9	-2.9	2	7	11888	

Tableau 3.2: Données d'interactions entre WzpB (tonneau bêta) et chaque WzaB (OPX) dans des complexes comportant un nombre croissant de WzaB. La première colonne (à gauche) indique la surface totale de WzpB (en Å²), une colonne dédiée (à droite) précise le nombre de protomères WzaB, suivie par leur surface totale (en Å²) (la colonne suivante vers le centre). Pour chaque paire WzpB-WzaB en interaction, les colonnes allant des extrémités au centre reportent le nombre de résidus impliqués, indiquant les points d'interaction. Au centre du tableau figurent la surface d'interface WzpB-WzaB (en Å²), l'énergie de désassociation ΔG (Kcal/mol) et le nombre des liaisons hydrogène. En comparaison avec le tableau 3.1, l'interaction entre les protomères WzaB (WzaB-WzaB) est plus forte que celle entre WzaB-WzpB, que ce soit en présence ou en absence de WzpB. Cependant à partir de six protomères WzaB et plus, la conformité des assemblages impose une cohérence des interactions et un équilibre des forces. Les valeurs de ces données ont été obtenues avec BDPePISA (Krissinel et Henrick, 2005).

Les interactions entre les protomères WzaB (OPX) ont été obtenues également en présence de WzcB (PCP), et bien en son absence, mais en raison de limitations structurales et bioinformatiques, le nombre maximal de protomères WzaB interagissant avec la présence de WzcB était limité à trois protomères. Le tableau 3.3 présente les résultats de ces interactions. Chaque paire de lignes (ligne supérieure en jaune, ligne

inférieure en vert) représente l'interaction entre deux protomères WzaB, le tableau couvre les complexes formés de deux et de trois protomères WzaB. La ligne supérieure (jaune) correspond aux interactions entre les protomères WzaB (WzaB-WzaB) dans le complexe de WzaB seuls, la ligne inférieure (verte) correspond aux interactions entre les protomères WzaB (WzaB-WzaB) dans le complexe contenant WzcB (PCP).

La présence de WzcB au sein de ces complexes renforce fortement les interactions entre les protomères WzaB, malgré l'interaction répulsive entre chaque protomère WzaB et WzcB (énergie positive) (tableau 3.4). Cela pourrait favoriser un entassement et un rapprochement entre les protomères WzaB. Le tableau 3.4 présente les interactions entre des protomères WzaB (OPX) et WzcB, les résultats montrent d'interactions répulsives et favorisent la dissociation entre WzaB et WzcB.

No de WzaB	WzaB	Surface totale (Å ²)	Interface d'interaction (résidus)	Interface d'interaction (Å ²)	ΔG (kcal/mol)	Liaison hydrogène	Interface d'interaction (résidus)	Surface totale (Å ²)	WzaB
2	B	11952	41	1126.8	-8.4	2	40	11900	A
		12215	47	1515.9	-9.3	8	49	12602	
3	B	11873	11	367.7	-7.2	2	12	11932	A
		11881.3	60	1857.4	-15.7	14	59	11713	
	B	11873	13	397.6	-7.2	2	12	11862	C
		11721	6	163.1	-3.0	0	6	11802	
	A	11932	11	380.2	-7.2	2	12	11862	C
		11713	57	1936.8	-18.6	20	57	11802	

Tableau 3.3: Données d'interactions entre un nombre accru de protomères WzaB (OPX), seuls et en présence d'un protomère de WzcB (PCP). La première colonne (à gauche) indique le nombre total de protomères WzaB, et la première à droite et la deuxième à gauche indiquent le numéro (alphabétiquement) de protomères en interaction. Chaque paire de lignes (pour deux protomères WzaB mentionnés aux deux colonnes d'extrémités du tableau) reporte les données d'interaction, la ligne supérieure (jaune) correspond aux données d'interaction WzaB (WzaB-WzaB) dans le complexe sans WzcB (complexe de n protomères de WzaB seuls). La ligne inférieure (verte) correspond aux données d'interaction entre les protomères WzaB (WzaB-WzaB) dans le complexe en présence WzcB en interaction. Afin d'évaluer l'effet de WzcB sur l'interaction des protomères de WzaB. Les colonnes allant des extrémités vers le centre (droite et gauche) reportent les surfaces totales (en Å²) de chaque protomère, suivies par le nombre de résidus impliqués dans l'interface, indiquant les points d'interaction. Au centre du tableau figurent la surface d'interface (en Å²) entre les deux protomères qui partagent la ligne, l'énergie d'interaction (en kcal/mol) et le nombre des liaisons hydrogène. En raison de la contrainte structurale, le nombre de protomères WzaB pouvant interagir avec un seul protomère WzcB a été limité à trois protomères WzaB. Malgré cette limitation, les données montrent une augmentation marquée des interactions entre les protomères WzaB (WzaB-WzaB) en présence d WzcB. Les valeurs de ces données ont été obtenues avec BDPePISA (Krissinel et Henrick, 2005).

Surface totale de WzcB (Å ²)	Interface (résidus)	Interface d'interaction (Å ²)	ΔG (kcal/mol)	Liaison hydrogène	Interface (résidus)	Surface totale (Å ²)	Les WzaB
45796.1	9	439.5	0.3	8	11	12617.4	1
45110	11	436.0	0	5	11	12602	2x
	6	143.2	0.6	0	5	12215	
44337	9	424.1	0.1	9	11	11713	3x
	4	102.4	0.5	0	4	11721	
	-	-	-	-	-	-	

Tableau 3.4: Données d'interactions entre WzcB (PCP) et chaque WzaB (OPX) dans des complexes formés de nombre accru de WzaB. La première colonne (à gauche) indique la surface totale de WzcB (en Å²), une colonne dédiée précise (à droite) le nombre de protomères WzaB, suivi (vers le centre) par leur surface totale. Pour chaque ligne de données de WzcB et de WzaB en interaction, les colonnes aux extrémités reportent les surfaces totales (en Å²) de chaque protomère et le nombre de résidus impliqués, indiquant les points de contact. Au centre du tableau figurent la surface d'interface WzcB-WzaB (en Å²), l'énergie d'interaction ΔG (kcal/mol) et le nombre des liaisons hydrogène. En comparaison avec le tableau 3.3, les interactions entre les protomères WzaB (WzaB-WzaB) sont plus fortes que les interactions WzcB-WzaB, en raison de l'énergie de dissociation (ΔG) positive pour WzcB-WzaB, qui indique une force répulsive entre ces protomères, ce qui met en lumière également un rôle de BPS pour rapprocher les extrémités de ces deux protéines et stabiliser l'assemblage. Les valeurs de ces données ont été obtenues avec BDPePISA (Krissinel et Henrick, 2005).

3.2.3 La prédiction des erreurs d'alignements (PAE)

La PAE calculée pour les complexes de WzaB (OPX) seuls indique une stabilité des certains complexes formés. Une forte stabilité se manifeste pour les complexes formés de sept et de huit protomères (figure 3.14), ainsi qu'une stabilité intermédiaire pour le complexe de 2, 3 et 4 protomères (figure 3.12). En revanche, les complexes de cinq et six protomères présentent la stabilité la plus faible (figure 3.13). La stabilité chute nettement pour le complexe de neuf WzaB (figure 3.15).

Pour les complexes de WzpB (la porine en tonneau bêta) et d'un nombre croissant de WzaB (OPX), la stabilité prédite augmente globalement avec le nombre de WzaB (figures 3.16-18), mais chute nettement pour le complexe de neuf protomères de WzaB et d'un WzpB (figure 3.19) (Voir Annexe E pour tous les diagrammes de PAE). Tous les diagrammes PAE montrent une flexibilité relative entre les deux domaines de WzaB, SLBB et poly_export. En plus, la stabilité des complexes de WzaB-WzpB est inférieure à celle des complexes de WzaB seuls. Cela peut s'expliquer par les répartitions de charges (pour WzaB et WzpB en interaction) et par l'énergie nécessaire à la formation du cœur neutre.

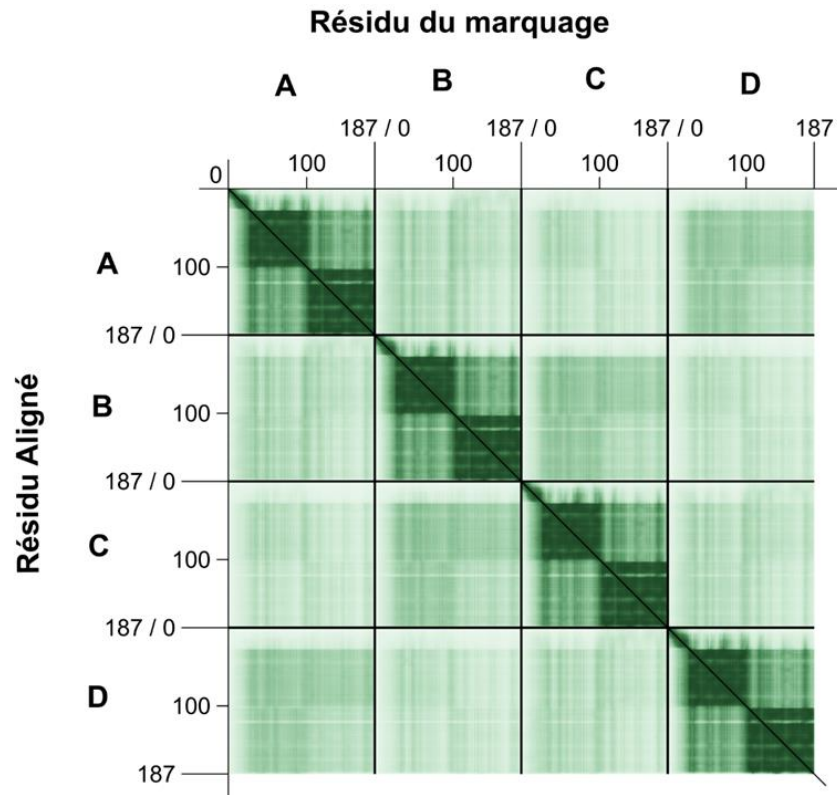


Figure 3.12 : Diagramme de prédiction des erreurs d'alignements (PAE) pour le complexe de quatre protomères WzaB (OPX) seuls. Le diagramme représente la déviation attendue entre paires de résidus, lorsque certains résidus sont pris comme références (ancrage – résidus de marquage), la déviation attendue (résidus alignés) varie entre la plus faible déviation (forte stabilité), en vert (0 Å), et la déviation maximale (faible stabilité), en blanc (30 Å). Dans ce complexe de quatre protomères WzaB (A, B, C et D), la stabilité est intermédiaire, comparée aux autres homopolymères WzaB. Visualisation réalisée avec AlphaFold (Abramson *et al.*, 2024).

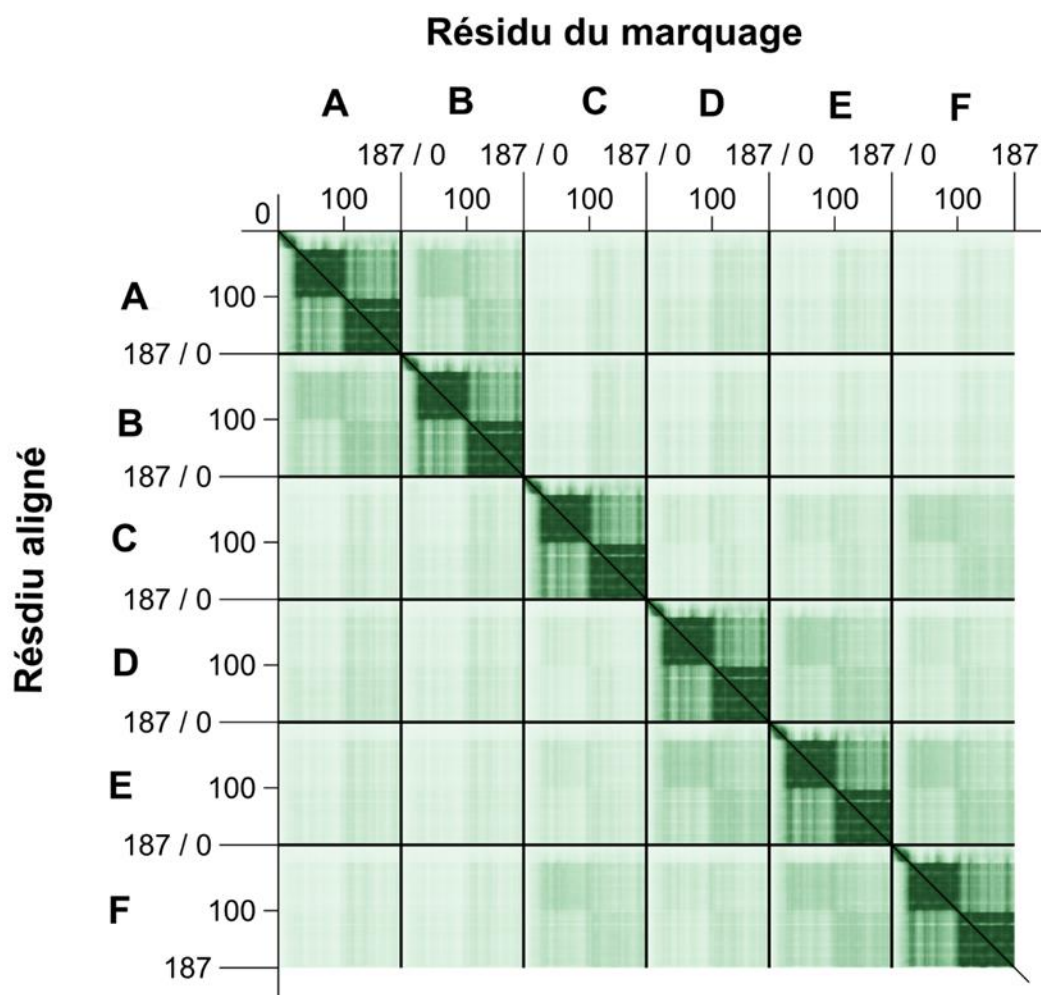


Figure 3.13 : Diagramme de prédiction des erreurs d'alignements (PAE) pour le complexe de six protomères WzaB (OPX) seuls. Le diagramme représente la déviation attendue entre paires de résidus, lorsque certains résidus sont pris comme référence (ancrage – résidus de marquage), la déviation attendue (résidus alignés) varie entre la plus faible déviation (forte stabilité), en vert (0 Å), et la déviation maximale (faible stabilité), en blanc (30 Å). Dans ce complexe de six protomères WzaB (A, B, C, D, E et F), la stabilité est la plus faible, comparée aux autres homopolymères WzaB. Visualisation réalisée avec AlphaFold (Abramson *et al.*, 2024).

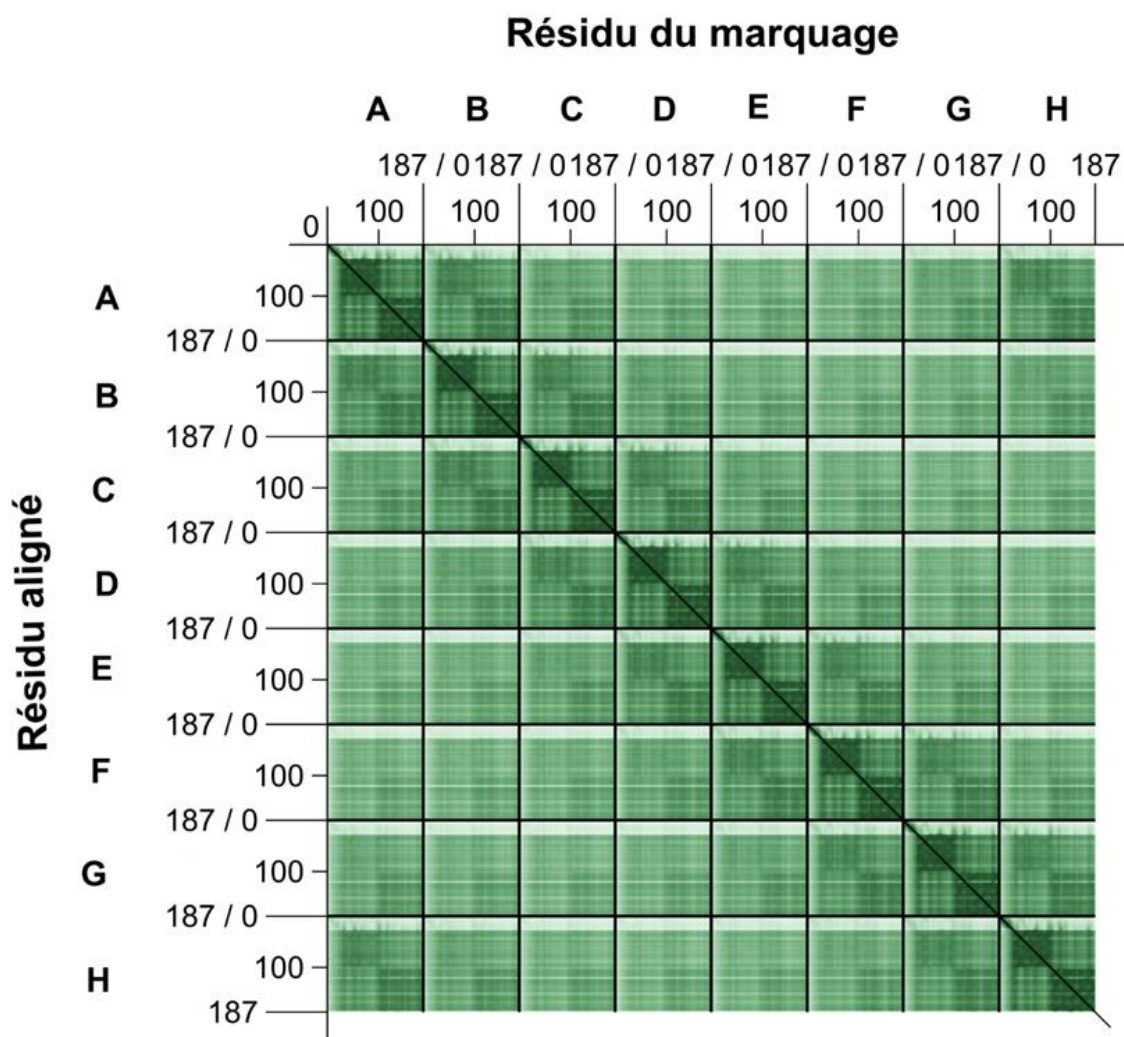


Figure 3.14 : Diagramme de prédiction des erreurs d'alignements (PAE) pour le complexe de huit protomères WzaB (OPX) seuls. Le diagramme représente la déviation attendue entre paires de résidus, lorsque certains résidus sont pris comme référence (ancrage – résidus de marquage), la déviation attendue (résidus alignés) varie entre la plus faible déviation (forte stabilité), en vert (0 Å), et la déviation maximale (faible stabilité), en blanc (30 Å). La stabilité de ce complexe de huit protomères WzaB (A, B, C, D, E, F, G et H) est la plus forte, comparée aux autres homopolymères WzaB. Visualisation réalisée avec AlphaFold (Abramson *et al.*, 2024).

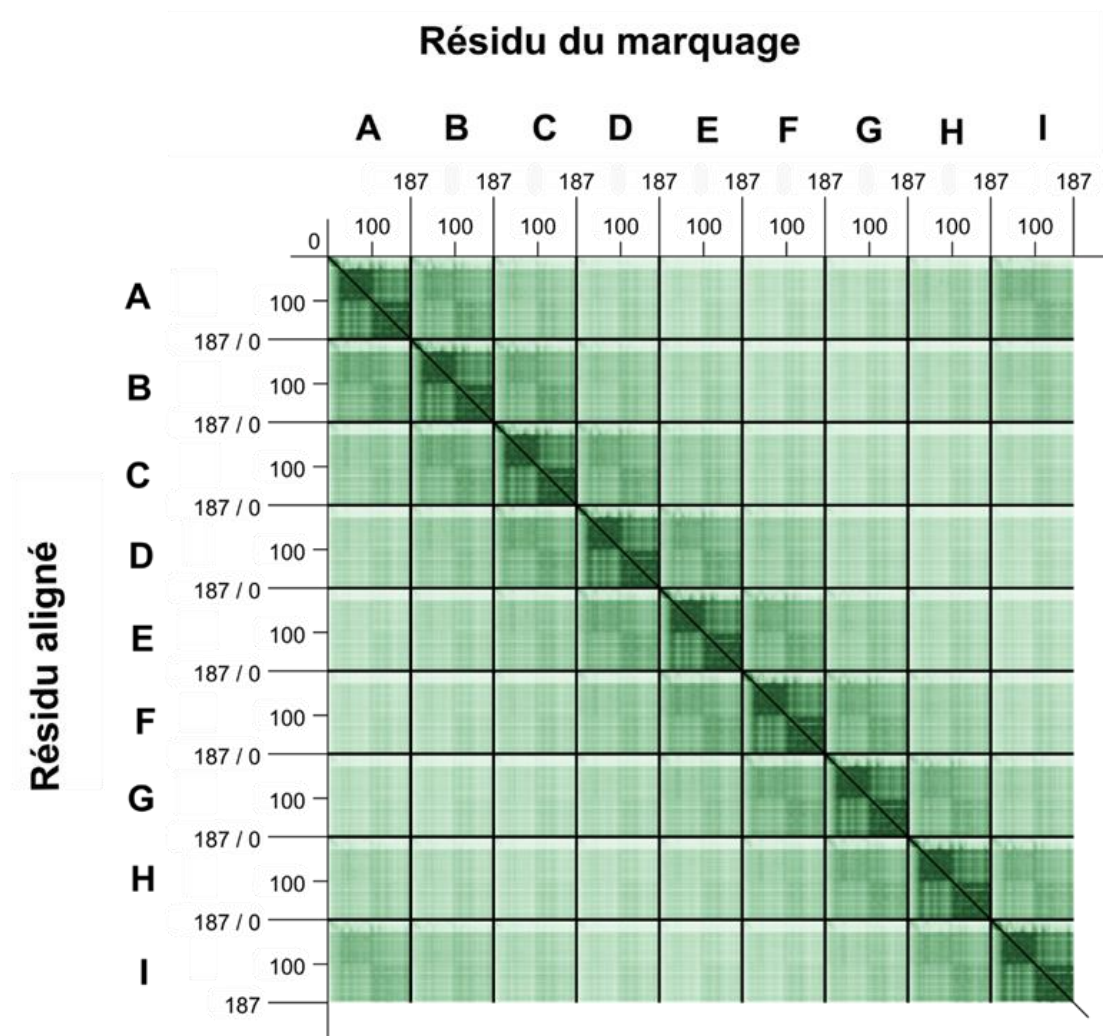


Figure 3.15 : Diagramme de prédiction des erreurs d'alignements (PAE) pour le complexe de neuf protomères WzaB (OPX) seuls. Le diagramme représente la déviation attendue entre paires de résidus, lorsque certains résidus sont pris comme référence (ancrage – résidus de marquage), la déviation attendue (résidus alignés) varie entre la plus faible déviation (forte stabilité), en vert (0 Å), et la déviation maximale (faible stabilité), en blanc (30 Å). La stabilité de ce complexe de neuf protomères WzaB (A, B, C, D, E, F, G, H et I) chute fortement, comparée aux autres homopolymères WzaB. Visualisation réalisée avec AlphaFold (Abramson *et al.*, 2024).

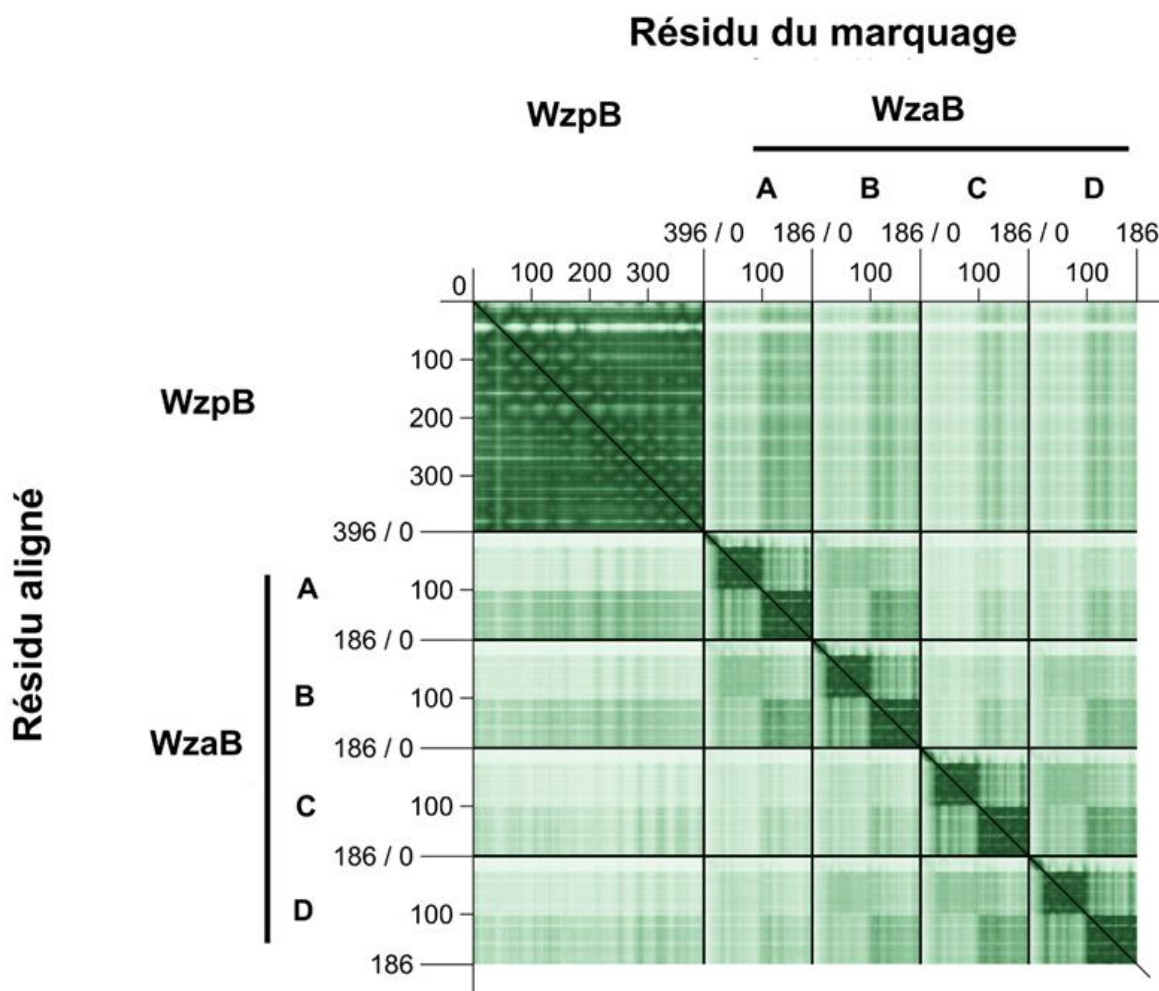


Figure 3.16 : Diagramme de prédiction des erreurs d'alignements (PAE) pour le complexe de quatre protomères WzaB (OPX) et d'un WzpB. Le diagramme représente la déviation attendue entre paires de résidus, lorsque certains résidus sont pris comme référence (ancrage – résidus de marquage), la déviation attendue (résidus alignés) varie entre la plus faible déviation (forte stabilité), en vert (0 Å), et la déviation maximale (faible stabilité), en blanc (30 Å). La stabilité de ce complexe de quatre protomères WzaB (A, B, C et D) et d'un WzpB est intermédiaire, comparée aux complexes WzaB-WzpB. Visualisation réalisée avec AlphaFold (Abramson *et al.*, 2024).

Résidu du marquage

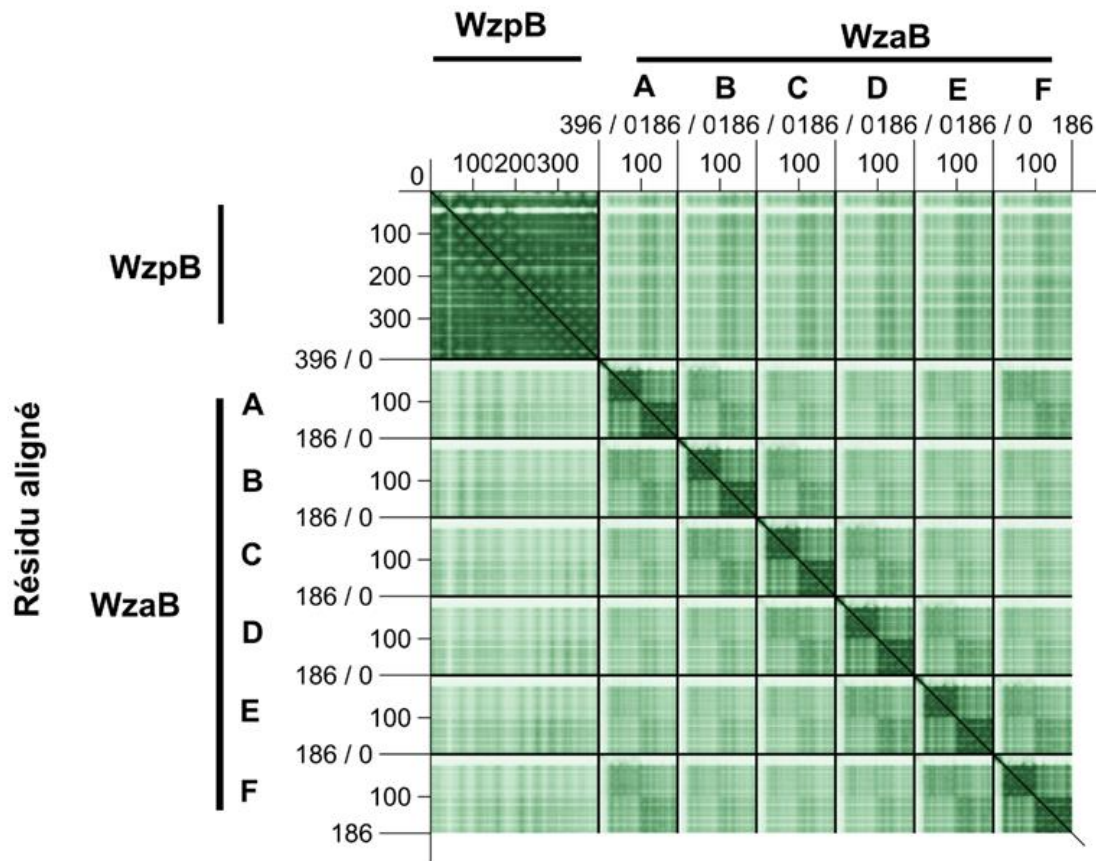


Figure 3.17 : Diagramme de prédiction des erreurs d'alignements (PAE) pour le complexe de six protomères WzaB (OPX) et d'un WzpB. Le diagramme représente la déviation attendue entre paires de résidus, lorsque certains résidus sont pris comme référence (ancrage – résidus de marquage), la déviation attendue (résidus alignés) varie entre la plus faible déviation (forte stabilité), en vert (0 Å), et la déviation maximale (faible stabilité), en blanc (30 Å). La stabilité de ce complexe de six protomères WzaB (a, B, C, D, E et F) et d'un WzpB est au-dessus d'intermédiaire, comparée aux complexes WzaB-WzpB. Visualisation réalisée avec AlphaFold (Abramson *et al.*, 2024).

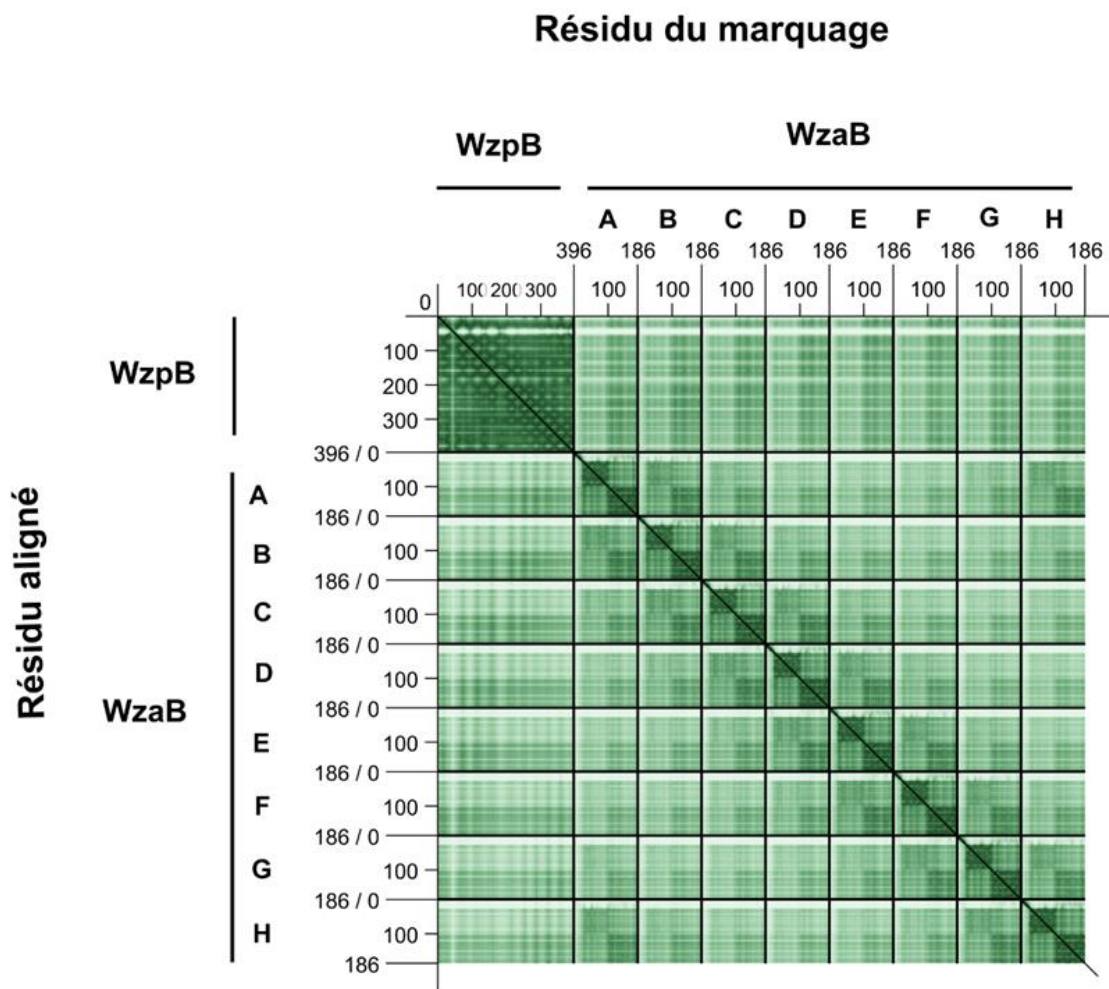


Figure 3.18 : Diagramme de prédiction des erreurs d'alignements (PAE) pour le complexe de huit protomères WzaB (OPX) et d'un WzpB. Le diagramme représente la déviation attendue entre paires de résidus, lorsque certains résidus sont pris comme référence (ancrage – résidus de marquage), la déviation attendue (résidus alignés) varie entre la plus faible déviation (forte stabilité), en vert (0 Å), et la déviation maximale (faible stabilité), en blanc (30 Å). La stabilité de ce complexe de huit protomères WzaB (A, B, C, D, E, F, G et H) et d'un WzpB est la plus forte, comparée aux complexes WzaB-WzpB. Visualisation réalisée avec AlphaFold (Abramson *et al.*, 2024).

3.3 Clonage du vecteur pET20B(+) ::*mxan_1916* codant de WzpB (porine en tonneau bêta)

73

3.3.1 Clonage du gène *mxan_1916* à partir du génome de *Myxococcus xanthus* :

La réaction de PCR pour le premier cycle (pour amplifier le gène *mxan_1916* à partir du génome *Myxococcus xanthus*) a été effectuée selon la programmation thermique et le mélange réactionnel spécifiés (tableau 2.2 et tableau 2.3). Le clonage exclut le peptide signal d'origine, étant donné que le vecteur pET20(b)+ contient le peptide signal pelB. La vérification des produits de PCR pour ce cycle a montré une bande ≈ 1300 pb (figure 3.20). Cependant, la longueur attendue du gène *mxan_1916* sans le peptide signal est 1191 pb + les séquences des amorces ajoutées = 1243 pb (396 acides aminés). Les produits de PCR, précisément la bande correspondant à ≈ 1300 pb a été excisée et purifiée.

La réaction de PCR du deuxième cycle (l'insertion dans le vecteur) a été effectuée selon la programmation et le mélange décrits (tableau 2.4 et tableau 2.5). Les produits de PCR ont d'abord été traités par l'enzyme Dpn I à une concentration finale de (1 U/ μ l) avec une incubation à 37 °C pendant 2 h, suivie d'une inactivation à 80°C pendant 20 min. Le mélange résultant a été utilisé (20 μ l) directement pour la transformation avec la souche de clonage *E. coli* DH5 α . Cinq clones de la transformation ont été ensemencés dans des cultures du LB liquide avec de l'ampicilline (100 μ g/ml) à 37 °C et avec agitation 250 rpm jusqu'au lendemain, puis les cultures ont été récoltées et utilisés pour purifier le vecteur. Les vecteurs obtenus à partir de ces clones ont été envoyés pour le séquençage chez Génome Québec, qui a confirmé un clone portant la séquence correcte (voir Annexe C).

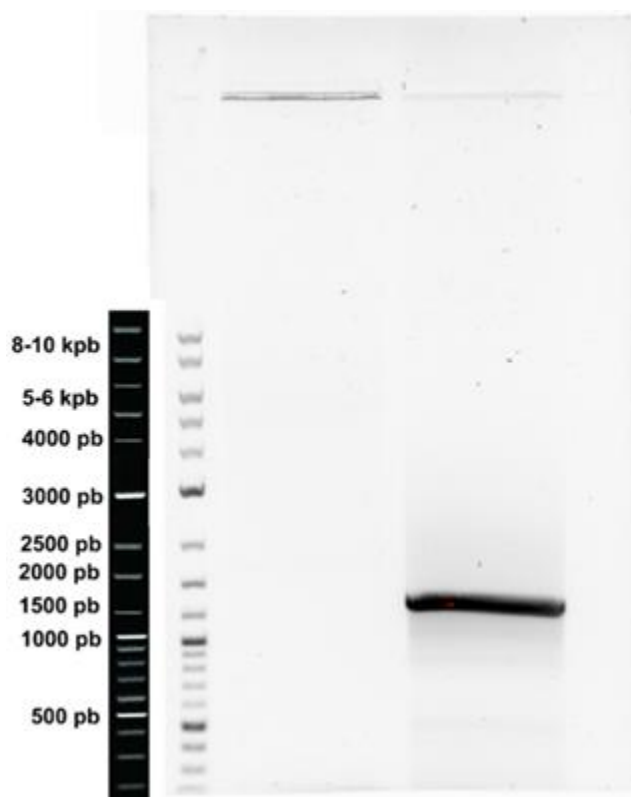


Figure 3.20 : : Gel d'agarose des produits PCR du premier cycle du clonage de *mxan_1916*. La révélation de produits PCR de ce cycle a montré une bande à ≈ 1300 pb, cohérente avec la longueur attendue du clone (1243 pb). La bande correspondante a été excisée, purifiée, puis utilisée pour le deuxième cycle (l'insertion dans le vecteur).

3.4 La surexpression de WzpB (porine en tonneau bêta)

Les étapes de surexpression comprenaient de la transformation dans des souches dédiées à la surexpression, ainsi que des optimisations de température et de concentration de l'agent d'induction.

3.4.1 Transformation des souches d'expression

La transformation a été effectuée par le protocole de choc thermique avec cinq souches de surexpression : BL21 (DE3), C41 (DE3), C43 (DE3), STAR (DE3) et pLysE (DE3). Les résultats ont montré que la transformation a réussi avec les souches C43 (DE3) et C41 (DE3) et partiellement avec BL21 (DE3) (figure 3.21). Aucun clone n'a survécu avec les souches STAR (DE3) et pLysE (DE3). L'optimisation se poursuivait avec ces trois successives souches BL21 (DE3), C41 (DE3) et C43 (DE3).

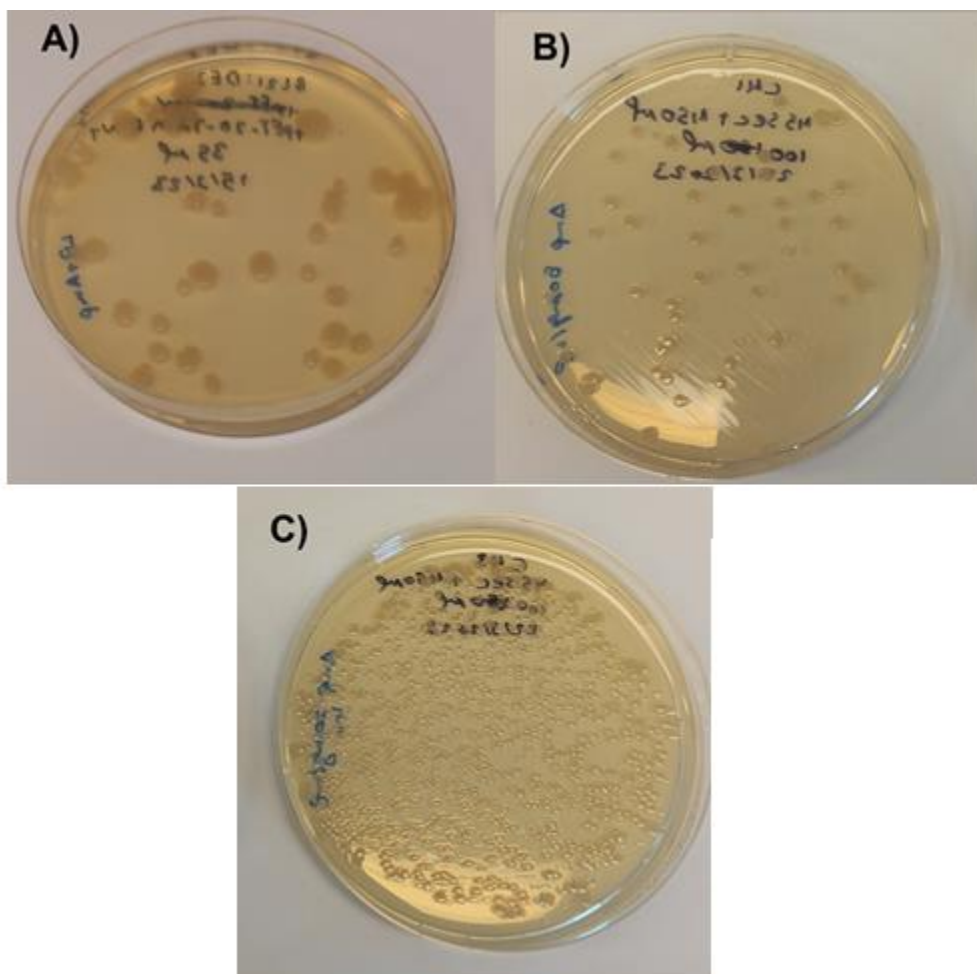


Figure 3.21 : Transformation des souches BL21 (DE3), C41 (DE3) et C43 (DE3) avec le vecteur pET20(b)+::mxan_1916. Les transformations ont été réalisées par choc thermique. Les résultats de ces transformations montrent une faible efficacité pour, A) la souche BL21 (DE3), de bons rendements pour B) C41 (DE3). C) C43 (DE3) a la meilleure efficacité observée. En revanche, les transformations effectuées avec les souches STAR (DE3) et pLysE (DE3) n'ont donné aucun clone.

3.4.2 L'optimisation de la température et la concentration de l'agent d'induction IPTG

L'optimisation de la température et de la concentration de l'agent de l'induction (IPTG) a été réalisée avec des cultures à trois températures (25 °C, 30 °C et 37 °C) et quatre concentrations d'IPTG (1 mM, 2 mM, 4 mM et 8 mM). Les analyses ont été effectuées à la suite de l'électrophorèse par SDS-PAGE et le immunobuvardage. Les (figures 3.22-25) présentent les résultats obtenus. Le poids moléculaire attendu de WzpB (la porine en tonneau bêta) est 44041 Da, incluant le marqueur d'histidine et le site de clivage TEV.

Les résultats ont montré que :

En général, les souches n'étaient pas capables à produire la protéine à 8 mM IPTG, ou la produisaient en quantité inférieure à celle des concentrations plus faibles. La production était également minimale à la température 25 °C (figure 3.22), un temps d'exposition accumulative du signal de 24 min a été nécessaire pour visualiser les bandes.

La souche C43 (DE3) est la seule capable à produire Wzpb en quantité détectable et variable selon la température et la concentration d'IPTG entre 1 et 4 mM. (figures 3.22-24). La meilleure production a été observée à 30 °C avec 1 mM d'IPTG et à 37 °C avec 2 mM d'IPTG. Ces résultats ont conduit au choix de la souche C43 (DE3) pour la surexpression, suivi d'une optimisation complémentaire à 25 °C, 30 °C et 37 °C, mais avec des concentrations d'IPTG de 0,25 mM, 0,50 mM, 1,00 mM et 2,00 mM (figure 3.25). Cette optimisation suivant a montré une production maximale avec la souche C43 à deux ensemble de conditions, à 30 °C et 0,25 mM IPTG, et à 37 °C et 2,00 mM. Ces deux conditions ont été retenues pour le fractionnement.

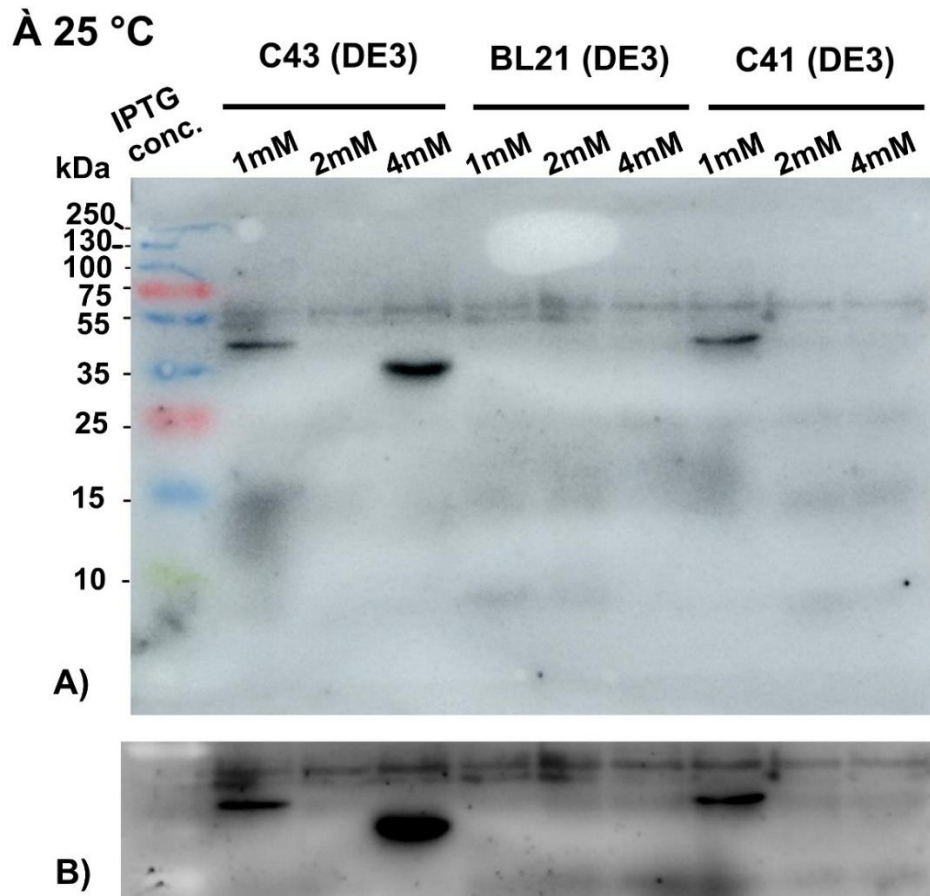


Figure 3.22 : Surexpression de WzpB (porine en tonneau bêta) à 25 °C dans différentes souches et à diverses concentrations d'IPTG. A) L'expression de WzpB à 25 °C avec 1, 2 et 4 mM d'IPTG. La souche C43 (DE3) produit une bande ≈ 44 kDa (poids attendu de WzpB) à 1 mM. À 4 mM, C43 (DE3) exprime une protéine à un poids moléculaire non attendu (moins de celui de WzpB). La souche BL21 (DE3) ne produit aucune bande spécifique aux concentrations testées. C41 (DE3) exprime WzpB en quantité notable à 1 mM uniquement. Des bandes doubles autour de 55 kDa sont observées dans toutes les souches, suggérant une espèce protéique, peut être liée à l'expression de WzpB ou la contient. B) Quantification de l'intensité des bandes de surexpression, mesurée en incréments de signal (exposition 24 min).

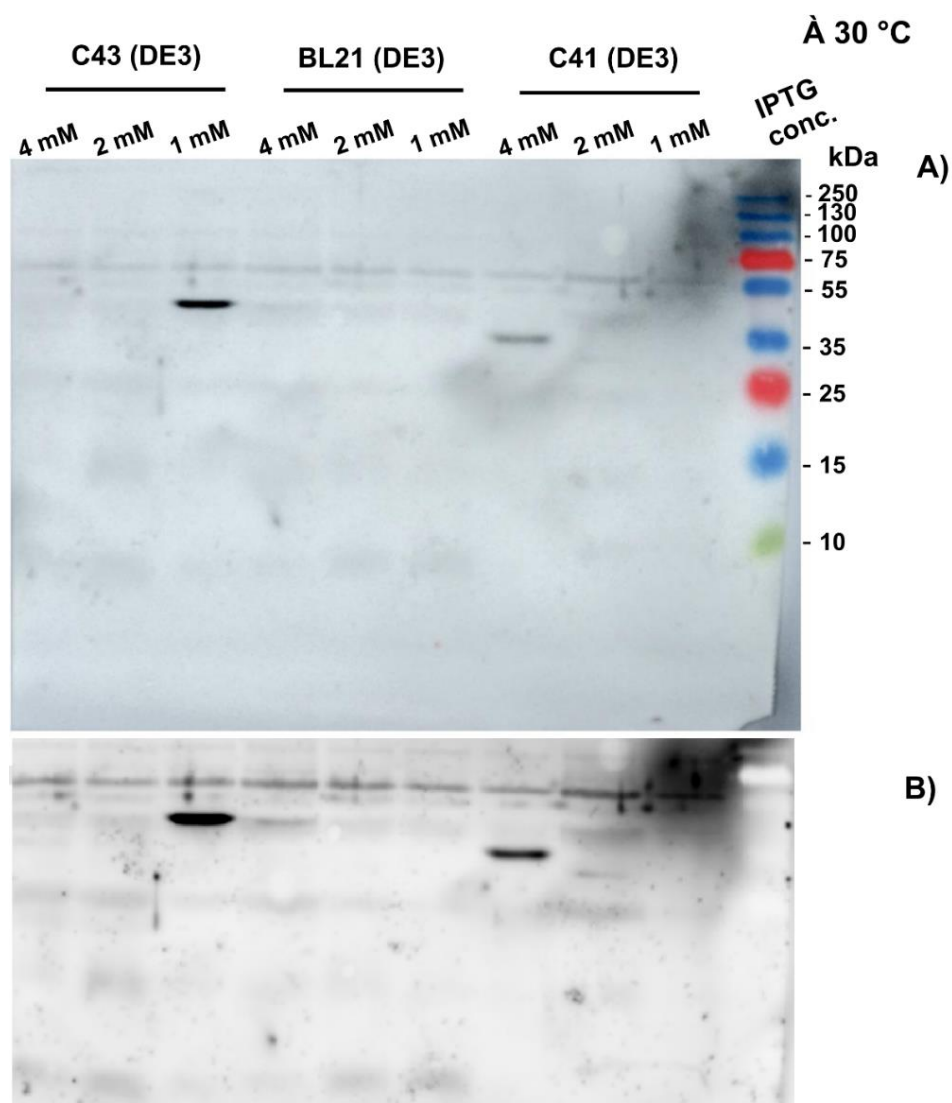


Figure 3.23 : Surexpression de WzpB (porine en tonneau bêta) à 30 °C dans différentes souches et à diverses concentrations d'IPTG. A) Expression de WzpB à 30 °C avec 1, 2 et 4 mM d'IPTG. La souche C43 (DE3) produit une bande $\approx$ 44 kDa (poids attendu de WzpB) à 1 mM. La souche BL21 (DE3) ne produit aucune bande spécifique aux concentrations testées, à l'exception d'une trace à 4 mM d'IPTG, non visible à l'exposition standard du gel, mais détectable après accumulation du signal en incrément (B). C41 (DE3) exprime une protéine non spécifique à 1 mM ($\approx$ 35 kDa). Des bandes doubles autour de 55 kDa sont observées dans toutes les souches, suggérant une espèce protéique, peut être liée à l'expression de WzpB ou la contient B) Quantification de l'intensité des bandes de surexpression, mesurée en incréments de signal (exposition 6 min).

À 37 °C

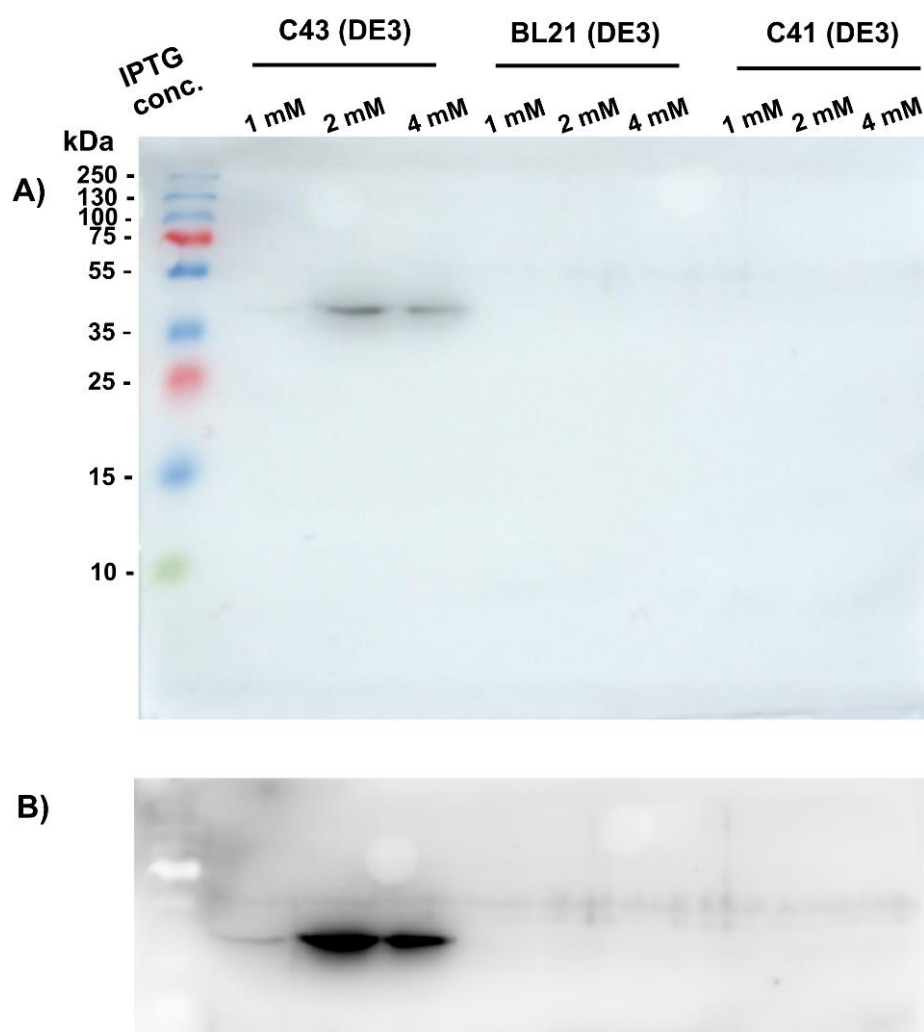


Figure 3.24 : Surexpression de WzpB (porine en tonneau bêta) à 37 °C dans différentes souches et à diverses concentrations d'IPTG. A) Expression de WzpB à 37 °C avec 1,2 et 4 mM d'IPTG. La souche C43 (DE3) est la seule à produire la porine aux trois concentrations d'IPTG, avec des bandes $\approx$ 44 kDa. Les souche BL21 (DE3) et C41 (DE3) ne produisent aucune bande spécifique aux conditions testées. Des bandes doubles $\approx$ 55 kDa sont détectées dans toutes les souches, suggérant une espèce protéique, peut être liée à l'expression de WzpB ou la contient. B) Quantification de l'intensité des bandes de surexpression, mesurée en incréments de signal (exposition 3 min et 30 s).

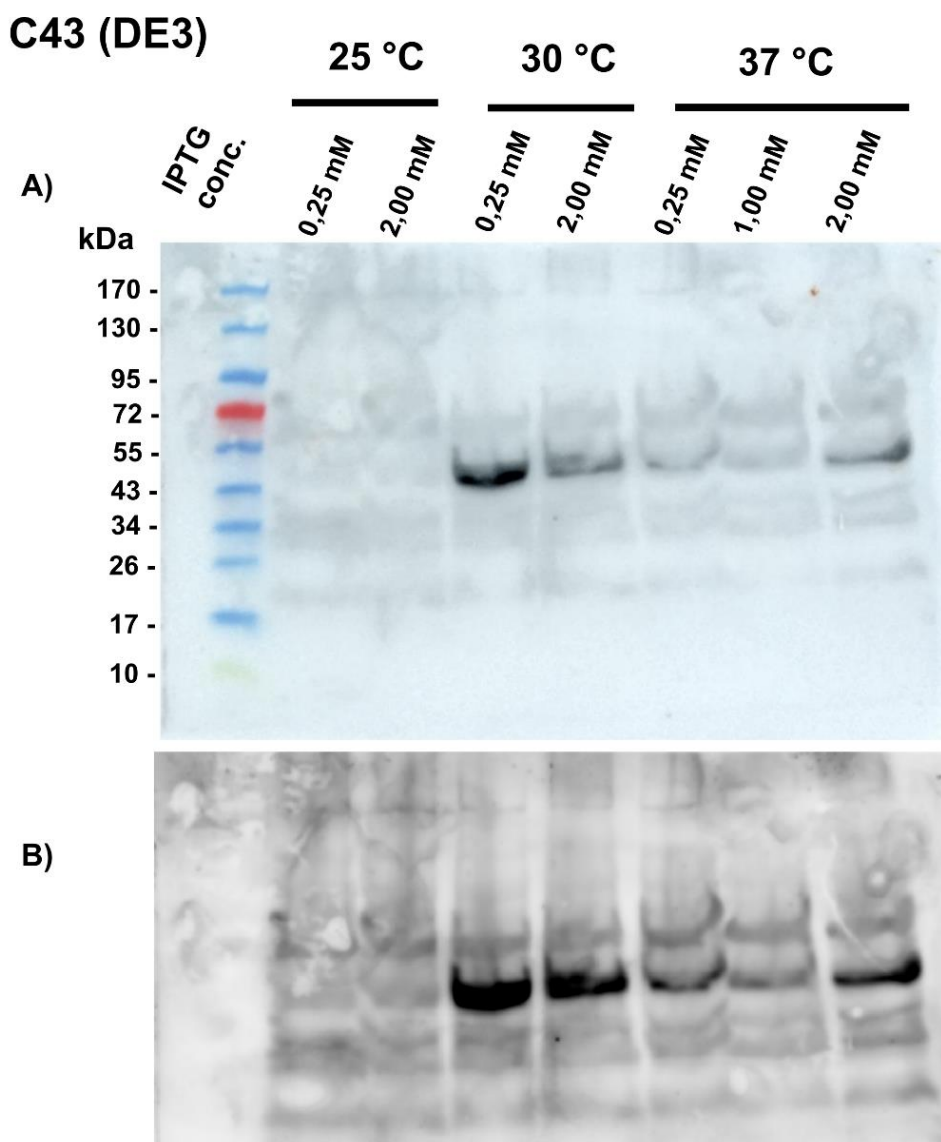


Figure 3.25 : Surexpression de WzpB (porine en tonneau bêta) par la souche C43 (DE3) à différentes températures et concentrations d'IPTG. A) Expression de WzpB par C43 selon la température et la concentration d'IPTG. Deux conditions ressortent avec la meilleure production : 30 °C et 0,25 mM d'IPTG et 37 °C et 2,00 mM d'IPTG, avec des bandes $\approx$ 44 kDa (poids attendu). Des bandes supplémentaires à des poids variés sont également observées, suggérant des espèces protéiques liées à la porine ou une dégradation partielle de WzpB. B) Quantification de l'intensité des bandes de surexpression, mesurée en incréments de signal (exposition 2 min).

3.4.3 Fractionnement des cultures et détermination de la solubilité de WzpB produite

Les cultures sous les deux conditions (30 °C et 0,25 mM d'IPTG) et (37 °C et 2,00 mM d'IPTG) ont été récoltées et fractionnées selon la méthode décrite (2.4.5 Le fractionnement des cultures et détermination

de la solubilité de la WzpB). Les fractions obtenues ont été déposées et séparées par SDS-PAGE, puis le immunobuvardage. (figures 3.26-27).

Les résultats obtenus montrent une absence globale de protéine soluble dans les deux conditions, mais des traces de protéine soluble ont été détectées à 30 °C et 0,25 mM d'IPTG après accumulation du signal en incrément (figure 3.26 B). La quantité soluble, qui peut être obtenue, n'est pas suffisante pour poursuivre une élucidation structurale par cristallographie aux rayons X.

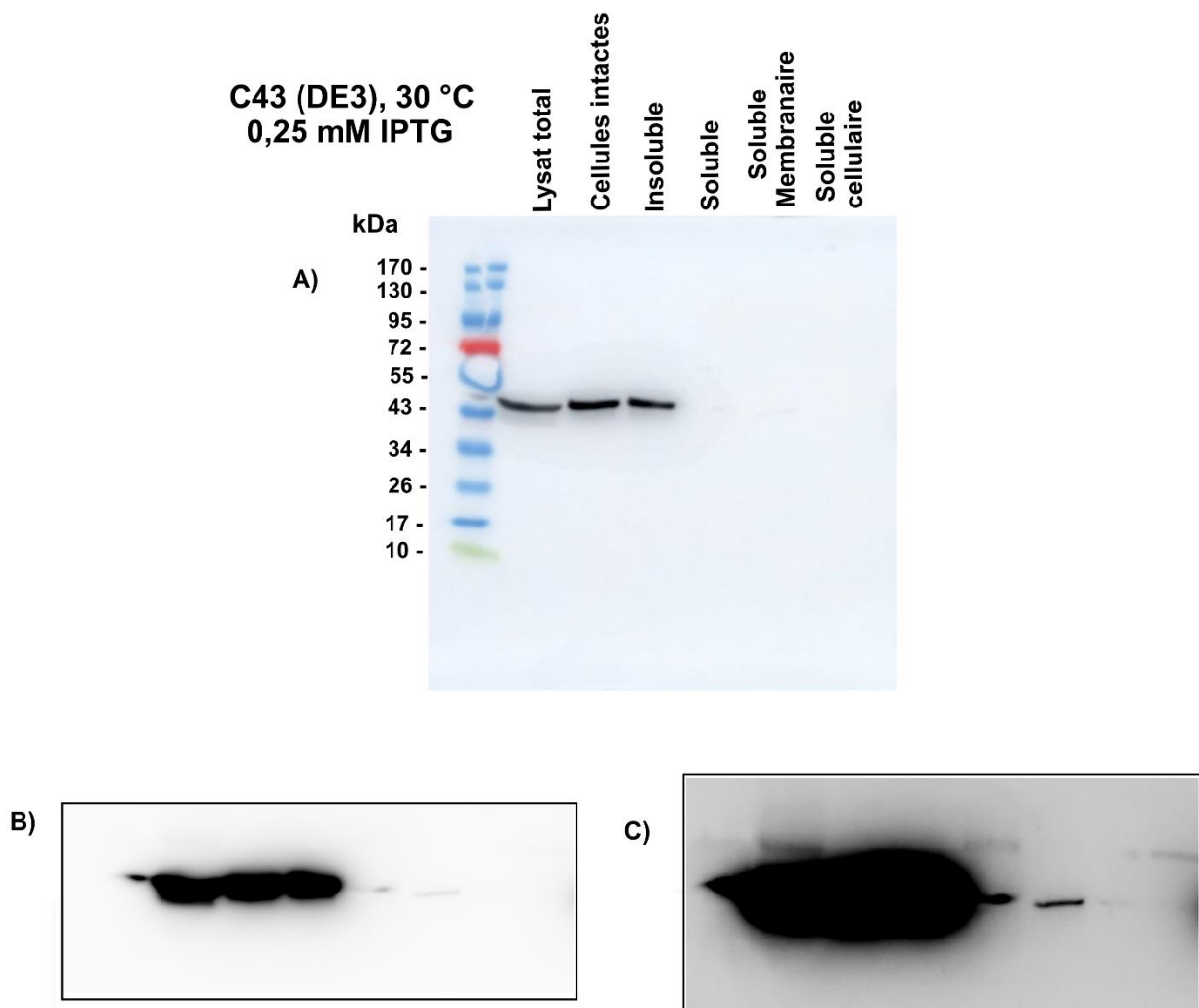


Figure 3.26 : Fractionnement de la culture de C43 (DE3) à 30 °C et 0,25 mM IPTG. A) Répartition de WzpB (la porine en tonneau bêta) dans les différentes fractions, la protéine est détectée dans les fractions de lysat total, de cellules intactes (non-lysées après sonication) et l'insoluble, indiquant une prédominance dans l'insoluble. En revanche, des traces de WzpB sont présentes dans la fraction soluble, plus précisément

dans la fraction soluble membranaire (culot d'ultracentrifugation). Les bandes ≈ 44 kDa correspondent à WzpB. Des bandes entre 60-65 kDa sont observées dans la fraction soluble, suggérant des espèces protéiques co-produites. B) Quantification de l'intensité des bandes de surexpression, mesurée en incréments de signal (exposition 2 min). C) Intensité rehaussée avec imageJ pour visualiser les bandes faiblement détectables.

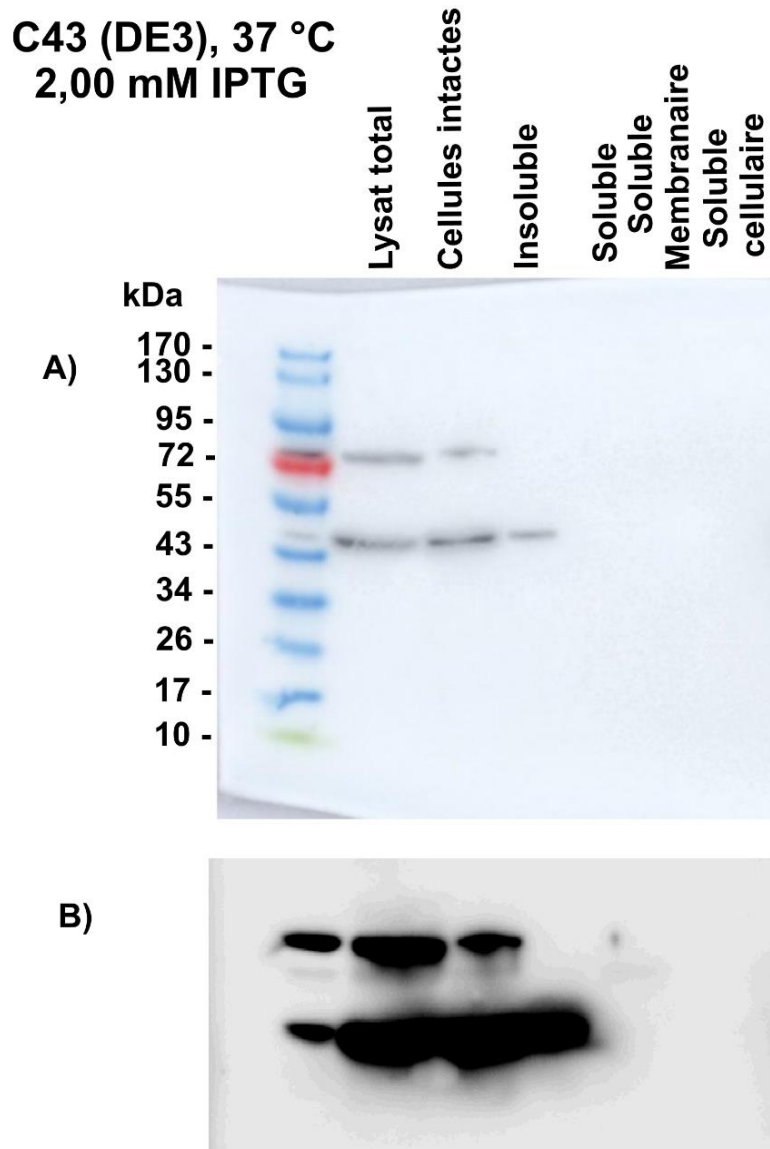


Figure 3.27 : Fractionnement de la culture de C43 (DE3) à 37 °C et 2,00 mM IPTG. A) Répartition de WzpB (porine en tonneau bêta) dans les différentes fractions, La protéine est détectée aux fractions de lysat total, de cellules intactes (non-lysées après sonication) et de l'insoluble, indiquant une prédominance dans l'insoluble. En revanche, WzpB n'est pas détectée dans la fraction soluble, qu'elle soit membranaire ou cytosolique. les bandes ≈ 44 kDa correspondent à WzpB. Des bandes ≈ 74 kDa sont observées dans la fraction de lysat total et de cellules intactes, suggérant des espèces protéiques co-produites. B) Quantification de l'intensité des bandes de surexpression, mesurée en incréments de signal (exposition 2 min).

3.5 Les transformations de *Myxococcus xanthus* et les tests phénotypiques

Les transformations réalisées visaient la complémentation des gènes *mxan_1915* (codant WzaB, OPX) et *mxan_1916* (codant WzpB, porine en tonneau bêta). Les deux gènes ont été insérés dans des vecteurs pSWU19 avec de différents marqueurs et promoteurs. Le marqueur de 2×Flag pour WzaB (OPX) et STREPII pour WzpB (porine). Trois promoteurs ont été utilisés aussi, pPilA, Mx0530 et J23104. Après sélection de clones candidats et grâce à l'étudiant Abdelkader Mellouk, la vérification par PCR de ces clones a été effectuée dans le cadre de son projet. Ceci a permis d'effectuer les tests phénotypiques, qui ont porté sur la motilité A (aventurière) et la motilité S (sociale). La figure 3.28 montre la motilité A pour les souches de Type sauvage (WT), $\Delta mxan_1915$ (WzaB – OPX) et $\Delta mxan_1916$ (WzpB – porine), ainsi que leurs souches complémentées correspondantes. De façon générale, l'absence de BPS n'a pas d'effet direct sur la motilité A, toutes les souches présentent un profil normal pour ce test.

En revanche, la motilité S (sociale) (figure 3.29) montre des défauts et des altérations par rapport au phénotype WT. La complémentation de WzaB (*mxan_1915*) dans la souche de délétion, avec les différents promoteurs, rétablit un niveau de motilité S proche du WT à partir du promoteur de force moyenne Mx0530 (le meilleur). La complémentation de WzpB (*mxan_1916*) montre une réduction des dimensions du front de corps fructifères lorsque la force du promoteur augmente, avec une récupération progressive en parallèle avec la force de promoteur jusqu'au promoteur à force moyenne. Ces observations pourraient suggérer que le BPS est présent dans le périplasme et attend le signal ou la production de WzpB (porine) pour être sécrété, alors la surexpression cellulaire de WzpB conduit à sursécrétion du BPS. En revanche, un surplus de WzaB (OPX) ne suffit pas à assurer cette étape finale de sécrétion.

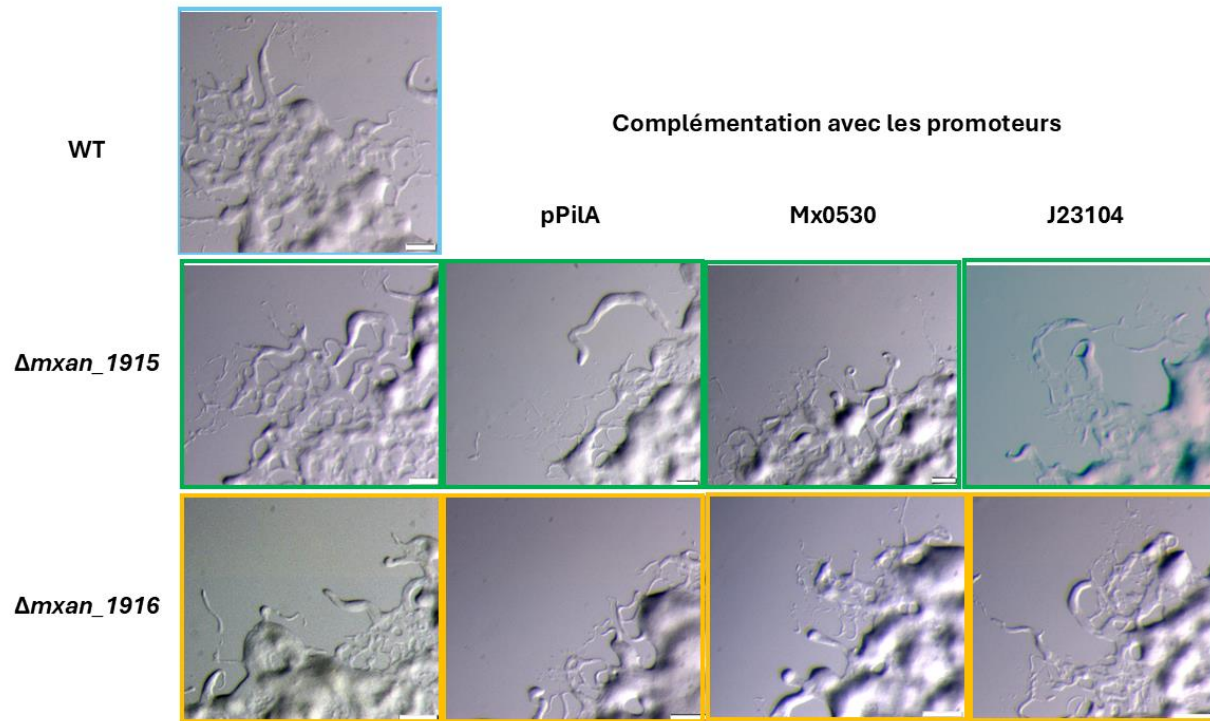


Figure 3.28 : Phénotypes de motilité A (aventurière) des souches type sauvage (WT), $\Delta mxan_{1915}$ et $\Delta mxan_{1916}$ et de leurs souches complémentées avec divers promoteurs. La première colonne présente, de haut à bas, les souches WT, $\Delta mxan_{1915}$ ($\Delta wzaB$ - OPX) et $\Delta mxan_{1916}$ ($\Delta wzpB$ – porine). Les lignes suivantes montrent les souches complémentées avec des promoteurs d'expression croissante (PilA, Mx0530 et J23104 dans cet ordre). De manière générale, la délétion et l'absence de BPS n'affectent pas la motilité aventurière de cellules (Islam et al., 2020) (l'échelle de mesure est 50 μm).

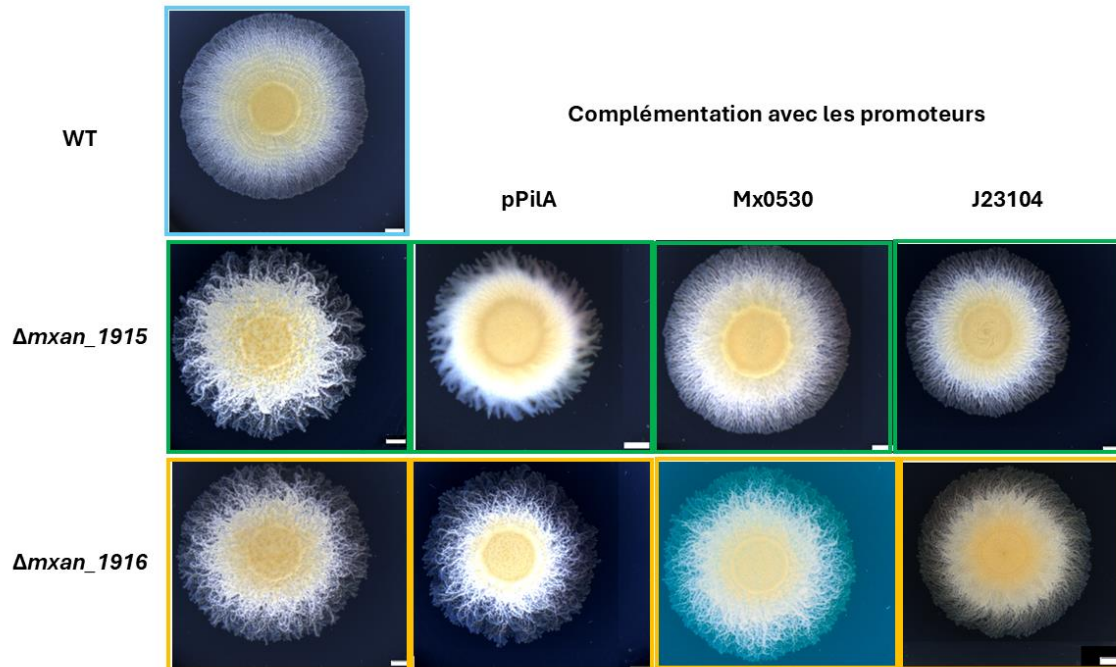


Figure 3.29 : Phénotypes de motilité S (Sociale) dans des souches type sauvage (WT), $\Delta mxan_{1915}$ et $\Delta mxan_{1916}$ et de leurs souches complémentées par divers promoteurs. La première colonne présente, de haut à bas, les souches WT, $\Delta mxan_{1915}$ ($\Delta wzaB$ - OPX) et $\Delta mxan_{1916}$ ($\Delta wzpB$ – porine). Les lignes suivantes montrent les souches complémentées avec des promoteurs d'expression croissante (PilA, Mx0530 et J23104 dans cet ordre), la complémentation est inefficace avec le promoteur le plus faible (pPilA), mais devient efficace avec les deux autres promoteurs. Le phénotype est restauré progressivement en fonction de la force du promoteur, jusqu'à un niveau WT avec le plus fort promoteur pJ23104. De manière générale, la délétion et l'absence de BPS affectent profondément la motilité sociale de cellules (Islam et al., 2020) (l'échelle de mesure est 2 mm).

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Dans ce chapitre, une révision des résultats obtenus et leurs indications. Avec l'élucidation des meilleures formations d'interactions entre les WzaB (OPX) et WzpB (porine en tonneau bêta). Cela est en vue des simulations et des prédictions obtenues informatiquement pour ces complexes et par mettre en examen le mécanisme d'interaction suggérée contre les mécanismes classiques. En plus, les résultats de surexpression qui ne se sont pas suivis en raison du rendement faible de WzpB produite.

Les effets et les fonctions de WzaB et WzpB, qui ont été examinés par des tests phénotypiques en présence et en absence (délétion et complémentation), ont été discutés afin d'établir les fonctions de ces protéines.

4.1 Approche virtuelle de l'élucidation des structures et des interactions entre WzaB (OPX) et WzpB (porine)

Il est évident que la présence ou l'absence du BPS a un effet direct sur la capacité de *M. xanthus* à accomplir ses fonctions biologiques, notamment la motilité sociale. La délétion de la porine en tonneau bêta WzpB se traduit par l'absence des effets du BPS, d'une manière semblable à celle causée par l'absence de WzaB (OPX) ou Wzc (PCP) (figure 3.29).

La formation du complexe de WzaB (OPX) et ses interactions avec la porine en tonneau bêta déterminent la structure du canal, qui apparaît partiel dès trois protomères de WzaB associés à un WzpB (figure 3.6). En revanche, le canal formé par WzaB seuls ne se constitue qu'à partir de sept protomères WzaB (figure 3.10), et six protomères WzaB en présence de WzpB. Cela souligne l'importance de WzpB (porine) pour la formation du canal sécrétoire. Il est à noter que le complexe formé d'un protomère WzaB et d'un WzpB maintient la porine fermée, toutefois, étant donné que les forces d'interactions entre les WzaB sont plus fortes que celles entre WzaB et WzpB, cette fermeture pourrait être levée en présence d'un nombre suffisant de protomères WzaB. Ces résultats sont en accord avec les analyses des interactions des complexes, plus précisément, les énergies d'interaction entre WzaB seuls. La formation à huit protomères présente l'énergie la plus favorable (ΔG plus négative), indiquant une stabilité élevée (tableau 3.1), suivie par sept protomères, puis quatre et trois. Cela suggère que les complexes fonctionnels à l'égard de la formation du canal et les plus stables sont ceux de huit/sept protomères WzaB, tandis que les complexes de quatre/trois protomères pourraient correspondre à des états inactifs. Par ailleurs, la présence du

polysaccharide BPS et l'interaction avec WzcB (PCP), qui pourraient augmenter fortement les interactions entre les protomères WzaB (tableaux 3.3 et 3.4), peuvent favoriser la formation de structure octamérique ou/et heptamérique de WzaB. La répartition des charges a rôle primordial à la formation des complexes de WzaB (OPX), en présence ou en absence de WzpB (porine). La répartition de charge tend à se concentrer vers les extrémités des domaines poly_Export (au cas de présence de WzpB) et des domaines poly_export et SLBB (en absence de WzpB) (figures 3.4-10, panneaux B et D). Ainsi, la formation de ces complexes accumule des charges positives aux bords des protomères, là où s'initient les premières interactions avec BPS. Dans les complexes contenant WzpB (porine), une accumulation de charge positive est également observée sur son ouverture externe. Parallèlement, le cœur du complexe devient plus neutre et hydrophobe (figure 3.4-10, panneaux B et D).

Ce paysage électrostatique est cohérent avec un mécanisme dans lequel des forces d'attraction sur le BPS (charges positives aux bords de WzaB/WzpB) favorisent l'entrée du BPS dans le canal, puis des interactions hydrophobes et la neutralité du cœur facilitent sa progression et sa propulsion vers l'extérieur, tandis que les charges positives à l'extrémité externe de WzpB (porine) favorisent la sortie de BPS. De plus l'alignement spiral des résidus polaires aussi peut contribuer au mécanisme de sécrétion, en s'orientant de manière dirigée vers le lumen des complexes octamérique et/ou heptamérique, formant de pistes chargées (positivement) pour le passage du BPS (figure 4.1 A). Parmi ces résidus polaires à organisation spirale au sein de WzaB (OPX), on relève : acide glutamique 36, 42, 44 et 98 (polaires négatifs), arginine 38 et 97 et lysine 103, 112 et 136 (polaires positifs). Au sein de WzpB (porine en tonneau bêta), on note les résidus polaires suivants qui peuvent participer dans la charge nette et les interactions avec BPS : arginine 67, 111, 155, 212 et 318, lysine 216 (polaires positifs), acide glutamique 121 et 354 et acide aspartique 107 et 115 (polaires négatifs). Les diagrammes de PAE indiquent que, pour les complexes à huit protomères WzaB, sans ou avec WzpB, la stabilité observée renforce l'idée que cet assemblage constitue le candidat le plus favorable parmi les autres complexes (figures 3.12-19). Ces facteurs, l'alignement et la répartition des charges et la formation du complexe, soutiennent un mode de sécrétion du BPS.

Au-delà de neuf protomères WzaB, et en particulier les bords des protomères WzaB (OPX) formant le canal et interagissant avec l'ouverture périplasmique de WzpB (porine), l'alignement optimal se perd entre ces deux ouvertures. (figure 4.1 B).

Étant donné que WzpB est une protéine intégrale dans la membrane externe, et qu'elle présente une homologie avec PgaA (porine en tonneau bêta impliquée dans la sécrétion dépendante de la voie synthase-dépendante du polysaccharide PNAG) (Saïdi, Mahanta, *et al.*, 2022), l'orientation observée des WzaB en interaction avec la porine WzpB est cohérente avec ce positionnement membranaire.

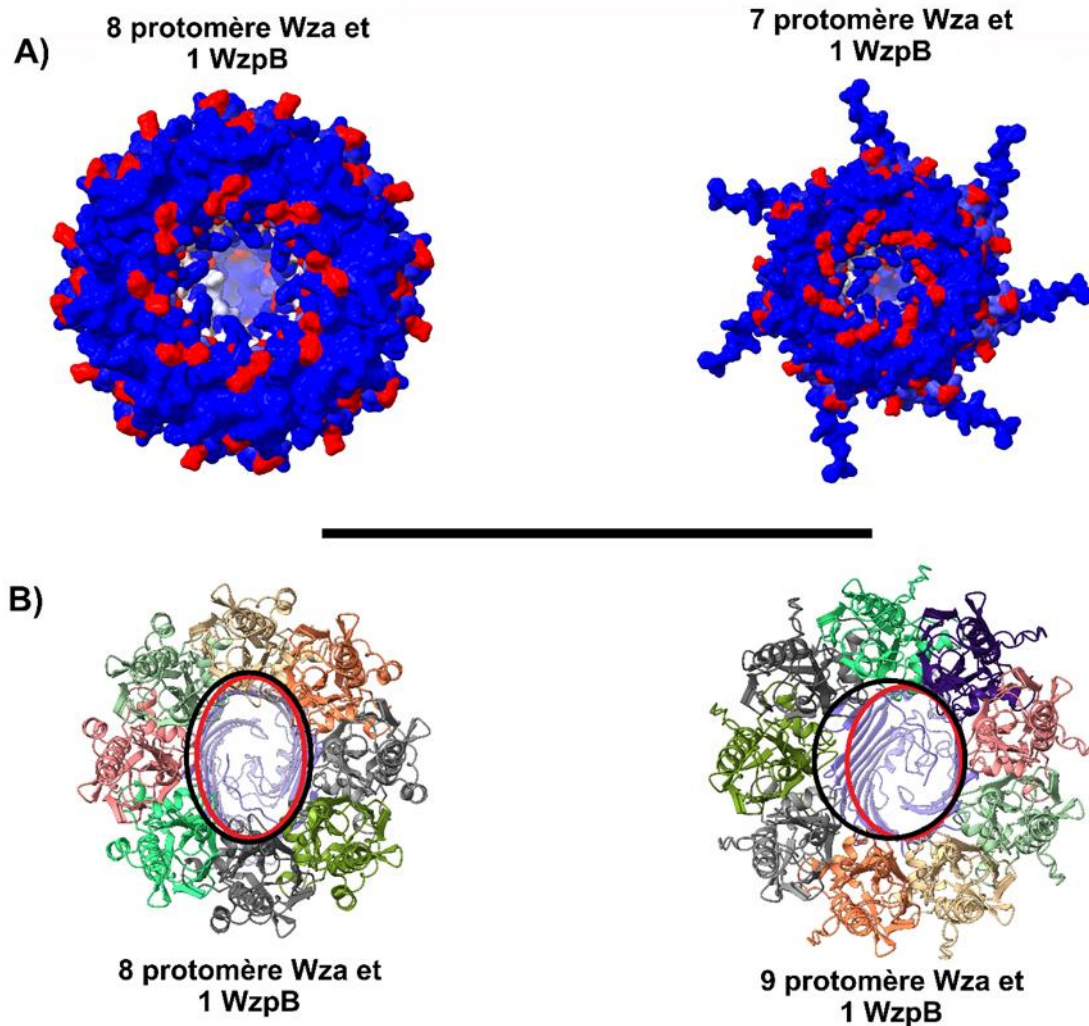


Figure 4.1 : L'alignement des résidus polaires dans un complexe de sept et de huit protomères WzaB (OPX) et d'un WzpB et la circonférence du canal entre les bords du canal de WzaB et l'ouverture périplasmique de WzpB. A) les résidus chargés positivement s'alignent en spirale dans le lumen du canal formé par WzaB, à gauche le complexe de huit WzaB et d'un WzpB et à droite de sept WzaB et d'un WzpB. B) l'alignement entre l'ouverture périplasmique de WzpB (cercle rouge) et le bord du canal formé (cercle noir) par huit protomères WzaB (à gauche) et neuf protomères WzaB (à droite).

Synthèse : La sécrétion du BPS a lieu via un complexe formé de protomères de WzaB (OPX) (octamère ou heptamère) associé à la porine WzpB. Dans son état au repos, la porine peut être maintenue fermée par un à deux protomères WzaB, et WzaB peut également se regrouper en trimères ou tétramères. L'activation survient par l'interaction de WzaB avec la porine, ce qui lève la fermeture et forme un canal de sept ou de huit protomères WzaB (plus favorable), ainsi que par l'interaction avec la PCP (WzcB) et en présence du BPS. La répartition des charges et la formation d'un cœur neutre contribuent également à l'interaction et à la sécrétion, des zones positives attirent le BPS chargé négativement. La sécrétion dépend en outre de la nature hydrophobe du cœur du canal, façonné par le complexe des WzaB et de WzpB, qui facilite la progression du BPS à travers du canal.

4.2 La surexpression de WzpB (porine)

Malgré l'optimisation mise en place pour la surexpression de WzpB, la protéine s'est révélée insoluble et difficile à extraire pour mener les étapes d'élucidation structurale par cristallographie aux rayons X. Cette insolubilité peut être attribuée à plusieurs facteurs. Premièrement, la toxicité de la protéine, résultant d'un déséquilibre au sein de la membrane externe des souches d'expression ou d'un mauvais repliement de la protéine (Bannwarth et Schulz, 2003). En général, WzpB exprimée se trouve dans les fractions insolubles, signe d'un repliement incorrect. Il existe toutefois des stratégies de récupération et de repliement des protéines exprimées insolubles.

Par ailleurs, les bandes contaminantes observées sur les gels peuvent être dues à un attachement avec des chaperons, tels que HdeA, HdeB qui sont des chaperons de stress (leurs poids moléculaires ≈ 10 kDa) (Stull *et al.*, 2018) (figures 3.22-24), ou le chaperon Skp (son poids moléculaire ≈ 17 kDa) qui convoie les protéines en tonneau bêta dans le périplasme pour le repliement vers le système BAM (Plummer et Fleming, 2016) (figure 3.26-27).

Synthèse : Des difficultés ont été rencontrées lors de la surexpression de WzpB (porine), suggérant une toxicité à surmonter et un mauvais repliement. Néanmoins, les conditions appliquées avec la souche C43 (DE3) (30 °C et 0,25 mM d'IPTG) (figure 3.26) indiquent que de faibles niveaux d'expression peuvent fournir des quantités suffisantes pour des tests d'interaction entre WzpB et WzaB, tel que le test de MST (microScale thermophoresis).

4.3 Effets de la délétion et de la complémentation sur les phénotypes de *Myxococcus xanthus*

L'absence de WzpB (porine) ou de WzaB (OPX) a un effet direct sur la motilité sociale, l'absence de BPS perturbe la formation des essaims vers le milieu environnant. À l'inverse, la souche de type sauvage WT présente une homogénéité marquée dans la formation des essaims, cette homogénéité est absente chez les souches de délétion de WzaB ou WzpB. La récupération de ces deux protéines par complémentation réalisée par la réinsertion de leurs gènes dans le génome de *M. xanthus* montre un retour graduel de l'homogénéité, proportionnel à la force du promoteur utilisé. Le promoteur le plus fort a été associé avec de diminution de dimensions de corps fructifères, cela peut indiquer que l'expression excessive peut affecter l'équilibre cellulaire et que les taux d'expression de WzaB et WzpB sont sous contrôle (figure 3.29).

Synthèse : WzpB est essentielle au mécanisme de sécrétion du BPS, son absence entraîne une perte de l'homogénéité du phénotype de motilité sociale du WT, de manière semblable de la perte des autres protéines dans cette voie.

CONCLUSION

Cette étude renforce l'évidence de l'importance et de la primordialité de la classe de protéines en tonneau bêta dans la voie Wzx/Wzy-dépendante (Saïdi, Mahanta, *et al.*, 2022) et s'inscrit comme un suivi de recherche ciblé sur cette thématique. Malgré les obstacles rencontrés au cours du projet, l'accent est mis sur les axes suivants :

La surexpression de la porine en tonneau bêta WzpB : Poursuivre la surexpression de WzpB, en explorant d'autres stratégies d'expression (protocoles de repliement, variations d'induction, autres systèmes de surexpression), tout en valorisant les quantités obtenues de WzpB pour des tests faisables tel que la MST avec l'OPX (wzaB). En parallèle, envisager l'expression dans l'hôte natif, *M. xanthus*.

Mutagenèse ciblée des résidus polaires : réaliser des mutations ponctuelles au sein de WzaB (OPX) et de WzpB sur les résidus polaires formant la trajectoire en spirale dans le lumen du canal de leur complexe, afin d'évaluer leur contribution au mécanisme de sécrétion.

Approches computationnelles étendues : Intégrer davantage de méthodes bioinformatiques pour élucider la structure et la stabilité des protéines et leurs complexes. Ces méthodes incluent la simulation de dynamiques moléculaires (MD), l'interaction (docking) avec le substrat BPS, la simulation de l'environnement membranaire réaliste pour les protéines intégrales, un travail préliminaire a déjà été engagé par simulation (França *et al.*, 2024).

Complexité de la voie Wzx/Wzy-dépendante et co-régulation des polysaccharides : Le mécanisme de sécrétion par la voie Wzx/Wzy-dépendante est complexe et implique plusieurs facteurs. Chez *M. xanthus*, trois polysaccharides sont sécrétés via cette voie, l'un d'eux (EPS) fonctionne en synergie avec BPS. Ainsi, la régulation et le fonctionnement de ces deux polysaccharides sont interchangeables et interrelationnels.

Les polysaccharides demeurent des biomolécules incontournables pour la compréhension de la vie bactérienne au niveau biochimique.

ANNEXE A
Les souches utilisées

Code de souche	Nom de souche	Génotype	Source ou référence
DZ2	<i>Myxococcus xanthus</i> (type sauvage)	-	Campos et Zusman, 1975
TM529	DZ2 $\Delta WzaB$	$\Delta mxan_1915$	Ducret et al., 2012
EM588	DZ2 $\Delta WzcB$	$\Delta mxan_1025$	Islam et al., 2020
SI104	DZ2 $\Delta WzpB$	$\Delta mxan_1916$	Construite au laboratoire
SI110	DZ2 $\Delta WzpB$ <i>attP::pSWU19-wzpB</i> (P_{pilA} <i>wzpB</i>), Km ^R	DZ2 (P_{pilA} - <i>mxan_1916</i> -StreptII)	Construite au laboratoire
SI111	DZ2 $\Delta WzaB$ <i>attP::pSWU19-wzaB</i> (P_{pilA} <i>wzaB</i>), Km ^R	DZ2 (P_{pilA} - <i>mxan_1915</i> -2×flag)	Construite au laboratoire
SI115	DZ2 $\Delta WzpB$ <i>attP::pSWU19-wzpB</i> (P_{mx0350} <i>wzpB</i>), Km ^R	DZ2 (P_{mx0350} - <i>mxan_1916</i> -StreptII)	Construite au laboratoire

SI116	DZ2 ΔWzaB <i>attP::pSWU19-wzaB</i> (<i>P_{mx0350} wzaB</i>), Km ^R	DZ2 (<i>P_{mx0350} -mxan_1915-2×flag</i>)	Construite au laboratoire
SI118	DZ2 ΔWzpB <i>attP::pSWU19-wzpB</i> (<i>P_{j23104} wzpB</i>), Km ^R	DZ2 (<i>P_{j23104} -mxan_1916-StrepII</i>)	Construite au laboratoire
SI119	DZ2 ΔWzaB <i>attP::pSWU19-wzaB</i> (<i>P_{j23104} wzaB</i>), Km ^R	DZ2 (<i>P_{j23104} - mxan_1915-2×flag</i>)	Construite au laboratoire
DH5α	Escherichia coli (souche de clonage)	F ⁻ φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>phoA supE44 λ⁻thi-1 gyrA96 relA1</i>	Stockage de laboratoire
BL21 (DE3)	Escherichia coli (souche d'expression)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm]</i> <i>ΔhsdS</i> <i>λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B</i> <i>int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21</i> <i>Δnin5</i>	Stockage de laboratoire
Overexpress C43 (DE3)	Escherichia coli (souche d'expression)	F – <i>ompT hsdSB (rB- mB-)</i> gal dcm (DE3)	Stockage de laboratoire
Overexpress C41 (DE3)	Escherichia coli (souche d'expression)	F – <i>ompT hsdSB (rB- mB-)</i> gal dcm (DE3)	Stockage de laboratoire
BL21 STAR (DE3)	Escherichia coli (souche d'expression)	F- <i>ompT hsdSB (rB-mB-)</i> gal dcm rne131	Stockage de laboratoire

		(DE3)	
BL21 pLysE (DE3)	Escherichia coli (souche d'expression)	$F^- ompT hsdSB (r_B^-, m_B^-) gal dcm$ (DE3) pLysE(CamR)	Stockage de laboratoire

ANNEXE B

La séquence de vecteur pet20(b)+::mxan_1916

(Le gène *mxan_1916* est en gris)

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTA
CACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCCGTCA
AGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTGATTAGG
GTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAAT
AGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTATAAGGGATTTTGCCG
ATTCGCGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAAATTTAACGTTTAC
AATTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTA
TCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCC
GTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAG
ATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTT
TTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGAC
GCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCACTCACAGAAA
AGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCA
ACTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACCTCG
CCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAAT
GGCAACAACGTTGCGCAAATTAATACTGGCGAACTACTTACTTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACTGGATG
GAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGTGGTTATTGCTGATAAATCTGGAG
CCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTA
CACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCA
TTGGTAACGTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTA
GGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCG
TAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCG
CTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGC
AGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATAC
CTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCACTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGAC
GATAGTTACCGGATAAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGAGAGCGAACG
ACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGAC
AGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCT
TTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTAT
GGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGTTTCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGT
TATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACCCGAACGACCGA
GCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTAT
TTCACACCGCATATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTA
TCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGC
TCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGTTTTTACCGTCATCACC
GAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAGCGATTACAGATGTCTGCCTGTTTCATC
CGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCAGAAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTT
TTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAGGGGGATTTCTGTTTCATGGGGTAATGATACCGATGAAACGAG
AGAGGATGCTCACGATACGGGTTACTGATGATGAACATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGG
CGGTATGGATGCGGCGGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTG
TTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTC

CAGACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTTCATGTTGTTGCTCAGGTCGCAGACGTTTTGCAGCAGCAGTCG
CTTCACGTTTCGCTCGCGTATCGGTGATTCAATTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTAGCCGGGTCTCAA
CGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGCCAGGACCCAACGCTGCCCCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATA
CGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGTAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATAT
GAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCCAGCCGGCGATGGCCATGGCCCATCAT
CATCATCACCATCACCATGAAAACCTGTATTTTCAGGGAGGTCAGGGCATCGCGACGCCTCCCACCGGGGGTAACG
GCTTCAAGGTGGGTAACGGGCGGCTGCACCCCTACTTCGACCTGGAGACGCGGCTGGACAGCGGCGTGGGCTACT
TCTCGCCACCTCCAACCTCGGAGCCCAACAGCGACCCGGTATCGGCCAACCTGGCGAGCGACGTGGCGCTGCGCTT
CCGCCCTGGCTTCCGGCTGGAGATTCCGTCTCCACGCTGGCGTTCAACCTGGGCGCCAACCTGGACTACGTGTTG
TACACGGGCGTGGTGACGAAGAACTCCAGCGCGGCCTCGCGCATGGAGGGCGCGGCGGACCTCAACGCGCGCTT
CAACCCGGACGCTCCGCTGACGCTGGAGGTGTCGAACAGTTTCGCGCGCTCGGACCGCACGCGCACCGCGGCCGT
GGGCGTGGGCGTGCTCAGCCTCTTCAATGAAGCGCGCGCAAGGCCCGTGGCGCCCCGGCGGCGGCGCGCTGG
AGCTGACGCCCAGCGTGGCCTACGCGGTGGAGTTCTTCAGCCGCTGAGCTCGGTGAGCCCCGTGGCTGCACCG
AAAGCGTGTCGACCCGGCCGCGTGGAGCGCTTCGACTACGGCAACCTGCGAGTGGGCGCGGAAGGCCGCTGG
CGCTTCCTGCCGAAGACGGCGGTGGTGCTCGACCCACCTGGACGTGCGCAGCTACTTCAACGACAGCACGCCG
GGCGCCTCGCTACTGCGCGTCATCGGCGGCGTGGCGGGCCTCGTGTCCCCCAAGGTGGCCGTACAGGCCAAGGCG
GGCTGGGGCCAGAACTTCGGCAGCACCGGCGGCGGCACCTTCCTGGGGCAGTTGGAGGGCACCTACCTCTACAGC
CCCACCCTGAGCTTCAAGGCGGGCTACCTGCGCACCTGGAGCCCGTGGCCGCCTACGGCTTCTTACGGACAACC
GGGGCTACGGCGAGGTGCGCGCCCTCTTCGGCGGCAAGCTGACGGTGTCCGGCGGGCTCGCCGTGGACTTCTGC
GCTTCGACGGCGGCCGGAATGACACCGTCGTCGGCGTGAATATCGGCCCGGAGTACCAGTTCTACCCGTGGCTGA
CGGGCGCTGCAGGCTACATGCTGGGTGCGCGCTCCTCCTCGGTGGATGGCGGCGGCCTCAACTACTCGCGGCACG
AGGGGTACGCCCCCTCTCCGTGACGTACTGAGCTGCTAACAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCA
CCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTGTGAAAGGAGGAAC
TATATCCGGAT

ANNEXE C

Résultat su séquençage obtenu pour pet20(b)+::mxan_1916

La partie incluant le gène mxan_1916:

GAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCATGGCCCATCATC
ATCATCACCATCACCATGAAAACCTGTATTTTCAGGGAGGTGAGGGCATCGCGACGCCTCCACCGGGGGTAACGG
CTTCAAGGTGGGTAACGGGCGGCTGCACCCCTACTTCGACCTGGAGACGCGGCTGGACAGCGGCGTGGGCTACTT
CTCGCCACCTCCAACCTCGGAGCCCAACAGCGACCCGGTATCGGCCAACCTGGCGAGCGACGTGGCGCTGCGCTTC
CGCCCTGGCTTCCGGCTGGAGATTCCGTCGTCCACGCTGGCGTTCAACCTGGGCGCCAACCTGGACTACGTGTTGT
ACACGGGCCTGGTGACGAAGAACTCCAGCGCGGCCTCGCGCATGGAGGGCGCGGCGGACCTCAACGCGCGCTTC
AACCCGACGCTCCGCTGACGCTGGAGGTGTCGAACAGTTCGCGCGCTCGGACCGCACGCGCACCGCGGCCGTG
GGCGTGGGCGTGCTCAGCCTCTCAATGAAGCGCGCGGAAGGCCCGTGCGCCCCGGCGGCGGCGCGCTGGA
GCTGACGCCCAGCGTGGCCTACGCGGTGGAGTTCTTCCAGCCGCTGAGCTCGGTGAGCCCCGTGGGCTGCACCGA
AAGCGTGTCGACCCGGCCGCCGTGGAGCGCTTCTACTACGGCAACCTGCGAGTGGGCGCGGAAGGCCGCTGGC
GCTTCCTGCCGAAGACGGCGGTGGTGTCTGACCACTTACGCTGCGCAGCTACTTCAACGACAGCACGCCGGG
CGCCTCCCTACTGCGCGTTATCGGCGGCGTGGCGGGCTTCTGTCCCAAGGTGGCCGTCACGGCCAAGCTGGTTTG
GGCCAACTTTGGCAGCCCTGGGGGGGCACCTTTCTGGGCAATTGGAGGGACCTGCTTCTAAGTCCACCTTAACC
TTAAGGTGGCGTCTTGCGCCCCGTAGTCGTTGGCCACTCAAGTTATTCTGAAAAACGGGGGTTCGGCTAGTGTGAC
TCTCTTTTCTGTAATGTGAAGATGTTTCGGGTGTTCTCTGGAATTTGTGACTCGCTGCGCCAGAATGATGCTAGATG
GGGTCTTAAAGCCTGTAACCATTCACCTTGGCGACGGTCACACGTGACGTGTGGGCCCCGCCCCACGGGAGGGTG
GTCATATTGCCTCGGTGGAAGACGCCCCCGTACGTGGCATCTAAGTCGGAGGATGTCTATCACTAGCTGACGATG
AACATCCGGGTTCTAATGTTGTGTTTCTGATAACACTCGTGTGAGGTCACTATTGCACTGCTGTTGTGTCGATTGTCT
GTGACGACACTTTATTCGTTTATATTACGATCGTGGAGATGCATGCTCCAAGAATTGATACTNTCCCTCTCATGTATC
ATC

ANNEXE D

Les séquences des vecteurs pSWU19 avec les gènes de complémentation du *mxan_1915* et du *mxan_1916*

Les séquences mises-ci sont de vecteurs pSWU19 avec les gènes *mxan_1915* et *mxan_1916* avec le promoteur pPilA, pour les autres deux promoteurs (voir tableau 2.6)

<i>pSWU19-wzaB</i> :	MXAN_1915 - Marqueur de 2xflag - promoteur Pila
GACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGGTGTCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCG ATAGCGGAGTGTATATACTGGCTTAACATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGCACCATATGCGGTG TGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTCCGTTCTCTCGTCACTGACTCGCT GCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAG GGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGC TGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAC CCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCG CTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCA GTTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTAT CCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGG ATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAA GGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGC AAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCA AGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCAT GAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTGGGATGCGGTGGACCATGAGCGGGAAGCGGTGCGGGA GCGTATCGGGGCTATCTTCGGGCGGACGGGTAGTGCTGCGCGGCTTTCGCGACATGGAGGACTCCTCTGGCTG GGTGGGTGACGCTGACTGCGGGTGAGACTCAGGTAGCGGAAGGGCTCTCGCCGTCCGCCACGGCGCGGCAG GCCGGGCAGTCGGACCATCGGTCATCGGCGGCATGGGTGCGGTGCAGGGCGGCCGCAAGCCGCTCCAGGGCC ATCAGGGAGGCGTCCACGAGTTGGGACGCCAGCACCTTGCGCTCACGTCCGGCGCCGGAAGTTGAGGACCCCCA TCTGCTGACGCACCACGGCAAGCGGATGGGGCGCTGTACGGGCTTGTCAGTCAACTGCGCCAGTCCGTGC CAGTTTGGCGGACTCCGCGTCTAAGCCCTCAGATTTTGTGGCAACTGGCGCGGATTGGCGTAGAAGGAGCCCA GGAGTACGGGTTCAAGTCCCGTACTCCTCGCCACCCCTGCCCAGCAAGTTCTCGGACTTGCTGGGGTTTTTCTT TTCCAGCGTCCGCTGTCACACCGCTGTCACAGCTTGGCACTCGGCAGGCCATGGTTTCTCCTCCTGCTTGGGCA GTTTCGAGCTTCAACTTCGCCACTTCCCTACAGAGCGCATCCACGGCGGCGTCTGTAGGCGTCGACCATGTGCG GAGCGCTGCCGTGGGTGACCCACTGGAGTAGGTATTTGTGCGCACCGTCGGCACGAGCCAGGCTGATGAACG TCCGGCGAGCATCGTGAGTCCGTCTCCGCTGAACCCAGGAGGTCCAGGTGCGCATGCAGGCGACGGAGGAC TCCCTGGGGCCGCTGGTGCATCCCGGTGGGGCTCGGGAGAATCAGGTATCCTGGCGCGGCGTCCGGGCGTAC ATCCGCGCCAGCCGTAGGCGAGCCAAGTGGCAAGCATCGTGCTCAACCAGGGGTGGACTGGCATCTGCCGCG GCGTGTCCGTCTTCGTGGTCTCGTAGACCTCTCTACCTTGTTGTTGAAGGTCTTCGTCACCCAGAGCTTCCCAA GGGGTTGACGGTGCCGTCCAGTCCCGGACCTGCAGGGCTGACGCCTCCCGATGCGCACCGCTCCGACGAAG GCCACGGCGTAGAGCACGCGCCGCTCAAGGGGGATGCGCTCATCCGTAATCAGTGCGACGACCTCGGCCGCG AGTAGACGGCCGAGTCCCGCCATCGAGGGTCAGCATCCCGAATGGCCGGAATCTCCCCGCGGCGCTCGCGCAA GTCACAGGGCGAGCGCTCCAGCAGCCCGTCCACCACCGCGTCACTCAGCATCGTCCGCACCGAGGGCGTAGACGT GGCGCACCGTTGCGGCGGCCAGGCCCTTTCGCGCACTTCGCGCACCGAGTGCAGACAGTCCGACGCGTCAG	

CACACCGAGTTCCTTGTCGCCCAACGAGGGCAGCACGTGGTGCTGCATCCGGGAGCGGTATCCATGACCGAG
CGCAGCGTGACGCGCCCTCCATCCACTTGGCGGCGTAGGCCTCGACGGTGACGGGACCGGACGCGCCGAGTC
CCTGGTCTTCTCCGCGGCCACGCGCTTCTCGGTGCGCTTCAGGACGGCGCGCGCTTCACTTCGTCTTCTTCGCC
CGTGCTCGCGTACTGCCGCGCGCCGCGAGCGTCAACCACCACATCCACAAGTAGCGAGTGGCCTTCTTGCGAT
AGACGTTACCCACGGCGCCGCCCTGCCTTCCGCGCCAGGATGGCCGCTGCCTTCGCGTCGGCCTCCTCTTCGGG
CGTAGCCTTCGCCCCGCGGCGACGCGAGAAACGCCTCCAACCTCCGACTTCTTGACGCGACCACGATGCCAGCCG
TCAGGAGTCCCTGCGCTGCCAGTTGCGAATGGTGGATGTGCTGACACTTGCGAGGGGCTGCCGCTCAGTCTGA
GTGAGCACCTCGTCCGTCTTCTGCGCGGTGGTGCCCAGCACCCGCCGGACGACTCTTTCGACGATGGCCTCCAC
GTCAATGTCAATCTCACTCACGATGACTGCCCCGTTGACCCACGCCTGTACGCCCTGTAGGTAACACGGCAGA
CTGACACCCCACTGCATGCACATGGGCCGATGCACACGCAGTGGGGCTGGACGCAGGCTCCAAGTCTCATCTG
AGCCCGCATCAGAAACATAAATGAAACACGCATCTAAATCAATACGCGCGATGCAATTTTCTTGACTCGGACA
CGCGAGGACACACGGTAGTCACTCAAGCGCAATAACACCGACTCTCCCGAGTGACGGGAGTTTGCTCGCAGT
GTTTTTACGCAACACAACGCAATCGCAACCTTGATTGCAATTGCAGTCCACGAGTCCGGACGGGTGTATCAAGA
CCGACGCGGAGGTATCGCCGTGCCAGCGTCTCGACTCGTTGCTGTCTTGAGTTGGGCGGGCACGGCGAACCCC
GGAGAACAGTGCGCCGACGGCGACGGTGAGGAGCACCGTCGGGCACCGGAGTAGATGCGCGCCAGCGTGCC
GGAACGCGTCTACTCTCGAAGTTGTCGTGTGCTGCTGGCCGCTCACCGTGTGCTGCCGGTCCAGGTACTGCGTACT
TGCCAACCTGCACCCGGAGACCGGGTGCTGTCAAGTCGGGTACTGCGACTACTTGAGGCCAAGCGCGCGAAGC
GCTGCGGCCCGGTGACGCTCAGCGTAACCCGCCGCGCGTCAGCGGCGTCTGCGTCTGCTCCACCTCAACACC
TGTCTCGCGGAGTTGCGCCAGCAGTCGCTCCGTAGAGCGGCGCTGGAGTCCAGCGCGGGCGCCCAACTCCAGC
GGCGAGTGCGGGCGCTCCACCAGGAGGCGGAGCGCCGTCAGCGAAAGCATGGGGCGCGGTGGCGTCTGCAC
GGCACCACCAACTCTGCCTTGGGCCACTGTGCCGTGTGCGCTCGACAAGCGCGGCCGTGGTCCATCCCCA
AATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAG
CGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTAC
CATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAG
CCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCG
GGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGAACGGAACATTCATCAGTGTAATAATGGAATCAA
TAAAGCCCTGCGCAGCGCGCAGGGTCAGCCTGAATACGCGTTTAATGACCAGCACAGTCGTGATGGCAAGGTC
AGAATAGCGCTGAGGTCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGACTCATACCAGGCCTGAATCGCCCCATCATCCA
GCCAGAAAGTGAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGGTGGACCAGTTGGTGATTTTGAACCTTTGC
TTTGCCACGGAACGGTCTGCGTTGTGCGGAAGATGCGTGATCTGATCCTTCAACTCAGCAAAAGTTCGATTTATT
CAACAAAGCCACGTTGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAAATATATCATCATGAACAATA
AACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCGAG
GCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTGCGGCAATCAG
GTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTT
GCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCA
TTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGAAAAACAGCATTCCAGGTATTAGA
AGAATATCTGATTAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCTGCGCCGGTTGCATTGATTCTGT
TTGTAATTGTCCTTTTAACAGCGATCGCGTATTTCTGCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGTT
GATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTT
GCCATTCTCACCAGATTAGTCGTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTA
ATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAAGTGCCT
CGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTG
CAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTAACACTGGCAGAGCATTACGC
TGACTTGACGGGACGGCGGCTTTGTTGAATAAATCGAACTTTTGCTGAGTTGAAGGATCAGATCACGCATCTTCC
CGACAACGCAGACCGTTCCGTGGCAAAGCAAAAGTTCAAAATCACCAACTGGTCCACCTACAACAAAGCTCTCA
TCAACCGTGGCTCCCTCACTTTCTGGCTGGATGATGGGGCGATTACGGCCTGGTATGAGTCAGCAACACCTTCTT
CACGAGGCAGACCTCAGCGCTATTCTGACCTTGCCATCACGACTGTGCTGGTCATTAAACGCGTATTACGGCTGA
CCCTGCGCGCTGCGCAGGGCTTTATTGATTCCATTTTACACTGATGAATGTTCCGTTGCGCTGCCCGGATTACA

GGGGCATTGCGCATTAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGC
 TGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAA
 AACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGTTGGCATGCGTAGTGCTAATCCCATCCGCGGGCGCAGCTGACTCGCTCTAG
 ACTCGGTCAAAGAGGAGAAATACTAGATGACCAGCTTCCGCGCCGCCCTACCGTGCTGTCCCTGATGACGCTG
 CCCGCTGCTTCGGCACGTGCGAGCGCCCGCCGCGCCGCTCCACGCCCCGCGCGGAGGCGGAAGCCGCGC
 GCTCCAGTGCGGGCAAGCTGGGGCCCCGAGACGTGGTGGAGGTGCGCGTCTTCCAGGAGCCCCGAGCACTCCG
 GCACCTGGCGCTTGTCCAGCGAGGGCACCATCGACTACCCGCTGTGCGGCAAGGTGCCGCTGTGCGGGACGAC
 GCCCAGCTCGGCGGCGGACCAGCTGCGGGACTGCCTGGCGCGCTACGTGCGCCGCCCCAGGTATCGGTGCTC
 ATCCGCGAGTACAACGCGAGAAGGTGTTCTGCTTCGGCGAGGTGCGAGAAGCCGGGCACCTTCCCCGTGGACA
 ACGAGATGTCCATCGTCCAGGCGATTACGCTGGCCGCGGGCTTACCAAGCTGGCGGCGAAGAACAACACGCT
 GGTGACGCGCGTGGTGGACGGGGGGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGGGGGGGACTACAAAGACGATG
 ACGACAAGGGGGGGCAGGAGCGCAAGATTGCGGTTCCCGTGGAGGACATCGGCGTGGGGCGGGAGAAGAAC
 TTCATGCTCCAGCCCGGCGACATCGTCTTCGTGCCGAGAGCTTCTTAGGAGGATCCGGCTGCTAACAAAGC
 CCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGT
 CGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCTACTAGAGTCACACTGGCTCACCTTC
 GGGTGGGCTTTCTGCGTTTATACGAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTC
 ACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCAC
 ATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCA
 ACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGCTGCCTCGCGGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACAC
 ATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCA

Partie correspondant de
mxan_1916 dans *pSWU19-
 WzpB* :

mxan_1916 – **STREPII** - promoteur *pPila*

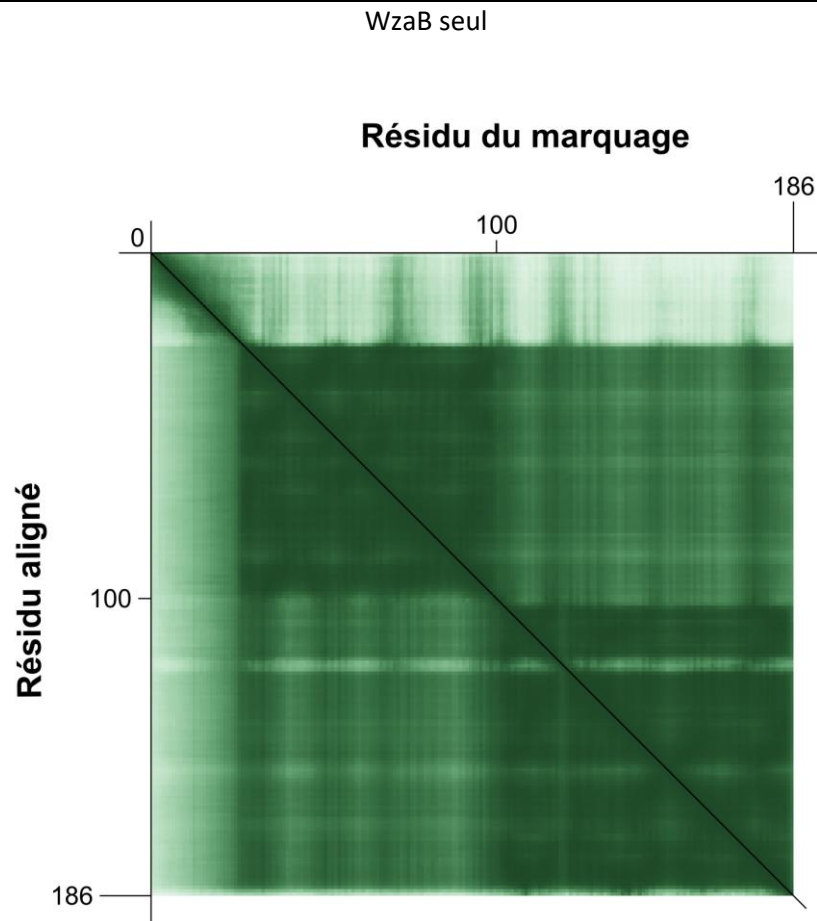
CTTGTTGGCATGCGTAGTGCTAATCCCATCCGCGGGCGCAGCTGACTCGCTCTAGACTCGGTCAAAGAGGAGAA
 AACTAGATGAAGCAGCCCGCGACATTCTGGGGAGGACTGGGTGCTCTGGCGCTGCTCGCGCTGGGCGGCACG
 GCCTCCGCCCAGGGCATCGCGACGCCTCCACCGGGGGTAACGGCTTCAAGGTGGGTAACGGGCGGCTGCACC
 CTAATTGACCTGGAGACGCGGCTGGACAGCGGCGTGGGCTACTTCTCGCCACCTCCAACCTCGGAGCCCAAC
 AGCGACCCGGTATCGGCCAACCTGGCGAGCGACGTGGCGCTGCGCTTCCGCCCTGGCTTCCGGCTGGAGATTCC
 GTCGTCCACGCTGGCGTTAACCTGGGCGCCAACTGGACTACGTGTTGTACACGGGCCTGGTGACGAAGAACT
 CCAGCGCGGCCTCGCGCATGGAGGGCGCGGCGGACCTCAACGCGCGCTTCAACCCGGACGCTCCGCTGACGCT
 GGAGGTGTCGAACAGTTCGCGCGCTCGGACCGCACGCGCACCGCGGCCGTGGGCGTGGGCGTGCTCAGCCTC
 TTCAATGAAGCGCGCGCAAGGCCCGTGGCGCCCCGCGGCGGCGCGCTGGAGCTGACGCCAGCGTGGCC
 TACGCGGTGGAGTTCTTCCAGCCGTGAGCTCGGTGAGCCCCGTGCGCTGCACCGAAAGCGTGTGCGACCCGG
 CCGCGTGGAGCGCTTCGACTACGGCAACCTGCGAGTGGGCGCGGAAGGCCGTGGCGCTTCTGCCGAAGAC
 GGCGGTGGTGCTCGACCCACCTGGACGTGCGCAGCTACTTCAACGACAGCACGCCGGGCGCCTCGCTACTGC
 GCGTCATCGGCGGCGTGGCGGGCCTCGTGTCCCCAAGGTGGCCGTACGGCCAAGGCGGGCTGGGGCCAGA
 ACTTCGGCAGCACCGGCGGCGGCACCTTCTGGGGCAGTTGGAGGGCACCTACCTCTACAGCCCCACCTGAGC
 TTCAAGGCGGGCTACCTGCGCACCTGGAGCCCGTGGCCGCTACGGCTTCTTACGGACAACCGGGGCTACGG
 CGAGGTGCGCGCCCTCTCGGCGGCAAGCTGACGGTGTCCGCGGGCTCGCCGTGGACTTCTGCGCTTCGAC
 GGCGGCCGGAATGACACCGTCGTGCGGTGAATATCGGCCGAGTACCAGTTCTACCCGTGGCTGACGGGCGC

CTGCAGGCTACATGCTGGGTCGCCGCTCCTCCTCGGTGGATGGCGGGCGGCCTCAACTACTCGCGGCACGAGGG
GTACGCCCCGCTCTCCGTGACGTACTGGAGCCACCCGCGAGTTCGAAAAATGA

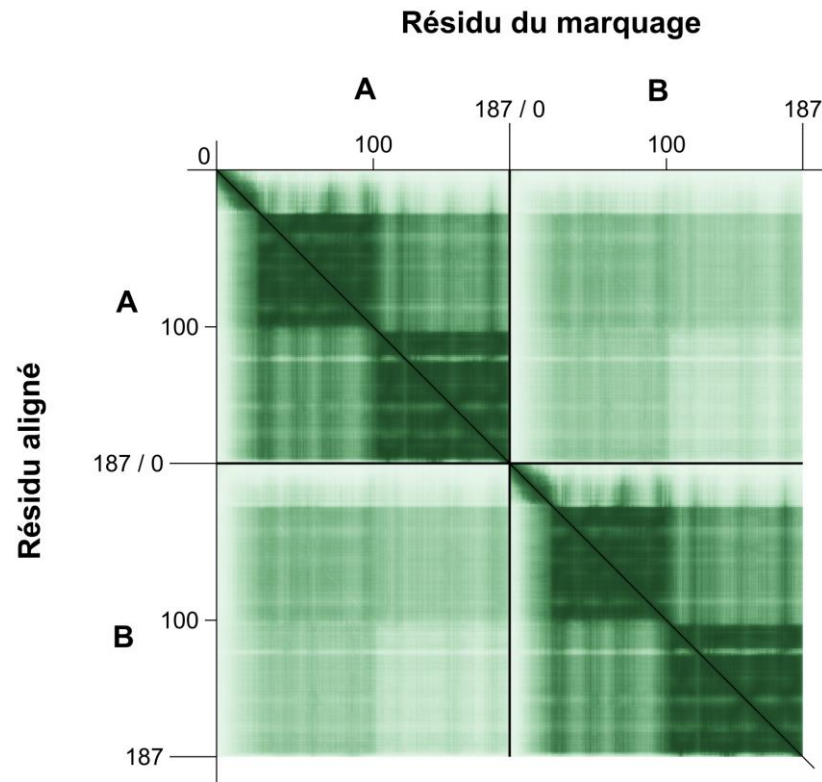
ANNEXE E

Les diagrammes PAE des complexes constitués de protomères WzaB (OPX) seuls et des ceux constitués de protomères WzaB et d'un WzpB (porine)

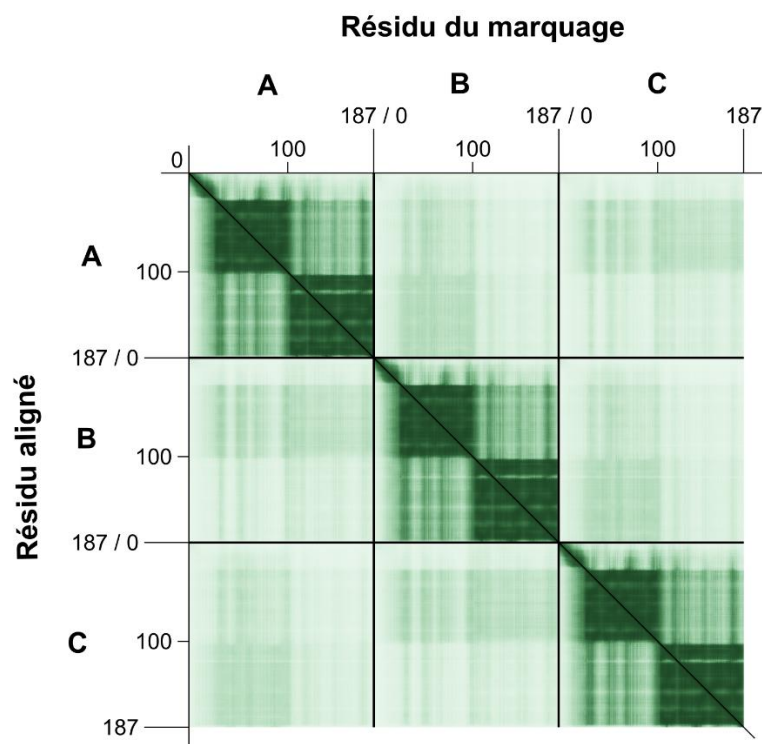
PAE de complexes de WzaB (OPX) seuls



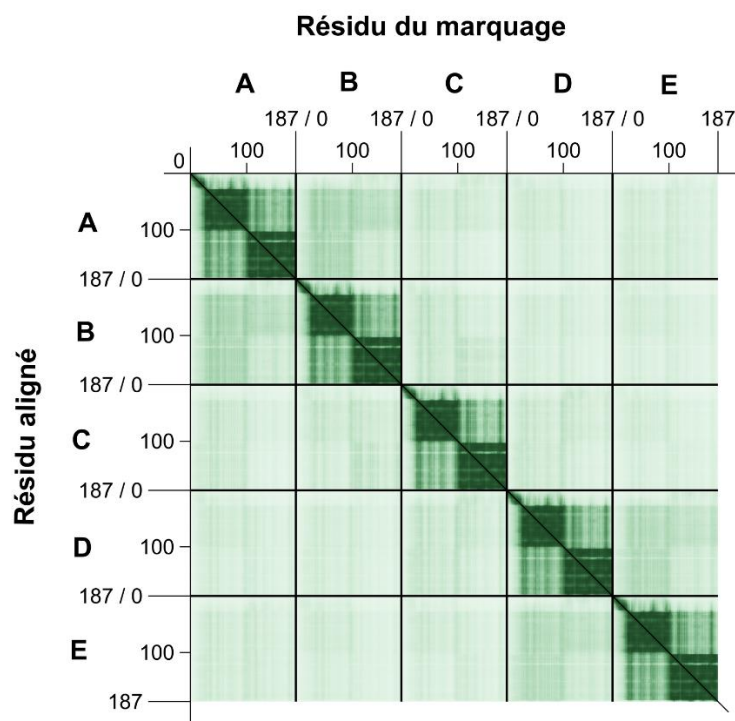
Deux Protomères WzaB

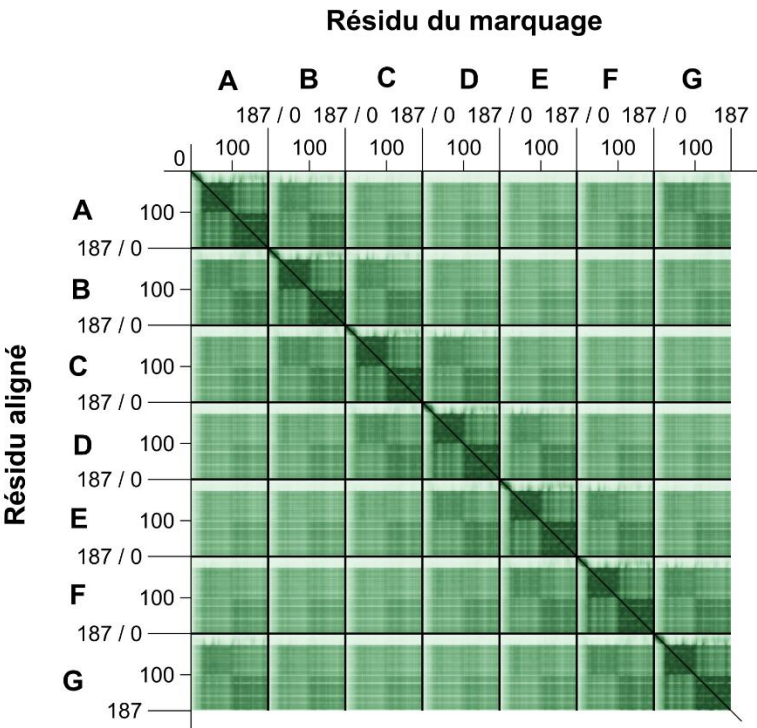


Trois Protomères WzaB



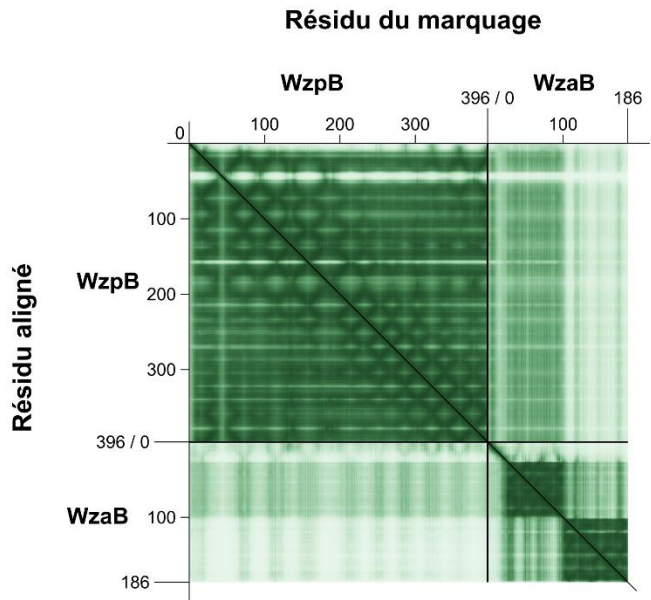
Cinq Protomères WzaB



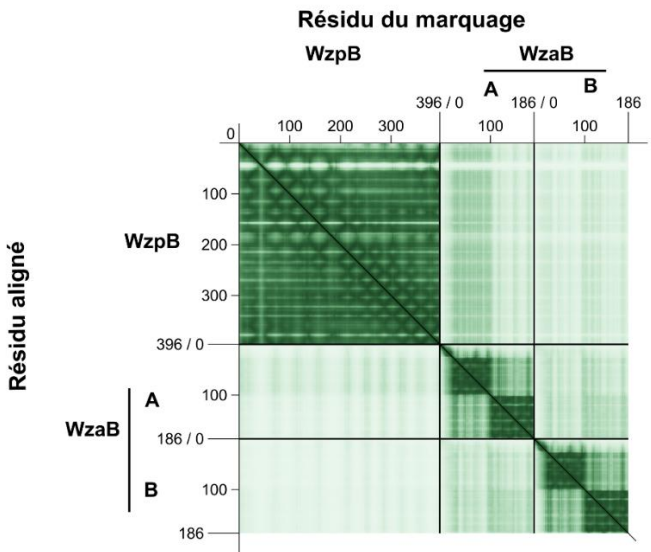


PAE de complexes de WzaB -WzpB

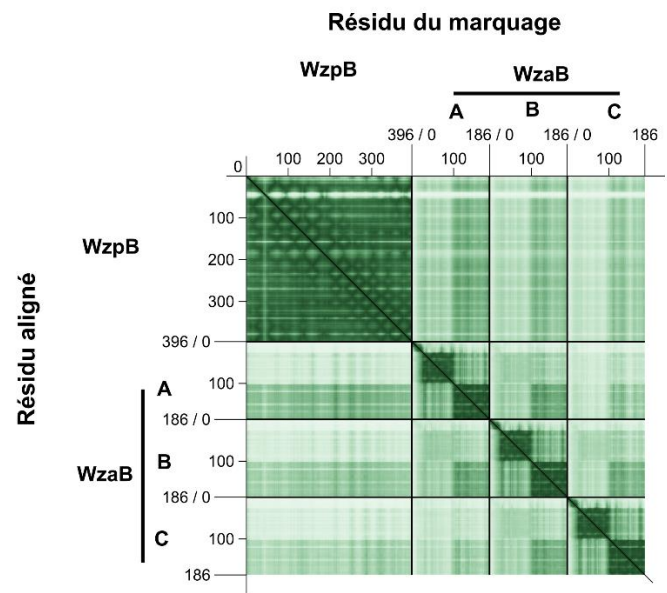
WzpB seul



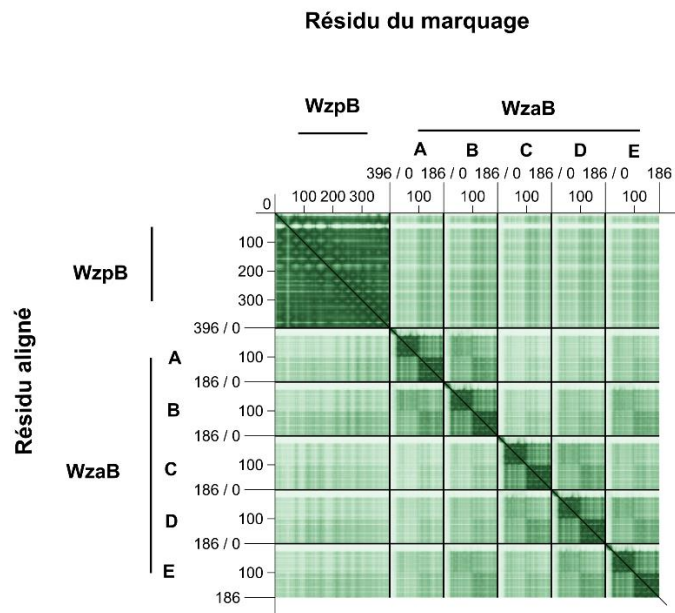
Deux Protomères WzaB



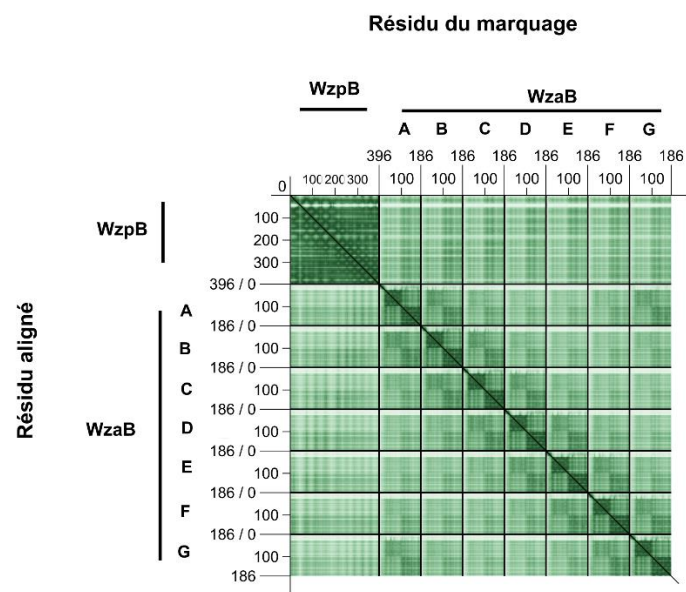
Trois Protomères WzaB



Cinq Protomères WzaB



Sept Protomères WzaB



RÉFÉRENCES

- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C.-C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E., Beattie, C., Bertolli, O., Bridgland, A., Cherepanov, A., Congreve, M., Cowen-Rivers, A. I., Cowie, A., Figurnov, M., Fuchs, F. B., Gladman, H., Jain, R., Khan, Y. A., Low, C. M. R., Perlin, K., Potapenko, A., Savy, P., Singh, S., Stecula, A., Thillaisundaram, A., Tong, C., Yakneen, S., Zhong, E. D., Zielinski, M., Židek, A., Bapst, V., Kohli, P., Jaderberg, M., Hassabis, D. et Jumper, J. M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 630(8016), 493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>
- Ai, Y. et Jane, J. I. (2016). Starch: Structure, Property, and Determination. Dans B. Caballero, P. M. Finglas et F. Toldrá (dir.), *Encyclopedia of Food and Health* (p. 165–174). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00657-7>.
- Akhtar, A. A. et Turner, D. P. J. (2022). The role of bacterial ATP-binding cassette (ABC) transporters in pathogenesis and virulence: Therapeutic and vaccine potential. *Microbial Pathogenesis*, 171, 105734. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105734>
- Alizadeh-Sani, M., Ehsani, A., Moghaddas Kia, E. et Khezerlou, A. (2019). Microbial gums: introducing a novel functional component of edible coatings and packaging. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(17), 6853–6866. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09966-x>
- Ascari, A. et Morona, R. (2025). Recent insights into Wzy polymerases and lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 207(4), e00417–00424. <https://doi.org/10.1128/jb.00417-24>
- Bannwarth, M. et Schulz, G. E. (2003). The expression of outer membrane proteins for crystallization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1610(1), 37–45. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00711-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00711-3)
- Berleman, J. E. et Kirby, J. R. (2009). Deciphering the hunting strategy of a bacterial wolfpack. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(5), 942–957. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00185.x>
- Bertani, B. et Ruiz, N. (2018). Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus*, 8(1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0001–2018. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0001-2018>
- Black, W. P., Wang, L., Davis, M. Y. et Yang, Z. (2015). The orphan response regulator EpsW is a substrate of the DifE kinase and it regulates exopolysaccharide in *Myxococcus xanthus*. *Scientific Reports*, 5(1), 17831. <https://doi.org/10.1038/srep17831>
- Cambillau, C. et Mignot, T. (2025). Structural model of a bacterial focal adhesion complex. *Communications Biology*, 8(1), 119. <https://doi.org/10.1038/s42003-025-07550-w>
- Chambers, J., Sparks, N., Sydney, N., Livingstone, P. G., Cookson, A. R. et Whitworth, D. E. (2020). Comparative Genomics and Pan-Genomics of the Myxococcaceae, including a Description of Five Novel Species: *Myxococcus eversor* sp. nov., *Myxococcus*

- llanfairpwllgwyngyllgogerychwyrndrobwlillantysiliogogochensis sp. nov., *Myxococcus vastator* sp. nov., *Pyxidicoccus caerfyrddinensis* sp. nov., and *Pyxidicoccus trucidator* sp. nov. *Genome Biology and Evolution*, 12(12), 2289–2302. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa212>
- Collins, R. F. et Derrick, J. P. (2007). Wza: a new structural paradigm for outer membrane secretory proteins? *Trends in Microbiology*, 15(3), 96–100. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.01.002>
- Cuthbertson, L., Kimber, M. S. et Whitfield, C. (2007). Substrate binding by a bacterial ABC transporter involved in polysaccharide export. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19529–19534. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705709104>
- Cuthbertson, L., Mainprize, I. L., Naismith, J. H. et Whitfield, C. (2009). Pivotal Roles of the Outer Membrane Polysaccharide Export and Polysaccharide Copolymerase Protein Families in Export of Extracellular Polysaccharides in Gram-Negative Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(1), 155–177. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00024-08>
- Dong, C., Beis, K., Nesper, J., Brunkan-LaMontagne, A. L., Clarke, B. R., Whitfield, C. et Naismith, J. H. (2006). Wza the translocon for E. coli capsular polysaccharides defines a new class of membrane protein. *Nature*, 444(7116), 226–229. <https://doi.org/10.1038/nature05267>
- Drummelsmith, J. et Whitfield, C. (1999). Gene products required for surface expression of the capsular form of the group 1 K antigen in Escherichia coli (O9a:K30). *Molecular Microbiology*, 31(5), 1321–1332. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01277.x>
- França, T. C. C., Saïdi, F., Ajamian, A., Islam, S. T. et LaPlante, S. R. (2024). Molecular Dynamics of Outer Membrane-Embedded Polysaccharide Secretion Porins Reveals Closed Resting-State Surface Gates Targetable by Virtual Fragment Screening for Drug Hotspot Identification. *ACS Omega*, 9(11), 13217–13226. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c09970>
- Gao, S., Jin, W., Quan, Y., Li, Y., Shen, Y., Yuan, S., Yi, L., Wang, Y. et Wang, Y. (2024). Bacterial capsules: Occurrence, mechanism, and function. *npj Biofilms and Microbiomes*, 10(1), 21. <https://doi.org/10.1038/s41522-024-00497-6>
- Gibiansky, M. L., Hu, W., Dahmen, K. A., Shi, W. et Wong, G. C. L. (2013). Earthquake-like dynamics in *Myxococcus xanthus* social motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(6), 2330–2335. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215089110>
- Guisseppi, A., Vicente, J. J., Herrou, J., Byrne, D., Barneoud, A., Moine, A., Espinosa, L., Basse, M.-J., Molle, V., Mignot, T., Roche, P. et Mauriello, E. M. F. (2019). A divergent CheW confers plasticity to nucleoid-associated chemosensory arrays. *PLOS Genetics*, 15(12), e1008533. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008533>
- Holkenbrink, C., Hoiczky, E., Kahnt, J. et Higgs, P. I. (2014). Synthesis and Assembly of a Novel Glycan Layer in *Myxococcus xanthus* Spores *Journal of Biological Chemistry*, 289(46), 32364–32378. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.595504>
- Hong, Y., Morcilla, V. A., Liu, M. A., Russell, E. L. M. et Reeves, P. R. (2015). Three Wzy polymerases are specific for particular forms of an internal linkage in otherwise identical O units. *Microbiology*, 161(8), 1639–1647. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000113>

- Hu, W.-F., Niu, L., Yue, X.-J., Zhu, L.-L., Hu, W., Li, Y.-Z. et Wu, C. (2021). Characterization of Constitutive Promoters for the Elicitation of Secondary Metabolites in Myxobacteria. *ACS Synthetic Biology*, 10(11), 2904–2909. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00444>
- 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., Sharma, G., Fiche, J.-B., Bratton, B. P., Herrou, J., Nollmann, M., Shaevitz, J. W., Durand, E. et Mignot, T. (2023). Unmasking of the von Willebrand A-domain surface adhesin CglB at bacterial focal adhesions mediates myxobacterial gliding motility. *Science Advances*, 9(8), eabq0619. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abq0619>
- Islam, S. T. et Lam, J. S. (2014). Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway. *Canadian journal of microbiology*, 60(11), 697-716 <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0595>
- Islam, S. T. et 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., Brasseur, G., Guillemot, J.-F., Benarouche, A., Bridot, J.-L., Ravicoulamin, G., Cagna, A., Gauthier, C., Singer, M., Fierobe, H.-P., Mignot, T. et Mauriello, E. M. F. (2020). Modulation of bacterial multicellularity via spatio-specific polysaccharide secretion. *PLOS Biology*, 18(6), e3000728. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000728>
- Jurru, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L. E., Brookes, D. H., Wilson, L., Chen, J., Liles, K., Chun, M., Li, P., Gohara, D. W., Dolinsky, T., Konecny, R., Koes, D. R., Nielsen, J. E., Head-Gordon, T., Geng, W., Krasny, R., Wei, G.-W., Holst, M. J., McCammon, J. A. et Baker, N. A. (2018). Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Science*, 27(1), 112–128. <https://doi.org/10.1002/pro.3280>
- Kasahara, J., Kiriya, Y., Miyashita, M., Kondo, T., Yamada, T., Yazawa, K., Yoshikawa, R. et Yamamoto, H. (2016). Teichoic Acid Polymers Affect Expression and Localization of DL-Endopeptidase LytE Required for Lateral Cell Wall Hydrolysis in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 198(11), 1585–1594. <https://doi.org/10.1128/jb.00003-16>
- Kaur, N. et Dey, P. (2023). Bacterial exopolysaccharides as emerging bioactive macromolecules: from fundamentals to applications. *Research in Microbiology*, 174(4), 104024. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2022.104024>
- Keane, R. et Berleman, J. (2016). The predatory life cycle of *Myxococcus xanthus*. *Microbiology*, 162(1), 1–11. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000208>
- Khan, R., Shah, M. D., Shah, L., Lee, P.-C. et Khan, I. (2022). Bacterial polysaccharides—A big source for prebiotics and therapeutics. *Frontiers in Nutrition*, Volume 9 - 2022. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1031935>
- Khan, T. T., Murphy, P., Zhang, J., Igoshin, O. A. et Welch, R. D. (2025). Genetic and environmental determinants of streaming and aggregation in *Myxococcus xanthus*. *Scientific Reports*, 15(1), 30673. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-15915-8>

- Krissinel, E. et Henrick, K. (2005). Detection of Protein Assemblies in Crystals. (p. 163–174). Computational Life Sciences, Berlin, Heidelberg. Springer Berlin Heidelberg.
- Kroos, L., Wall, D., Islam, S. T., Whitworth, D. E., Muñoz-Dorado, J., Higgs, P. I., Singer, M., Mauriello, E. M. F., Treuner-Lange, A., Søgaard-Andersen, L., Kaimer, C., Elías-Arnanz, M., Stojković, E. A., Müller, R., Volz, C., Velicer, G. J. et Nan, B. (2025). Milestones in the development of *Myxococcus xanthus* as a model multicellular bacterium. *Journal of Bacteriology*, 207(7), e00071–00025. <https://doi.org/10.1128/jb.00071-25>
- Kuklewicz, J. et Zimmer, J. (2024). Molecular insights into capsular polysaccharide secretion. *Nature*, 628(8009), 901–909. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07248-9>
- Kurata, S., Ariki, S. et Kawabata, S.-i. (2006). Recognition of pathogens and activation of immune responses in *Drosophila* and horseshoe crab innate immunity. *Immunobiology*, 211(4), 237–249. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.10.016>
- Liu, Y., Qin, R., A J Zaat, S., Breukink, E. et Heger, M. (2015). Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. *Journal of Clinical and Translational Research*, 1(3), 140. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30873451>
- Masselot--Joubert, L. et Di Renzo, M. A. (2025). ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters and Antibiotic Resistance: Specialized Systems for Capsular Polysaccharide Export in Gram-Negative Pathogens. *Polysaccharides*, 6(2), 38. <https://www.mdpi.com/2673-4176/6/2/38>
- Meng, E. C., Goddard, T. D., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Pearson, Z. J., Morris, J. H. et Ferrin, T. E. (2023). UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. *Protein Science*, 32(11), e4792. <https://doi.org/10.1002/pro.4792>
- Misra, S., Sharma, V. et Srivastava, A. K. (2021). Bacterial Polysaccharides: An Overview. Dans K. G. Ramawat et J.-M. Mérillon (dir.), *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology* (p. 1–24). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-03751-6_68-1.
- Mohr, K. I. (2018). Diversity of Myxobacteria—We Only See the Tip of the Iceberg. *Microorganisms*, 6(3), 84. <https://www.mdpi.com/2076-2607/6/3/84>
- Muñoz-Dorado, J., Marcos-Torres, F. J., García-Bravo, E., Moraleda-Muñoz, A. et Pérez, J. (2016). Myxobacteria: Moving, Killing, Feeding, and Surviving Together [Review]. *Frontiers in Microbiology*, Volume 7 - 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00781>
- Muñoz-Dorado, J., Moraleda-Muñoz, A., Marcos-Torres, F. J., Contreras-Moreno, F. J., Martin-Cuadrado, A. B., Schrader, J. M., Higgs, P. I. et Pérez, J. (2019). Transcriptome dynamics of the *Myxococcus xanthus* multicellular developmental program. *eLife*, 8, e50374. <https://doi.org/10.7554/eLife.50374>
- Netrusov, A. I., Liyaskina, E. V., Kurgaeva, I. V., Liyaskina, A. U., Yang, G. et Revin, V. V. (2023). Exopolysaccharides Producing Bacteria: A Review. *Microorganisms*, 11(6), 1541. <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/6/1541>

- Peleg, Y. et Unger, T. (2014). Application of the Restriction-Free (RF) Cloning for Multicomponents Assembly. Dans S. Valla et R. Lale (dir.), *DNA Cloning and Assembly Methods* (p. 73–87). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8_6.
- Pérez-Burgos, M., García-Romero, I., Jung, J., Valvano, M. A. et Søgaaard-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>
- Pérez-Burgos, M., García-Romero, I., Valvano, M. A. et Søgaaard Andersen, L. (2020). Identification of the Wzx flippase, Wzy polymerase and sugar-modifying enzymes for spore coat polysaccharide biosynthesis in *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 113(6), 1189–1208. <https://doi.org/10.1111/mmi.14486>
- Pérez-Burgos, M. et Søgaaard-Andersen, L. (2020). Biosynthesis and function of cell-surface polysaccharides in the social bacterium *Myxococcus xanthus*. *Biological Chemistry*, 401(12), 1375–1387. <https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0217>
- Plummer, A. M. et Fleming, K. G. (2016). From Chaperones to the Membrane with a BAM! *Trends in Biochemical Sciences*, 41(10), 872–882. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.06.005>
- Saïdi, F., Bitazar, R., Bradette, N. Y. et Islam, S. T. (2022). Bacterial Glycocalyx Integrity Impacts Tolerance of *Myxococcus xanthus* to Antibiotics and Oxidative-Stress Agents. *Biomolecules*, 12(4), 571. <https://www.mdpi.com/2218-273X/12/4/571>
- Saïdi, F., Gamboa Marin, O. J., Veytia-Bucheli, J. I., Vinogradov, E., Ravicoularamin, G., Jolivet, N. Y., Kezzo, A. A., Ramirez Esquivel, E., Panda, A., Sharma, G., Vincent, S. P., Gauthier, C. et Islam, S. T. (2022). Evaluation of Azido 3-Deoxy-d-manno-oct-2-ulosonic Acid (Kdo) Analogues for Click Chemistry-Mediated Metabolic Labeling of *Myxococcus xanthus* DZ2 Lipopolysaccharide. *ACS Omega*, 7(39), 34997–35013. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c03711>
- Saïdi, F., Mahanta, U., Panda, A., Kezzo, A. A., Jolivet, N. Y., Bitazar, R., John, G., Martinez, M., Mellouk, A., Calmettes, C., Chang, Y.-W., Sharma, G. et Islam, S. T. (2022). Bacterial Outer Membrane Polysaccharide Export (OPX) Proteins Occupy Three Structural Classes with Selective β -Barrel Porin Requirements for Polymer Secretion. *Microbiology Spectrum*, 10(5), e01290–01222. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01290-22>
- Schmid, J., Sieber, V. et Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies [Review]. *Frontiers in Microbiology*, Volume 6 - 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00496>
- Silhavy, T. J., Kahne, D. et Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Siwek, W., Czapinska, H., Bochtler, M., Bujnicki, J. M. et Skowronek, K. (2012). Crystal structure and mechanism of action of the N6-methyladenine-dependent type IIM restriction endonuclease R.DpnI. *Nucleic Acids Research*, 40(15), 7563–7572. <https://doi.org/10.1093/nar/gks428>

- Skotnicka, D., Petters, T., Heering, J., Hoppert, M., Kaefer, V. et Sørensen, L. (2016). Cyclic Di-GMP Regulates Type IV Pilus-Dependent Motility in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 198(1), 77–90. <https://doi.org/10.1128/jb.00281-15>
- Studier, F. W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *Journal of Molecular Biology*, 219(1), 37–44. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90855-Z](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90855-Z)
- Stull, F., Betton, J.-M. et Bardwell James, C. A. (2018). Periplasmic Chaperones and Prolyl Isomerases. *EcoSal Plus*, 8(1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0005-2018. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0005-2018>
- Stylianopoulos, C. (2013). Carbohydrates: Chemistry and Classification. Dans B. Caballero (dir.), *Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition)* (p. 265–271). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00041-6>.
- Sutherland, I. (1988). Bacterial surface polysaccharides: structure and function. *International review of cytology*, 113. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)60849-9](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)60849-9)
- Tang, X., Chang, S., Qiao, W., Luo, Q., Chen, Y., Jia, Z., Coleman, J., Zhang, K., Wang, T., Zhang, Z., Zhang, C., Zhu, X., Wei, X., Dong, C., Zhang, X. et Dong, H. (2021). Structural insights into outer membrane asymmetry maintenance in Gram-negative bacteria by MlaFEDB. *Nature Structural & Molecular Biology*, 28(1), 81–91. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00532-y>
- Teufel, F., Almagro Armenteros, J. J., Johansen, A. R., Gíslason, M. H., Pihl, S. I., Tsirigos, K. D., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G. et Nielsen, H. (2022). SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nature Biotechnology*, 40(7), 1023–1025. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3>
- Vasiliou, V., Vasiliou, K. et Nebert, D. W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human Genomics*, 3(3), 281. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-3-3-281>
- Vizcaino, N., Chordi, A. et Fernández-Lago, L. (1991). Characterization of smooth Brucella lipopolysaccharides and polysaccharides by monoclonal antibodies. *Research in Microbiology*, 142(9), 971–978. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(91\)90007-W](https://doi.org/10.1016/0923-2508(91)90007-W)
- Wang, G., Mishra, B., Epan, R. F. et Epan, R. M. (2014). High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(9), 2160–2172. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.016>
- Whitney, J. C. et Howell, P. L. (2013). Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends in Microbiology*, 21(2), 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.10.001>
- Willis, L. M. et Whitfield, C. (2013). Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydrate Research*, 378, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.05.007>

- Wu, S. S. et Kaiser, D. (1995). Genetic and functional evidence that Type IV pili are required for social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 18(3), 547–558. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_18030547.x
- Yang, Y., Liu, J., Clarke, B. R., Seidel, L., Bolla, J. R., Ward, P. N., Zhang, P., Robinson, C. V., Whitfield, C. et Naismith, J. H. (2021). The molecular basis of regulation of bacterial capsule assembly by Wzc. *Nature Communications*, 12(1), 4349. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24652-1>
- Zhou, T. et Nan, B. (2017). Exopolysaccharides promote *Myxococcus xanthus* social motility by inhibiting cellular reversals. *Molecular Microbiology*, 103(4), 729–743. <https://doi.org/10.1111/mmi.13585>
- Zusman, D. R., Scott, A. E., Yang, Z. et Kirby, J. R. (2007). Chemosensory pathways, motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Nature Reviews Microbiology*, 5(11), 862–872. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1770>